



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

MOŽNOSTI VYUŽITÍ VYBRANÝCH FRAKCIÍ TECHNICKÉHO KONOPI V KOSMETICE

USE OF SOME FRACTIONS OF TECHNICAL HEMP IN COSMETICS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Lenka Gregarová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1883/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Lenka Gregarová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název diplomové práce:

Možnosti využití vybraných frakcí technického konopí v kosmetice

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) literární rešerše – popis rostliny konopí, odrůdy; zpracování technického konopí; frakce a jejich složení
- 2) charakterizace vybraných extraktů z několika částí rostliny konopí; optimalizace stanovení biologicky aktivních látek
- 3) příprava kosmetických emulzí s obsahem konopných frakcí
- 4) stanovení antibakteriálního a antifugálního účinku emulzí s přísadkou konopí

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

Bc. Lenka Gregarová
studentka

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Konopí seté je všestranná bylina známá již několik tisíc let a obsahuje řadu aktivních látek. Tato diplomová práce se zaměřuje na využití vybraných extraktů z technického konopí v kosmetice, konkrétně ve vlasové. První část je zaměřena na rostlinu konopí, seznámení s aktivními látkami v ní obsaženými a celkové zpracování rostliny. V druhé části byly experimentálně stanoveny aktivní látky v pěti extraktech z různých odrůd, které byly dodány z průmyslu. Extrakty byly porovnané na základě obsahu antioxidantů, chlorofylů, fenolických látek, flavonoidů a kanabinoidů. Následně byl připraven šampon na vlasy s přídavkem konopných extraktů a konopného hydrolyzátu. Nakonec byl u extraktů a šamponů sledován inhibiční účinek vůči mikroorganismům. V konopných extraktech byly detekovány prospěšné biologicky aktivní látky, kde vyšší obsahy byly naměřeny v ethanolových extraktech. Extrakty také dokázaly inhibovat růst určitých mikroorganismů. U připraveného šamponu byly pozorovány uspokojivé výsledky na vlasech.

KLÍČOVÁ SLOVA

Technické konopí, biologicky aktivní látky, šampon na vlasy, antimikrobiální testy

ABSTRACT

Cannabis sativa is a versatile herb which is known for several thousand years and contains a variety of active substances. This thesis is focused on the use of some extracts of hem in cosmetics, specifically in hair cosmetics. The first part focuses on the *Cannabis sativa*, introducing the active contained substances and the overall processing of the plant. In the second part were experimentally determined the active substances in five extracts from different varieties, that were supplied from industry. Extracts were compared based on the extraction yield of antioxidants, chlorophylls, phenolic compounds, flavonoids and cannabinoids. Subsequently, a hair shampoo was prepared with the addition of hemp extracts and hemp hydrolysate. Lastly, the inhibitory effect against microorganisms was monitored for extracts and shampoos finally. Beneficial biologically active substances were detected in hemp extracts, wherein higher levels were measured in ethanol extracts. The extracts were also able to inhibit the growth of certain microorganisms. Satisfactory results on hair were observed with the prepared shampoo.

KEYWORDS

Industrial hemp, biologically active substances, hair shampoo, antimicrobial tests

GREGAROVÁ, Lenka. *Možnosti využití vybraných frakcí technického konopí v kosmetice* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-08]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149186>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsou správně a úplně citovány. Diplomová 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

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé diplomové práce prof. RNDr. Ivaně Márově, CSc. za ochotu a odborné vedení práce. Velké poděkování též patří mé konzultantce Ing. Monice Wikarské za cenné rady, pomoc při praktické části a zpracování výsledků, ochotu a věnovaný čas. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za podporu během celého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Konopí seté.....	9
2.1.1	Botanická charakteristika	9
2.1.2	Odrůdy technického konopí	10
2.2	Historie technického konopí.....	11
2.3	Využití technického konopí.....	11
2.3.1	Využití v medicíně	11
2.3.2	Využití v kosmetice.....	11
2.4	Zpracování technického konopí	12
2.5	Bioaktivní látky	13
2.5.1	Kanabinoidy	14
2.5.2	Fenolické látky	16
2.5.3	Terpeny a terpenoidy.....	16
2.5.4	Chlorofyly	16
2.5.5	Primární metabolity konopí.....	17
2.6	Kosmetické výrobky.....	18
2.6.1	Emulze.....	18
2.6.2	Surfaktanty	18
2.6.3	Konzervační látky	19
2.7	Vlasová kosmetika	19
2.7.1	Stavba vlasu.....	20
2.7.2	Růst vlasu	20
2.7.3	Konopný hydrolyzát ve vlasové kosmetice.....	20
2.8	Analytické metody	21
2.8.1	Spektrofotometrie.....	21
2.8.2	Kapalinová chromatografie	21
2.8.3	Analytická centrifuga	22
2.9	Antimikrobiální testy.....	22
2.9.1	Testovací mikroorganismy	22
	Escherichia coli	22
	Staphylococcus epidermidis	22
	Cutibacterium acnes	23
	Candida glabrata.....	23

2.9.2	Difúzní testy	23
2.9.3	Diluční metody.....	24
2.10	Stanovení stability	25
3	CÍLE PRÁCE	26
4	PRAKTICKÁ ČÁST.....	27
4.1	Použité chemikálie	27
4.2	Použité přístroje.....	28
4.3	Použité mikroorganismy.....	28
4.4	Konopné extrakty	28
4.5	Konopný hydrolyzát	28
4.6	Stanovení antioxidační aktivity	29
4.7	Stanovení chlorofylů	29
4.8	Stanovení fenolických látek	29
4.9	Stanovení flavonoidů.....	30
4.10	Stanovení kanabinoidů pomocí kapalinové chromatografie	30
4.11	Příprava kultivačních médií pro mikroorganismy	30
4.12	Příprava agaru.....	31
4.13	Antimikrobiální účinek.....	31
4.13.1	Agarový difúzní test	31
4.13.2	Bujónový diluční test	31
4.13.3	Ověření schopnosti buněk tvořit kolonie	32
4.13.4	Schopnost přežití mikroorganismů – stanovení pomocí resazurinu.....	32
4.14	Analytická centrifuga	33
4.15	Zátěžový test.....	33
4.15.1	Stanovení přesné koncentrace mikroorganismů.....	33
4.15.2	Vyhodnocení zátěžového testu.....	34
4.16	Využití konopí v kosmetice.....	34
4.16.1	Zkouška surfaktantů	35
4.16.2	Výroba šamponu na vlasy s přídavkem konopí	35
4.17	Senzorická analýza šampónu s přídavkem konopného hydrolyzátu a extraktu ...	36
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	38
5.1	Stanovení antioxidační aktivity	38
5.2	Stanovení celkových chlorofylů	38
5.3	Stanovení celkových fenolických látek	39
5.4	Stanovení celkových flavonoidů	40

5.5	Stanovení celkového obsahu kanabinoidů	41
5.6	Stanovení antimikrobiálního účinku pomocí difúzních testů	42
5.6.1	Escherichia coli	42
5.6.2	Staphylococcus epidermidis	43
5.6.3	Cutibacterium acnes	44
5.7	Stanovení antimikrobiálního účinku pomocí dilučních testů	45
5.7.1	Staphylococcus epidermidis	49
5.7.2	Cutibacterium acnes	51
5.7.3	Candida glabrata.....	53
5.7.4	Celkové zhodnocení působení vzorků konopí vůči mikroorganismům ..	54
5.7.5	Ověření schopnosti buněk tvořit kolonie	63
5.8	Zátěžový test.....	66
5.9	Analytická centrifuga	68
5.10	Zkouška surfaktantů	71
5.11	Senzorická analýza testovaného šamponu	72
6	ZÁVĚR.....	75
7	POUŽITÁ LITERATURA	77
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	84
9	PŘÍLOHY	85

1 ÚVOD

Konopí seté (*Cannabis sativa*) je všestranná víceúčelová plodina, která je tu již několik tisíc let. Díky její nenáročnosti na pěstování jsme schopni využít celou rostlinu k řadě užitečných aplikací, od výroby kvalitního vlákna přes suroviny do kosmetiky až k samotné potravě. Konopí jsme schopni rozdělit na dva typy podle toho, kolik v sobě obsahuje psychotropní návykové látky tetrahydrokanabinolu (THC).

Rostlina obsahuje celou řadu biologicky aktivních látek, které nachází potenciál v mnoha odvětvích, například v textilním, kosmetickém nebo medicínském průmyslu. Semínka obsahují vysoký podíl oleje i vlákniny, a proto se stávají ideální součástí potravy. Konopný olej je velmi bohatý na esenciální mastné kyseliny, které člověk musí přijímat v potravě, neboť je sám neumí syntetizovat. V konopí najdeme i fenolické látky, antioxidanty, kanabinoidy a řadu dalších významných látek.

V dnešní době hraje kosmetika v našem životě velkou roli. Řada lidí, aniž by si uvědomovala, používá kosmetické přípravky každý den. Vlasy jsou nedílnou součástí našeho vzhledu. Můžeme je různě měnit a manipulovat s nimi. Z toho důvodu si každý přeje, aby jeho vlasy byly co nejzdravější, čemuž mohou napomoci proteiny obsažené v rostlině. Proteiny dodávají vlasům objem, hladkost a pevnost.

Předložená diplomová práce je rozdělena na dvě části: teoretickou a praktickou. Cílem teoretické části je vypracování rešerše, která je zaměřená na rostlinu technického konopí, její využití a charakterizaci biologicky aktivních látek. Praktická část je zaměřená na identifikaci jednotlivých biologicky aktivních látek v extraktech z různých odrůd konopí. Následně byl připraven šampon na vlasy s přídavkem konopných extraktů a konopného hydrolyzátu. Aby měl šampon dlouhodobé účinky a mohl vydržet i po dobu několika měsíců, byl proveden test konzervace. Na závěr byly stanoveny antimikrobiální a antifugální účinky vůči mikroorganismům u extraktů a připravených šamponů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Konopí seté

Konopí seté (*Cannabis sativa*) (Obr. 1) je jednou z nejstarších a nejkontroverznějších pěstovaných jednoletých plodin. Konopí je druh z čeledi konopovitých. Do této čeledi patří i chmel otáčivý (*Humulus lupulus*), který je nejbližší příbuzný konopí. Bylo uvedeno, že v současné době se řadí do rodu *Cannabis* pouze jeden druh, a tím je průmyslové konopí (*Cannabis sativa*). Tento druh zahrnuje jak vláknité, tak narkotické konopí. Obecně se udává, že se druhy *Cannabis sativa* dělí na 3 poddruhy: *Sativa* označuje kmeny s omezeným množstvím THC, *Indica* označuje kmeny produkující hlavně THC a *Ruderalis* označuje divoké kmeny konopí [1–3].



Obr. 1: Konopí seté (*Cannabis sativa*) [4]

Obvykle lze konopí rozdělit především na dva typy podle obsahu tetrahydrokanabinolu (THC), včetně typu drogy (běžně nazývané marihuana s obsahem THC > 0,3 %) a typu vlákniny (běžně nazývané technické konopí s obsahem THC < 0,3 %). Kvůli psychotropnímu účinku THC je marihuana považována za nelegální drogu a je ve většině zemí omezena. Technické konopí je legální, i když podléhá jisté registraci [5].

2.1.1 Botanická charakteristika

Konopí je dvoudomá (pohlavně odlišná) rostlina (Obr. 2) a k opylování dochází větrem. Samičí květy jsou bez okvětních lístků a mají jeden nebo dva pestíky s jednokomorovým vaječником. Samičí květy jsou pokryty charakteristickými chloupky zvanými trichomy. Trichomy produkují pryskyřici obsahující psychoaktivní látku THC [1].

Květenství se skládá z četných květních hlav, které lze nalézt na dlouhých listnatých stoncích. Plodem je nažka obsahující jediné konopné semínko s tvrdou skořápkou. Každá oplodněná květina produkuje semínko, které se při dozrávání stává skvělou potravou pro ptáky. Konopné semínko má elipsoidní tvar a je přibližně 2–5 mm dlouhé [1, 6].



Obr. 2: Pohlavní dimorfismus – samice (vlevo), samec (vpravo) [1]

Nejznámější částí rostliny jsou listy. Každý list se skládá z několika kopinatých prstovitých listů (většinou sedm). Velikost a tvar listu se však výrazně liší podle genetického původu. Okraj listové čepele je hrubě pilovitý a povrch listu je drsný, neboť je pokrytý sekrečními chlupy po obou stranách. Listy samčích rostlin jsou obvykle menší než listy samičích rostlin. Vzhled a zbarvení listů závisí na druhu konopí. Postupem času listy odumírají, žloutnou a v důsledku větru opadají [1].

Stonek je zelený, rovný, obvykle hranatý, rozvětvený s dřevnatým vnitřkem. Mezi rostlinami tohoto druhu existuje obrovská rozmanitost výšek, které závisí na odrůdě, prostředí, půdních a klimatických podmínkách i hnojení. Samčí rostliny jsou obvykle méně rozvětvené a vyšší než samičí rostliny [1, 6].

Kořen konopí patří do kohoutkového typu, jehož délka se pohybuje v rozmezí 30 cm–2 m. Konopí má velmi vyvinutý kořenový systém, který zabraňuje erozi půdy. Postranní kořeny dosahují délky 20–100 cm. V závislosti na typu půdy se odrůda konopí, hlavní kořen a postranní kořeny vyvíjejí různými způsoby [1].

2.1.2 Odrůdy technického konopí

V dnešní době již existuje mnoho odrůd technického konopí.

Santhica 70 obsahuje relativně vysoké hladiny kanabinoidu kanabigerol (CBG) a minimální množství THC. Tato odrůda nejlépe roste v oblastech s vyšší vlhkostí vzduchu, protože se nevyužívá na pěstování semen, a tedy není nutné vyšší vlhkost dodržovat [7].

Futura 75 je jedna z nejstarších a dobře známých odrůd v Evropě a získává na popularitě i v Americe. Severské podnebí vykazuje vyšší výnosy obsahu vlákniny. Jižní zóny mohou

prodloužit pěstování, což má za následek vyšší výnos semen a květů se zvýšeným obsahem kanabidiolu (CBD). [7]

Fibror 79 je nová odrůda, která je vyšlechtěná hlavně pro bohatý obsah vlákniny. Lze ji pěstovat v jakémkoliv podnebí, včetně oblastí s vysokými teplotami, vlhkostí a dešťovými srážkami. [7]

2.2 Historie technického konopí

Přibývá historických důkazů, že konopí lidstvo využívá tisíce let. Nejstarší důkaz pochází z Číny kolem roku 2800 př. n. l., což naznačuje, že k domestikaci došlo ve východní Asii. Z Číny se konopí rozšířilo do Indie a Persie a poté se dostalo až do Evropy. Kolem roku 1500 př. n. l. se konopí dostalo do Nového světa a asi o 100 let později bylo konopí zavedeno do USA a Nové Anglie. Historicky se ze semen, vlákniny a dřevěného jádra rostliny získávalo velké množství produktů. Říká se, že konopí, jako tradiční vláknitá plodina, lemovalo hřbet prvního výtisku Bible a napínala Kolumbovy plachty plátnem a provazem [8–10].

2.3 Využití technického konopí

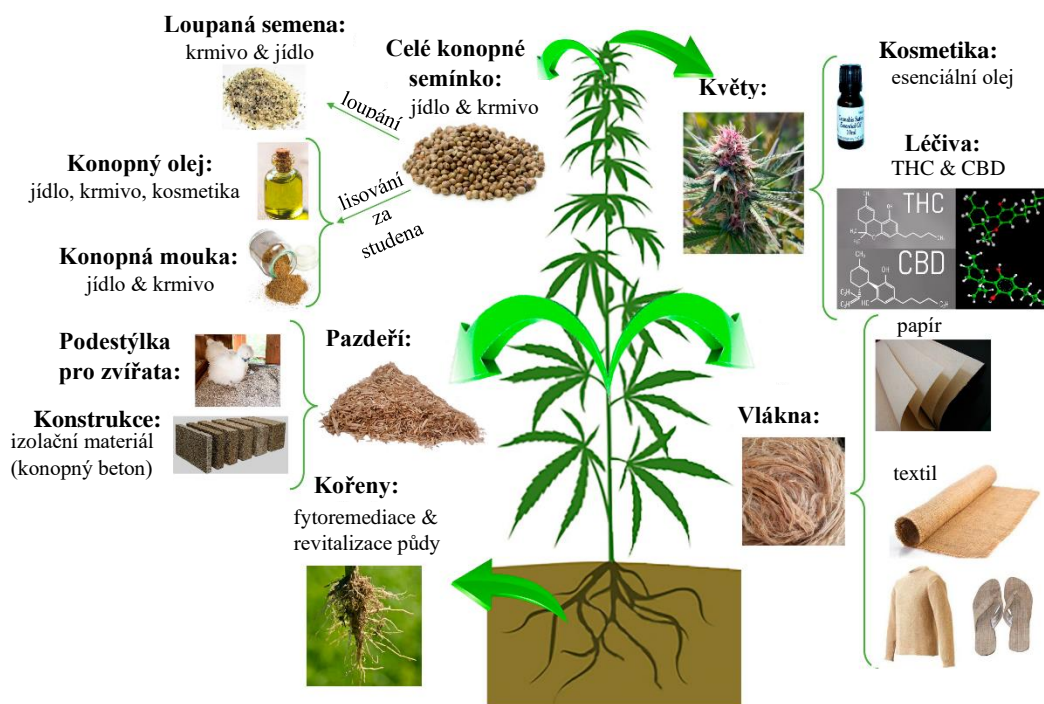
Technické konopí je všestranná víceúčelová bylina s nízkým dopadem na životní prostředí. Lze ho využít v zemědělských i průmyslových aplikacích, až po potenciální využití v lékařství, farmaceutickém i kosmetickém průmyslu. Každá část rostliny je využita v jiné oblasti (Obr. 3). Technické konopí se pěstuje pro výrobu vlákniny, papíru, celulózy a oleje z konopných semen. Květy se používají převážně pro kosmetické nebo farmaceutické účely, pazdeří na podestýlku zvířat a jako izolační materiál. Vlákna se používají na výrobu papíru a textilu. Celé konopné semínko se využívá jako krmivo a potravina. Konopí je vysoce flexibilní a odolné vůči extrémním klimatickým podmínkám. Rozsah použití konopných produktů v globální ekonomice se neustále rozšiřuje a průmyslové technologie pro výrobu přísad jsou vyvíjeny pro použití v inovativních průmyslových odvětvích [1, 3, 9, 11–13].

2.3.1 Využití v medicíně

Konopí se dnes využívá k léčbě široké škály zdravotních problémů. Nejběžnější použití je pro úlevu od bolesti u pacientů s rakovinou, chronickou bolestí nebo bolestí související s roztroušenou sklerózou. Také se používá ke snížení zánětu a zmírnění příznaků souvisejících s neurodegenerativními poruchami (Alzheimer, Parkinson, epilepsie). Též údajně snižuje neuropatickou bolest u diabetických pacientů a je účinné při léčbě poruch příjmu potravy [8].

2.3.2 Využití v kosmetice

Konopný olej, bohatý na esenciální mastné kyseliny, působí na atopickou dermatitidu, lupénku a akné. Je ideální přísadou do lehkých tělových olejů a krémů, neboť zlepšuje kvalitu pleti i hladkost pokožky. Navíc se jedná o suchý olej, který nezanechává na pokožce mastnou ani lepkavou vrstvu. Esenciální mastné kyseliny snižují poškození UV zářením a hyperpigmentaci. Proto byly vyvinuty přípravky s olejem z konopných semen jako dlouhodobé zvlhčující náplasti a stabilní emulze na ochranu proti slunečnímu záření. Kombinace konopného oleje a extraktů obsahující biologicky aktivní látku kanabidiol (CBD) mají protizánětlivý potenciál, který se rozšířil do produktů, jako jsou krémy na ruce, produkty na obličej, balzámy na rty nebo masážní oleje a gely [2, 9].



Obr. 3: Všeestranné využití technického konopí – upraveno [14]

2.4 Zpracování technického konopí

Technické konopí je multifunkční plodina, která nám může poskytnout cennou surovinu pro velké množství jak průmyslových, tak potravinářských aplikací. Nejčastěji je konopí pěstováno pro své lýkové vlákno nebo jedlá semena. Konopí je velmi přizpůsobivé a můžeme ho pěstovat v mnoha prostředích, od severních zeměpisných šířek až po tropická pásma. Často se pěstuje v mírných pásmech a vyžaduje průměrné srážky. Odrůdy pěstované pro vlákninu jsou hustě zasety a produkují rostliny až 3 m vysoké s téměř žádným větvením. Rostliny pěstované pro olejnatá semena jsou vysázeny dále od sebe a jsou kratší a mnohovětvěné [15, 16].

Vlákna během mechanického zpracování jsme schopni rozdělit do tří frakcí: svazky krátkých lýkových vláken, dlouhých lýkových vláken a dřevěné jádro (pazdeří). Hlavní funkcí vláken je poskytnout strukturní podporu. Vlákna jsou pevná, odolná a používají se pro šňůry (příze, lano, kabel) nebo pro hrubé tkaniny (pytlovina, plátno). Konopí obsahuje primární a sekundární vlákna. Sekundární vlákna jsou na rozdíl od primárních tenčí a kratší a jsou méně vhodná pro mnoho průmyslových aplikací. Konopí také může být použito při výrobě papíru [16].

Jedlá konopná semena jsou vyvážené zdravotní produkty s bioaktivními složkami, které mají schopnost pomáhat zdraví nad rámec základní výživy. Dají se nalézt pouze na samičích rostlinách. Konopná semena obsahují okolo 30–35,5 % oleje a jsou zdrojem snadno stravitelných bílkovin (25 %), sacharidů (20–30 %) vlákniny (5,4 % stravitelné a 22,2 % nestravitelné) a 5,6 % popela. Kromě toho je konopné semínko bohaté na vitamíny a minerály. Díky vysokému obsahu bílkovin se za posledních deset let zvýšil zájem o studium prospěšných vlastností konopných proteinů a peptidů. Vyloupaná semena konopí, někdy nazývaná konopná srdce, se prodávají jako zdravá výživa a mohou být konzumována syrová. [10, 13, 17]

Zpracování olejnatých semen ať se provádí extrakcí rozpouštědlem, nebo mechanickým lisováním vytváří značné množství odpadu sestávajícího se ze slupek a odtučněných mouček semen i olejových kalů. Vzhledem k vysokému množství proteinů, dietní vlákniny a dalších

bioaktivních sloučenin, které při konzumaci poskytují pozitivní zdravotní přínosy, byly mouky z olejnatých semen identifikovány jako zajímavý vedlejší produkt vhodný pro zhodnocení buď jako lidská strava, nebo krmivo. [18]

Konopný olej se získává ze semen extrakcí za studena nebo superkritickým oxidem uhličitým pro lepší stabilitu. Představuje asi 30 % suroviny. Konopný olej je bohatý na esenciální mastné kyseliny (kyselinu linolovou, kyselinu α -linolenovou, kyselinu γ -linolenovou a kyselinu olejovou). Rozsáhlý výzkum prokázal příznivý účinek těchto mastných kyselin v prevenci kardiovaskulárních onemocnění, obezity a cukrovky. Kyselina γ -linolenová hraje roli v regulaci zánětlivé reakce. Zdravotní přínosy konopného oleje jsou připisovány především jeho žádoucím poměru omega 6 (kyselina linolová) a omega 3 (α -linolenová, γ -linolenová, stearidová) mastných kyselin (3:1), který je navržen jako optimální pro lidskou výživu. Zlepšuje imunitu a je prospěšný pro vlasy, nehty a kožní tkáň. [2, 9, 10, 19, 20]



Obr. 4: Konopná semena, konopná mouka a konopný olej [21]

2.5 Bioaktivní látky

Celkový počet přírodních sloučenin identifikovaných nebo izolovaných z *Cannabis sativa* v posledních několika desetiletích neustále roste. V konopí již bylo identifikováno přibližně 750 sloučenin, jako jsou kanabinoidy, flavonoidy, terpenoidy, stibenoidy, alkaloidy, steroidy, polysacharidy, benzochinony, fenantreny, spiroindany, lignany, mastné kyseliny, cukry, aminokyseliny a proteiny [5, 22].

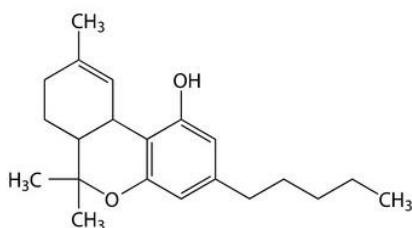
Cannabis sativa obsahuje rozmanité bioaktivní sloučeniny, které jsou slibné pro topickou aplikaci v dermatologii nebo jako kosmetické přísady. Za prvé: kvůli vysokému obsahu kanabinoidů, které mohou modulovat různé zánětlivé stavy a imunitní odpovědi prostřednictvím endokanabinoidního systému. Za druhé: díky konopnému oleji, který má blahodárné vlastnosti pro pokožku a za třetí: kvůli rozmanitosti minoritních bioaktivních látek, jako jsou terpeny, flavonoidy, karotenoidy, fytoosteroly [2].

Chemické složení konopí se velmi liší v závislosti na mnoha faktorech, jako je rok sklizně, podmínky prostředí nebo různé části rostlin. Jedním z nejdůležitějších faktorů, který ovlivňuje

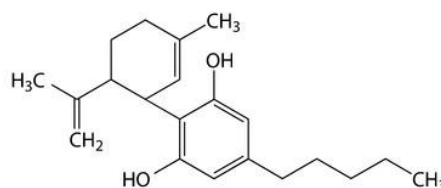
nutriční profil a profil sekundárních metabolitů v konopí, je genetická diverzita mezi rostlinami [23].

2.5.1 Kanabinoidy

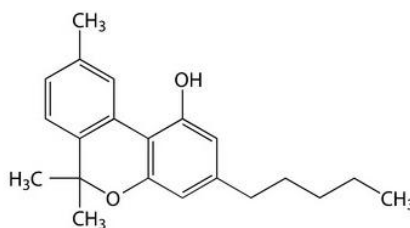
Kanabinoidy jsou hlavní bioaktivní sloučeniny v *C. sativa*. Lze je běžně rozdělit do tří typů: endokanabinoidy, fytoKANABINOIDY a syntetické kanabinoidy. Existuje téměř 200 kanabinoidů z čerstvých listů, jenž jsou odvozeny od kyseliny kanabigerolové a liší se pouze tím, jak je tento prekurzor cyklizován. Mezi tři hlavní kanabinoidy v *C. sativa* patří tetrahydrokanabinol (THC), kanabidiol (CBD) a kanabinol (CBN) (Obr. 5). Celkově jsou kanabinoidy, zejména THC a CBD nejvíce studovanými bioaktivními sloučeninami [5].



Tetrahydrokanabinol (THC)



Kanabidiol (CBD)

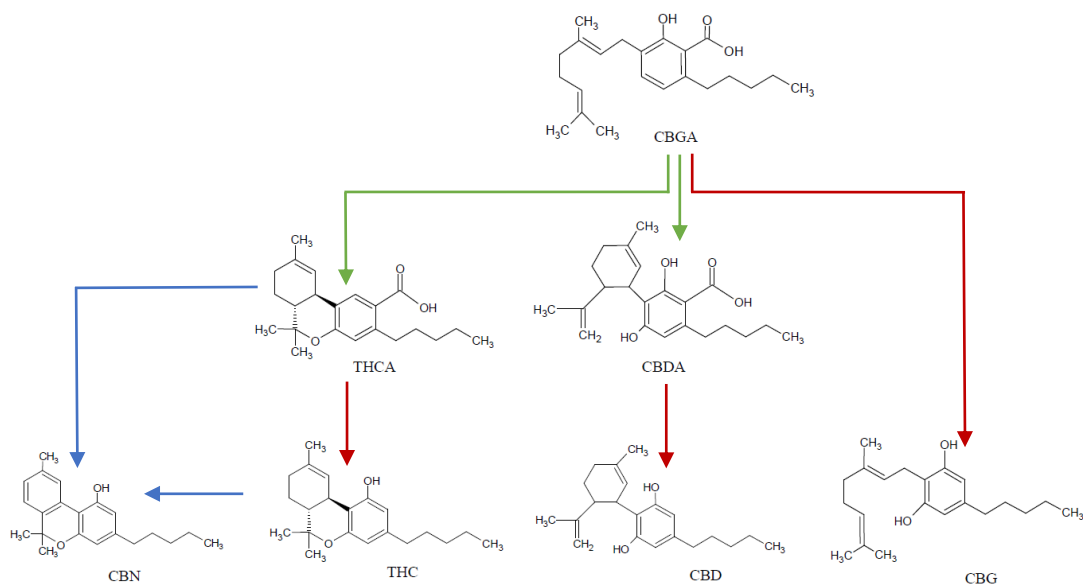


Kanabinol (CBN)

Obr. 5: Strukturální vzorce hlavních kanabinoidů [24]

Kromě CBD a THC je dalším kanabinoidem běžně se vyskytujícím v konopí kanabigerol (CBG). Jedná se o relativně neznámý nepsychoaktivní fytoKANABINOID s antibakteriální aktivitou. FytoKANABINOIDY jsou přirozeně syntetizovány ve žláznatých trichomech samičích květenstvích. FytoKANABINOIDY jsou strukturálně homogenní třídou monoterpenoidů a jsou syntetizovány ve své kyselé formě. Dále do této skupiny řadíme kanabinol (CBN). Jedná se o minoritní složku v čerstvém rostlinném materiálu a je výsledkem oxidace THC [5, 8, 25].

Kanabinoidy jsou produkovány ve stoncích, listech a květech rostoucích rostlin v jejich karboxylované formě (kyselina tetrahydrokanabinolová (THCA), kyselina kanabidiolová (CBDA) a kyselina kanabigerolová (CBGA)), jak je znázorněno na Obr. 6. Předpokládá se, že kanabinoidní kyseliny mají určité zajímavé vlastnosti, zejména CBDA, ale nebyly rozsáhle studovány a jsou obecně považovány za neaktivní formy kanabinoidů, které vyžadují proces dekarboxylace, aby byly převedeny na žádanější a stabilnější neutrální analogy, které nabízejí lepší biologickou aktivitu [25].

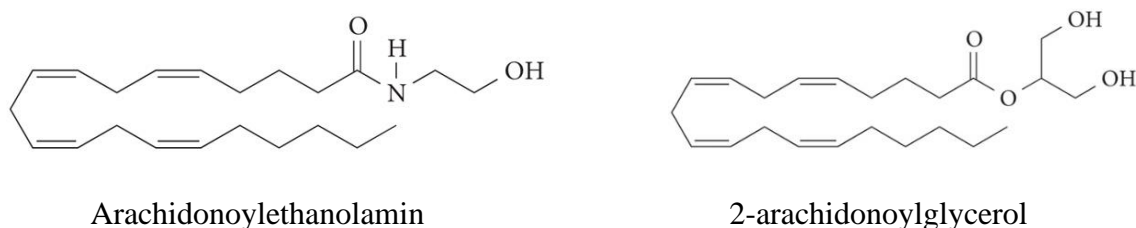


Obr. 6: Zjednodušená syntetická cesta kanabinoidů: dekarboxylace, biosyntéza a oxidační reakce [25]

Bylo zjištěno, že obsah kanabinoidů je rozdílně distribuován v částech rostlin. Nejvyšší procento obsahují sekreční buňky uvnitř žláznatých trichomů. Vysoké koncentrace jsou v neopylených samičích květech a nejnižší obsahy kanabinoidů jsou ve stonku. V kořenech ani semenech nebyly nalezeny žádné kanabinoidy. Přítomnost THC v produktech z konopných semen je převážně výsledkem vnějšího kontaktu slupky semen s pryskyřicemi obsahujícími kanabinoidy v listech a květech. Nejvyššího výnosu kanabinoidů je dosaženo, pokud jsou pěstovány bez samčích rostlin, aby se zabránilo opylení a tvorbě semen [17].

Květy obsahují cenné fytoKANABINOIDY, které jsou jedinečné pro rostlinu. Dosud bylo izolováno celkem 104 fytoKANABINOIDY. Všechny průmyslové odrůdy obsahují THC, CBD a další kanabinoidy, ačkoliv koncentrace v některých odrůdách jsou velmi nízké, až nedetekovatelné. V severních zeměpisných šířkách má průmyslové konopí obzvláště vysoký obsah CBD a nízký obsah THC. CBD lze detekovat v relativně nízkém množství i v konopném oleji. Je to způsobeno tím, že produkce a skladování CBD a THC jsou ve žláznových strukturách rostliny. Široký rozsah zjištěného CBD je primárně způsoben množstvím pryskyřice zadržené v obalu semene během zpracování [10, 22].

Endokanabinoidy jsou neurotransmitery odvozené od mastných kyselin, které působí jako signální molekuly koordinující mezibuněčnou komunikaci napříč všemi fyziologickými systémy. Dva nejvíce studované endokanabinoidy jsou anandamid, známý jako N-arachidonylethanolamin (AEA) a 2-arachidonoylglycerol (2-AG) (Obr. 7) [10].



Obr. 7: Strukturální vzorce endokanabinoidů [26]

2.5.5 Primární metabolity konopí

Technické konopí obsahuje i velké množství primárních metabolitů, kam zařazujeme aminokyseliny, mastné kyseliny, vitamíny, cukry a bílkoviny.

Vysoký obsah sacharidů v biomase konopí z něj činí potenciálního kandidáta na bioenergetickou plodinu pro výrobu lignocelulóзовých biopaliv. Čerstvá konopná vlákna obsahují celulózu (55 %), pektické polysacharidy (18 %), hemicelulózu (16 %), lignin (4 %) [31].

Mastné kyseliny mají vysokou nutriční hodnotu. Jedná se o třídu molekul tvořenou řetězcem atomů uhlíku vázaných s atomy vodíku a s funkční karboxylovou skupinou připojenou k terminálnímu konci. Právě tato funkční skupina se účastní chemických reakcí, které umožňují mastným kyselinám plnit jejich fyziologické role. Fyziologické role zahrnují poskytování izolace, ukládání a poskytování energie buňkám v nepřítomnosti glukózy, poskytování cholesterolu pro produkci hormonů a intracelulárních membrán. Tyto membrány tvoří stavební bloky glykolipidů a fosfolipidů, které tvoří buněčnou membránu a transportují vitamíny rozpustné v tucích a modifikují proteiny. Konopný olej se vyznačuje vysokým obsahem esenciálních mastných kyselin, jak již bylo psáno v kapitole 2.4. Další mastné kyseliny, které nalezneme v konopí, jsou například kyselina kapronová, kaprylová, myristová, palmitolejová, palmitová, stearová a další. Ve srovnání s jinými oleji, jako je řepkový, slunečnicový a sójový, pouze konopný olej poskytuje optimální poměr (3:1) omega 6 a omega 3 mastných kyselin [14, 29].

Aminokyseliny jsou stavební kameny bílkovin, které se podílejí na mnoha biologických funkcích v těle, včetně produkce energie, metabolismu tuků, metabolismu svalů a mnoha dalších. Konopná semena obsahují esenciální aminokyseliny (histidin, isoleucin, leucin, lysin, methionin, fenylalanin, threonin a valin). Esenciální aminokyseliny jsou definovány jako aminokyseliny, které si naše tělo nedokáže syntetizovat a musí je získat potravou. Předpokládá se, že aminokyseliny mohou být nejvíce koncentrované v listech konopí [29].

Peptidy jsou sekvence 2–20 aminokyselinových zbytků, jež jsou v původním proteinu neaktivní. Nicméně po procesu hydrolýzy se ukázalo, že mají četné příznivé účinky na zdraví. Proces hydrolýzy je možné provádět buď chemickými, nebo enzymatickými metodami. U enzymatické hydrolýzy jsou pro tvorbu bioaktivních peptidů nejpoužívanější enzymy pepsin, pankreatin, trypsin, papain a alkaláza [13].

Protein z konopných semen je v rostlinné říši jedinečný. Obsahuje asi 25–30 % bílkovin v závislosti na faktorech prostředí a v současnosti budí velký zájem jako zdroj rostlinných proteinových izolátů. Konopné semeno obsahuje především zásobní proteiny, globulin a albumin, přičemž převládají globuliny. Mezi globuliny je nejhojnější edestin (67–75 %). Albumin a edestin jsou bílkoviny bohaté na methionin a arginin. Díky vysokému obsahu argininu je protein z konopných semen obzvláště cenný jako nutriční složka pro přípravu potravin nebo doplňků stravy, které zlepšují kardiovaskulární zdraví, protože arginin je prekurzorem oxidu dusnatého, což zlepšuje průtok krve a přispívá k udržení normálního krevního tlaku. Obsah bílkovin je u konopných semen vyšší než u semen chia (13 %), quino (16 %), rýže (8 %) nebo pšenice (14 %), ale nižší než u jiných druhů zeleniny, jako jsou semena sóji (38–42 %) [9, 13, 29].

2.6 Kosmetické výrobky

Kosmetické výrobky jsou definovány v evropském nařízení (ES) č. 1223/2009 jako „jakákoliv látka nebo směs určená ke kontaktu s vnějšími částmi lidského těla (epidermis, vlasy, nehty, rty a vnější pohlavní orgány) s cílem výlučně nebo převážně je čistit, parfémovat, měnit jejich vzhled, chránit je, udržovat v dobrém stavu nebo korigovat tělesné pachy“ [32].

2.6.1 Emulze

Z řady kosmetických přípravků je asi nejpoužívanější formou emulze. Emulze jsou koloidní disperze tvořené ze dvou nebo více nemísitelných materiálů, ve kterých je jeden materiál (nespojité/vnitřní fáze) suspendován nebo dispergován v jiném materiálu (kontinuální/vnější fáze) v oddělených kapičkách [33, 34].

Podle International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) je emulze definována jako kapičky kapaliny a/nebo tekuté krystaly rozptýlené v kapalině. Emulze se připravují rozptýlením vnitřní fáze ve vnější fázi. Emulze mohou být buď typu voda v oleji (V/O), nebo olej ve vodě (O/V). Pokud je vnitřní fáze lipofilní dispergována ve vnější hydrofilní vodné fázi, získá se emulze typu olej ve vodě (O/V). Na druhé straně existují emulze voda v oleji (V/O), kde je hydrofilní vodná fáze dispergována v kontinuální lipofilní fázi. Vedle dvou základních typů emulzí existují i různé typy přechodových fází, které se nazývají směsné emulze [34, 35].

Způsoby výroby emulzí rozdělujeme podle různých kritérií. Běžné rozdělení výroby emulzní kosmetiky je na tři technologické operace: emulgace, homogenizace a egalizace. V první fázi (emulgace) se vyrábí předemulze, což je počáteční smíchání vodné a olejové fáze za vyšší teploty. Ve druhé fázi probíhá proces zmenšování původně vytvořených částic a v poslední fázi probíhá proces míchání, kdy úhel míchadla je jiný než osa nádoby. Při výrobě emulzí se používají povrchově aktivní látky zvané emulgátory ke zpomalení procesu oddělování nemísitelných fází. Také se emulgátory používají na stabilitu emulze. Všechny emulze jsou ze své podstaty nestabilní s výjimkou některých spontánně se tvořících mikroemulzí [33, 35].

Kromě emulgátorů se do kosmetických emulzí přidávají další typy přísad jako například změkčovadla, která zlepšují senzorické vlastnosti emulzí a mají za následek lepší roztírání na pokožku. Další přidávanou přísadou jsou hydratační a zvlhčující látky, které zvyšují a kontrolují stav hydratace pokožky. V případě potřeby se přidávají činidla zvyšující viskozitu, aby se zvýšila viskozita vnější fáze. Dále se mohou přidávat aktivní látky nebo konzervanty, které zabraňují růstu mikrobů, zejména v emulzi O/V. Můžeme také přidat parfémy a barviva pro estetické účely [34].

2.6.2 Surfaktanty

Surfaktant neboli tenzid je zkrácenou formou termínu povrchově aktivního činidla, který má dvojí charakteristiku – jsou amfifilní, tedy současně hydrofilní a hydrofobní. Sám o sobě surfaktant naznačuje povrchově aktivní povahu těchto dvou tříd a jejich tendenci adsorbovat se na rozhraní. Polární část vykazuje silnou afinitu k polárním rozpouštědlům a často se nazývá hydrofilní část. Apolární část se nazývá hydrofobní nebo lipofilní, která přitahuje olej [36].

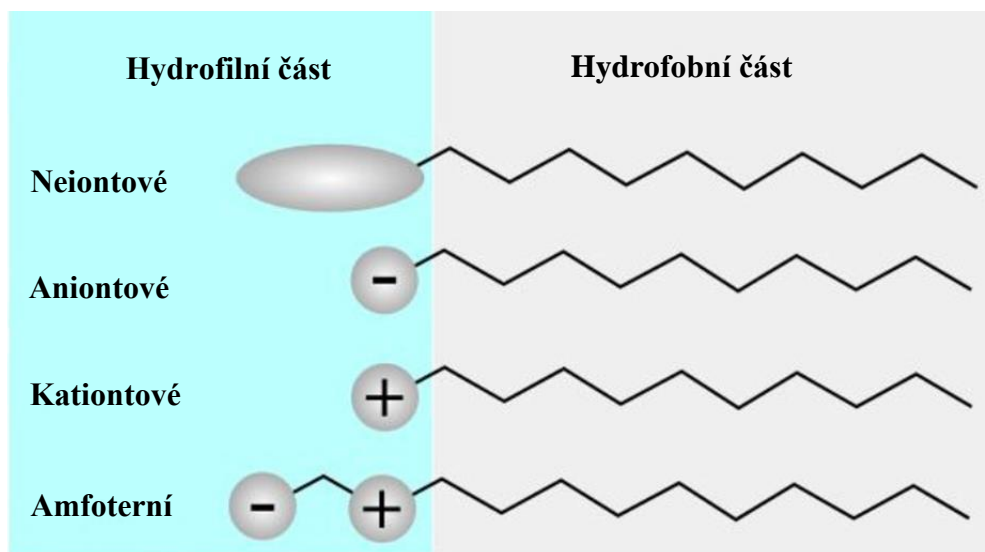
Surfaktanty lze rozdělit do čtyř kategorií: aniontové, kationtové, amfoterní a neiontové, jak můžeme vidět na Obr. 9. Aniontové surfaktanty vedou po rozpuštění ve vodě ke vzniku záporně nabitého iontu surfaktantu. Aniontové surfaktanty jsou nejrozšířenější v přípravcích na praní, mytí nádobí a v šamponech, protože mají vynikající čistící vlastnosti. Jsou relativně netoxické

a potenciál rozpustnosti surfaktantu ve vodě je určen přítomností dvojných vazeb mezi uhlíky v hlavním řetězci [36].

U kationtových surfaktantů je povrchově aktivní část molekuly nabitá kladně. Jsou dobrými emulgátory, a zvláště užitečné jsou v dezinfekčních prostředcích na ruce. Jsou přitahovány k místům s negativním nábojem a mohou se na tato místa navázat, čímž poskytnou měkký a pohodlný pocit, díky kterému se často používají do aviváže. Mají významný mikrobicidní účinek a již ve velmi nízkých koncentracích potlačují respiraci buněk a usmrcují bakterie, plísňe, kvasinky. V kosmetice se s kationaktivními látkami setkáváme zejména u kondicionérů a jsou nezbytnou součástí laků na vlasy [35, 36].

Amfoterní surfaktanty mají kationtová i aniontová centra připojená ke stejné molekule. Jsou méně běžná než ostatní surfaktanty. Jsou velmi jemné, díky čemuž jsou vhodné pro použití v prostředcích osobní péče a čistících prostředcích pro domácnost. Jsou kompatibilní s ostatními kategoriemi surfaktantů. Také mají vynikající dermatologické vlastnosti a často se používají v šamponech [36].

Neiontové surfaktanty jsou takové, které ve vodném roztoku neionizují a jsou díky své hydrofilní skupině nedisociovatelného typu. Nemají elektrický náboj a jsou výbornými odstraňovači mastnoty, čímž mají široké uplatnění v pracích prostředcích a domácích čistících prostředcích [36].



Obr. 9: Rozdělení surfaktantů – upraveno [36]

2.6.3 Konzervační látky

Konzervační látka je takové chemické činidlo, které za daných podmínek zabraňuje růstu, přežívání nebo množení mikroorganismů, jako jsou bakterie, kvasinky a plísňe v kosmetickém výrobku. Konzervační látky mají bakteriostatickou nebo baktericidní aktivitu v závislosti na jejich účinku na mikroorganismy. [35, 37]

2.7 Vlasová kosmetika

Vlasy jsou důležitou součástí našeho tělesného vzhledu. Jsou jednou z mála fyzických vlastností, které můžeme změnit a manipulovat s nimi. Vlasová kosmetika se široce používá ke změně fyzikálních i mechanických vlastností vlasů a je navržena pouze k ovlivnění

povrchového vzhledu vlasů. Dospělý lidský vlas je široký asi 20–180 μm a obecně dorůstá délky přibližně 90 cm. [38–40]

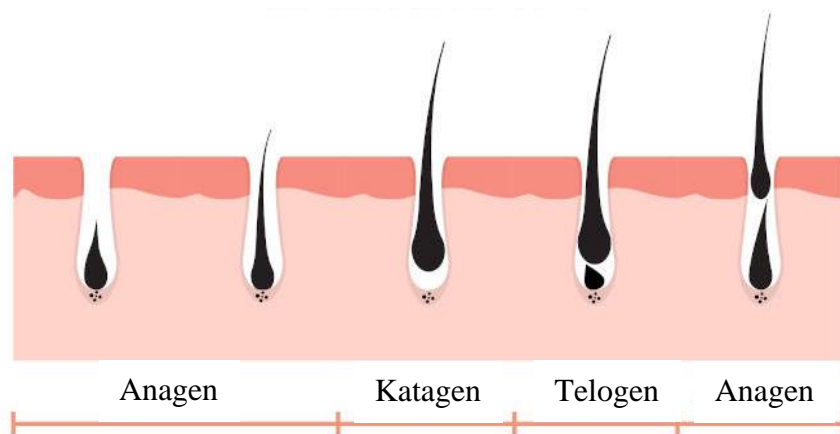
2.7.1 Stavba vlasu

Ve zjednodušeném pohledu lze vlas rozdělit do dvou struktur: fotikula a vlasový stvol. Fotikula je pór, ze kterého každý vlas vyrůstá a který obklopuje kořen a pramen vlasu. Protože se vlasová kosmetika zabývá povrchovými úpravami, bude zde zmiňována stavba převážně vlasového stvolu. Vlasový stvol je složen zejména z keratinového proteinu. V závislosti na typu vlasů může tento protein tvořit 65–95 % hmotnosti vlasů. Vlasový stvol je uspořádán do tří hlavních oblastí: kutikula, kůra a dřev [41].

Kutikula je nejbližší vrstva. Jedná se o vnější ochrannou vrstvu, která má hladký vzhled, umožňuje odraz světla a omezuje tření mezi vlasovými stonky. Je zodpovědná za lesk a strukturu vlasů. Jak vlasy rostou, jsou vystaveny úpravám, které opotřebovávají okraje kutikul, až může dojít k odhalení vnitřku vlasu, kde se nachází kůra. Kůra se skládá ze svazků bílkovin a dodává vlasům vnitřní sílu. Poslední částí je dřev, která prochází středem kůry. Je přítomna pouze v části vlasových vláken a pravděpodobně jde o zbytkovou složku [40, 41].

2.7.2 Růst vlasu

Růst vlasů probíhá cyklicky, ale každý fotikul funguje jako nezávislá jednotka. Buněčný cyklus se skládá ze tří fází: fáze růstu (anagen), fáze regrese (katagen) a fáze odpočinku (telogen) (Obr. 10). Ve fázi aktivního růstu fotikuly se produkuje celý vlasový stvol od špičky ke kořínku. Trvání anagenu určuje délku vlasu a je závislé na pokračující proliferaci a diferenciaci buněk. Délka anagenní fáze se s věkem snižuje a dramaticky se snižuje u jedinců s alopecií. Katagen obvykle trvá asi dva týdny a jedná se o období involuce, které má za následek tvorbu vlasu poté, co mnoho buněk ve vnější kořenové pochvě podstoupí buněčnou smrt (apoptóza). Telogen (klidová fáze) trvá na pokožce hlavy několik měsíců a vlasy v této fázi jsou nakonec vytlačeny rostoucím anagenním vlasovým stvolem. [42, 43]



Obr. 10: Fáze růstu vlasu – upraveno [44]

2.7.3 Konopný hydrolyzát ve vlasové kosmetice

Kosmetické procedury a produkty mohou vyvolávat nevratné změny na vlasech. Pokud dochází k poškození vlasů, ztrácejí pevnost, pružnost a hladkost. Vlasové kosmetické přípravky na bázi proteinů využívají vlastnosti a funkce proteinů, které mohou reagovat s vlasovými vlákny a zlepšovat nebo obnovovat některé jejich vlastnosti. Proteinové přípravky jsou považovány za výjimečné řešení pro vývoj nové vlasové kosmetiky, neboť proteiny, proteinové hydrolyzáty,

peptidy i aminokyseliny mohou vlasům přidat několik funkcí, například posílení, objem, hladkost a úpravu vlasů, a také je chránit před vnějšími vlivy [45].

Proteiny, které hrají dominantní roli téměř ve všech biologických procesech najdeme i na našich vlasech. Jejich hlavní funkcí je enzymová katalýza, přenos malých molekul a iontů, mechanická podpora, ochrana a mnoho dalších prospěšných vlastností. Z toho důvodu je snadno pochopitelný jejich přídavek do kosmetických produktů. Jak již bylo psáno výše, vlas se skládá převážně z vláknitého strukturního proteinu s vysokým obsahem síry, který se nazývá keratin. Označuje se vysokým obsahem cysteinu. Tvorba intramolekulárních a intermolekulárních disulfidických vazeb do značné míry odpovídá za mechanickou pevnost vlasů [45–47].

Proteiny jsou dlouhodobě považovány ze velmi užitečnou složku pro zdravé vlasy, protože mají schopnost vázat vodu. Většina proteinových derivátů, které se používají pro kosmetické účely, se získává z jednoduchých proteinů. Hlavním kritériem pro výběr zdrojů bílkovin je dostupnost a hospodárnost. Aby byly proteiny vhodné pro použití do vlasové kosmetiky (kosmetika na vodní bázi), je nutné je převést do rozpustné formy, která je praktičtější pro účely formulace. Jedná se o hydrolyzu neboli štěpení makromolekul proteinu s následkem porušení některé peptidové vazby. Při rozdělení proteinu na menší části vodou a katalyzátorem se vytvoří ve vodě rozpustné peptidy, které mohou mít pozitivní účinky v kosmetických přípravcích. Hydrolyzovaný protein byl navržen pro ošetření trvalou ondulací, aby se zabránilo poškození vlasových vláken [46].

2.8 Analytické metody

2.8.1 Spektrofotometrie

UV-VIS spektrofotometrie je instrumentální analytická metoda, která využívá optické vlastnosti látek. Molekuly absorbují záření v UV-VIS oblasti (200–800 nm) a vytvářejí změny množství záření dopadávající na detektor. Během analýzy je sledována interakce molekul se zářením. Látka je možné analyzovat kvalitativně i kvantitativně. U kvalitativní analýzy se porovnávají spektra analyzovaných látek se spektry standardů. Kvantitativní analýzu popisuje Lambert-Beerův zákon (1), který říká, že absorbance (A) je přímo úměrná koncentraci absorbující látky (c), molárnímu absorpčnímu koeficientu (ε) a tloušťce absorbující vrstvy (l) [48].

$$A = c \cdot \varepsilon \cdot l \quad (1)$$

Aby byl světelný zdroj vhodný, musí generovat paprsek záření s dostatečným výkonem pro snadnou detekci. Nejčastější zdroj záření se využívá wolframová, halogenová žárovka nebo deuteriová výbojka. Výběr vlnové délky se provádí pomocí filtrů nebo monochromátorů. Světelné paprsky, které prochází prostorem pro vzorky vstupují do detektoru, což je poslední část spektrofotometru. Nejběžnější detektory jsou fotonásobiče, fotodiody nebo diodového pole. Měřená veličina je absorbance záření při prostupu vzorku [49].

2.8.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie se řadí mezi separační metody. Jedná se o metodu, při které se oddělují složky obsažené ve vzorku. V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. První fáze je stacionární (nepohyblivá) a druhá je mobilní (pohyblivá) [50].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je forma kolonové chromatografie, při níž se za vysokého tlaku čerpá vzorek, který je rozpuštěn v mobilní fázi přes kolonu, ve které je stacionární fáze. Vlastnosti vzorku, rozpouštědla i stacionární fáze určují rychlost jejich průchodu kolonou (retenční čas). Vzorky, které mají nejsilnější interakce se stacionární fází prochází kolonou nejpomaleji, což znamená, že jejich retenční časy jsou vysoké. Naopak vzorky, které vykazují nízkou interakci se stacionární fází se vyznačují krátkými retenčními časy [50].

Separace analytů ve vzorku může být provedena buď izokratickou elucí, u které zůstává složení mobilní fáze stejné, nebo gradientovou elucí, kde se složení mobilní fáze v průběhu podle podmínek podporující disociaci analytu od stacionární fáze mění. Po výstupu z kolony prochází mobilní fáze detektorem. Detektor generuje signál, který souvisí s množstvím analytu vystupujícího z kolony [50].

2.8.3 Analytická centrifuga

Analytická centrifuga je separační metoda, při které se částice ve vzorku oddělují na základě jejich hustoty a odstředivé síly. Je vybavena speciálním optickým systémem pro sledování průběhu sedimentace a ve srovnání s preparativními ultracentrifugacemi se nepoužívá k separačním účelům. V současné době je analytická centrifuga jednou z nevhodnějších a nejušestrannějších metod pro kvantitativní analýzu makromolekul v roztoku. Analytická centrifuga je založená na principu, že částice různých velikostí a hustot sedimentují různou rychlostí. Malé množství vzorku je nadávkováno do kyvety, která je následně umístěna do centrifugy a dochází k odstředění při vysokých otáčkách [51, 52].

2.9 Antimikrobiální testy

Testy antimikrobiální citlivosti se používají k určení, na která konkrétní antibiotika jsou konkrétní bakterie nebo houby citlivé. Výsledky jsou běžně uváděny jako minimální inhibiční koncentrace (MIC), která je klíčovým ukazatelem účinnosti antimikrobiálního činidla a je definována jako koncentrace, při které je za definovaných růstových podmínek zabráněno viditelnému růstu testovaného mikroorganismu. Hodnota MIC slouží jako základ pro posouzení kategorie citlivosti patogenu k danému antibiotiku. Další měřenou hodnotou může být minimální baktericidní koncentrace (MBC), která udává nejnižší koncentraci antimikrobiální látky, která zabije 99,9 % bakterií [53, 54].

2.9.1 Testovací mikroorganismy

Escherichia coli

Escherichia coli (*E. coli*) je gramnegativní všestranná bakterie. Snadno podléhá přirozeným a náhodným genetickým změnám. Běžně se vyskytuje ve střevech lidí a teplotokrevných zvířat. Většina kmenů *E. coli* je neškodná. Do člověka se dostane především konzumací kontaminovaných potravin, jako jsou syrové nebo nedostatečně tepelně upravené mleté masné výrobky, syrové mléko a kontaminovaná syrová zelenina [55, 56].

Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus epidermidis (*S. epidermidis*) je grampozitivní koková bakterie, která tvoří shluky. Jedná se o fakultativního anaeroba. Ve svém přirozeném prostředí, jako je lidská kůže nebo sliznice jsou obvykle neškodné. Je to však oportunní patogen, který může způsobit virulenci (schopnost vyvolat infekci), jakmile napadne lidské tělo prostřednictvím lékařských a protetických zařízení [57].

Cutibacterium acnes

Cutibacterium acnes (*C. acnes*) dříve *Propionibacterium acnes* je členem kožní mikroflóry vyskytující se převážně v oblastech bohatých na mazové žlázy. *C. acnes* je grampozitivní tyčinková bakterie. Je považován za aerotolerantního anaeroba, protože má enzymatické systémy schopné detoxikovat kyslík, což mu umožňuje udržet se na povrchu kůže. Je hlavní komenzální bakterií sídlící na zdravé lidské kůži. Hraje důležitou roli při udržování zdraví kůže, ale také se podílí na patogenezi několika onemocnění a infekcí [58, 59].

Candida glabrata

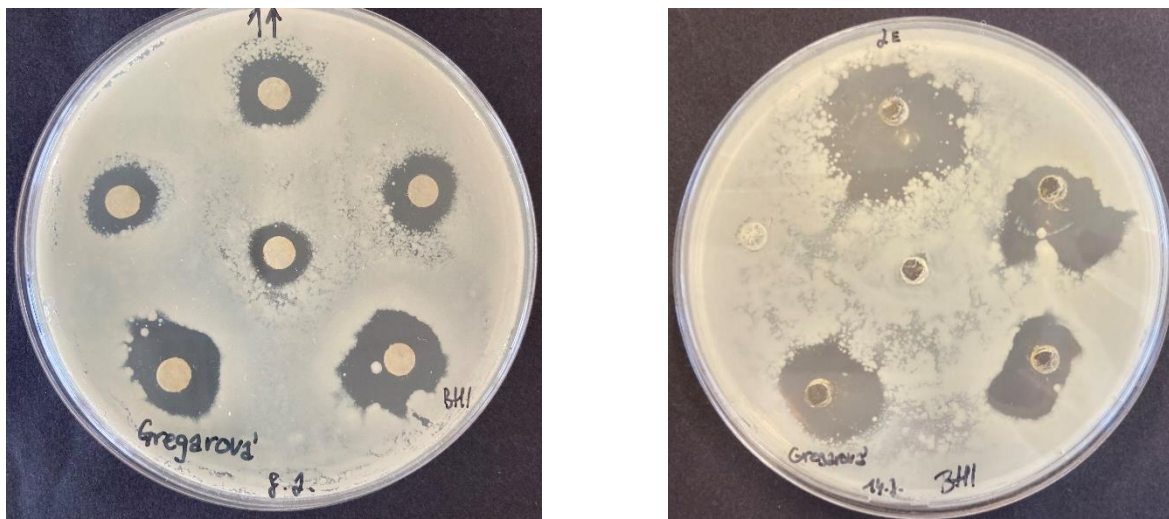
Candida glabrata (*C. glabrata*) je haploidní pupenová kvasinka, která představuje až 29 % všech infekcí krevního řečiště způsobené kandidami. Donedávna byla považována za relativně nepatogenní houbový organismus lidských slizničních tkání. Na rozdíl od jiných druhů *Candida*, *C. glabrata* není dimorfní a existuje jako malá nepohlavní spóra, která za všech podmínek prostředí působí jako patogen. Infekce kvasinou *C. glabrata* je jedna z nejpočetnějších, ovšem je ji obtížné léčit [60, 61].

2.9.2 Difúzní testy

Difúzní metody jsou jednoduché a praktické a byly dobře standardizovány. Diskový difúzní test nabízí mnoho výhod oproti jiným metodám. Patří mezi ně jednoduchost, nízká cena, schopnost testovat obrovské množství mikroorganismů a antimikrobiálních látek a snadnost interpretace výsledků. Také nevyžadují žádné speciální vybavení. Nevýhodou je, že nejsou vhodná ke stanovení MIC, jelikož není možné kvantifikovat množství antimikrobiálního činidla difundovaného do agarového média. Další nevýhodou difúzního testu je chybějící mechanizace nebo automatizace testu [53, 54].

Agarové diskové difúzní testování je oficiální metodou používanou v mnoha klinických mikrobiologických laboratořích pro rutinní testování antimikrobiální citlivosti. Agarové plotny se naočkují standardizovaným inokulem testovaného mikroorganismu. Potom se na povrch agaru umístí kotoučky filtračního papíru, které obsahují testovanou sloučeninu (Obr. 11). Petriho misky se inkubují za vhodných podmínek. Obecně antimikrobiální činidlo difunduje do agaru a inhibuje množení a růst testovaného mikroorganismu a poté se měří průměry inhibičních růstových zón [53].

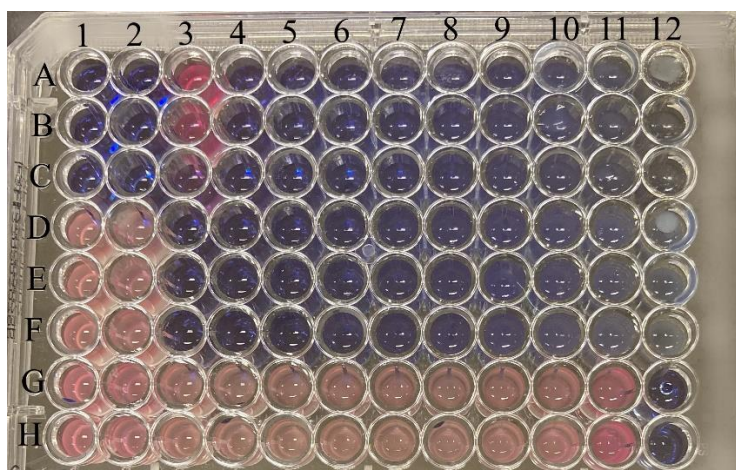
Agarová jamková difúzní metoda se široce používá k hodnocení antimikrobiální aktivity rostlin nebo mikrobiálních extraktů. Podobně jako u postupu používaného u diskové difúzní metody se povrch agarové plotny naočkuje nanesením určitého objemu mikrobiálního inokula po celém povrchu agaru. Poté se do agaru prorazí otvor a do jamky se napipetuje vzorek (Obr. 11). Poté se plotny inkubují za vhodných podmínek v závislosti na testovaném mikroorganismu. Antimikrobiální činidlo difunduje v agarovém médiu a inhibuje růst testovaného mikrobiálního kmene [53].



Obr. 11: Agarový diskový (vlevo) a jamkový (vpravo) difúzní test

2.9.3 Diluční metody

Diluční metody jsou nejvhodnější pro stanovení hodnoty MIC, protože nabízejí možnost stanovit koncentraci testovaného antimikrobiálního činidla v agaru nebo bujónu. Zaznamenaná hodnota MIC se obvykle vyjadřuje v $\mu\text{g/ml}$ nebo mg/l [53].



Obr. 12: Diluční test

Mikro nebo makro diluční bujónová metoda je jednou z nejzákladnějších metod testování antimikrobiální citlivosti. Postup zahrnuje přípravu dvojnásobného ředění antimikrobiálního činidla v kapalném růstovém médiu nadávkovaném do zkumavek za použití mikrotitrační destičky, nejčastěji 96jamkové (Obr. 12). Poté se každá zkumavka nebo jamka naočkuje mikrobiálním inokulem připraveným ve stejném médiu po naředění standardizované mikrobiální suspenze upravené na 0,5 McFarlandovy stupnice. Po dobrém promíchání se naočkované zkumavky nebo 96jamková mikrotitrační destička inkubují za vhodných podmínek v závislosti na testovaném mikroorganismu. MIC je následně detekována pouhým okem. Pro stanovení koncového bodu MIC mohou zobrazovací zařízení usnadnit čtení mikrodilučních testů a záznam výsledků s vysokou schopností rozeznat růst v jamkách. Kromě toho bylo vyvinuto několik kolorimetrických metod založených na použití barvicích činidel. Lze použít například resazurin jako redoxní indikátor. Jedná se o slabě nefluorescenční modré barvivo, které je aktivními bakteriemi redukováno na fluorescenční růžový resofurin [53, 62, 63].

2.10 Stanovení stability

Test stability se provádí v kosmetických a zdravotnických výrobcích. Lze jej definovat jako proces hodnocení produktu, aby se zajistilo, že klíčové vlastnosti produktu se nebudou v průběhu času měnit. Očekává se, že testy stability nebudou zhoršovat fyzikálně-chemickou strukturu produktu a budou vhodné pro mikrobiologické aspekty. Testy stability se provádějí dvěma způsoby: „testy v reálném čase“ a „zrychlené stárnutí“ [34, 64].

Test antimikrobiální konzervační činnosti měří účinnost antimikrobiálních konzervačních látek přidávaných do nesterilních dávkových forem nebo vícedávkových obalů, aby zabránily růstu mikroorganismů, které mohou být náhodně zavedeny během výrobního procesu nebo použití produktu [65].

3 CÍLE PRÁCE

V rámci diplomové práce se zaměřením na možnosti využití konopných extraktů v kosmetice byly řešeny následující úkoly:

1. Literární rešerše – popis rostliny konopí, odrůdy; zpracování technického konopí; frakce a jejich složení
2. Charakterizace vybraných extraktů z několika částí rostliny konopí; optimalizace stanovení biologicky aktivních látek
3. Příprava kosmetických emulzí s obsahem konopných frakcí
4. Stanovení antibakteriálního a antifugálního účinku emulzí s přídavkem konopí

4 PRAKTICKÁ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

ABTS, Sigma Aldrich (SRN)
Agar powder, Himedia (IND)
BHI Broth médium, Himedia (IND)
Capryl/Caprylyl glukosid, Handymade (SK)
Clearthix, Alchemy ingredient (GB)
Coco Glukosid, Handymade (SK)
Cosgard, Handymade (SK)
Decyl glukosid, Handymade (SK)
Dimethylsulfoxid, Lachner (ČR)
Dusitan sodný, p.a., Lachema (ČR)
EcoKons, Alexmo Cosmetics (DE)
E-Leen Green A, Minasolve (BEL)
E-Leen Green C, Minasolve (BEL)
E-Leen Green OR, Minasolve (BEL)
Ethanol 96%, p.a., LachNer (ČR)
Ethanol pro UV-VIS, p.a., LachNer (ČR)
Euxyl K903, Handymade (SK)
Fenoxyethanol, Acetrade (ČR)
Folin-Ciocalteuovo činidlo, Serva (SNR)
Glycerol 99%, Sigma Aldrich (SNR)
Hydroxid sodný, p.a., LachNer (ČR)
Chlorid hlinitý, p.a., LachNer (ČR)
Kanabidiol CBD, Sigma Aldrich (SNR)
Kanabigerol CBG, Sigma Aldrich (SNR)
Kanabichromen CBC, Sigma Aldrich (SNR)
Kanabinol CBN, Sigma Aldrich (SNR)
Katechin, Sigma Aldrich (SNR)
Kyselina citronová, Fichema (ČR)
Kyselina gallová, Sigma Aldrich (SNR)
Lauryl Glukosid, Handymade (SK)
LB médium, Sigma Aldrich (SNR)
Pentylenglykol, Kosmetické suroviny s.r.o. (ČR)
Ricinový olej, Handymade (SK)
SBD médium, Sigma Aldrich (SNR)
Sodium Cocoyl Glutamát, Ajinomoto (JP)
Sodium Cocoyl Glycinát, Ajinomoto (JP)
Sodium Myristoyl Glutamát, Ajinomoto (JP)
Uhličitan sodný, p.a., LachNer (ČR)

4.2 Použité přístroje

Analytické váhy Boeco (SRN)
Analyzátor disperzí – analytická centrifuga, LUMISizer (SRN)
ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (SRN)
Hřídlová míchačka, Maneko (ČR)
Kolona Arion Plus C18 3,0 µm, 4,6 x 150 mm, ARION CHROMATOGRAPHY
Mikrovlnný autokláv Microjet, Rodwell (GB)
Spektrofotometr, Biontech Implen (SRN)
Temperovaná trepačka HeidolphUnimax 1010, Labicom (ČR)
Vortex, TK35, Kartell spa (USA)

4.3 Použité mikroorganismy

Mikroorganismy byly získány z České sbírky mikroorganismů v Brně.

<i>Cutibacterium acnes</i>	CCM 3437
<i>Escheria coli</i>	CCM 3954
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CCM 4418
<i>Candida glabrata</i>	CCM 8270

4.4 Konopné extrakty

Celkem pět konopných extraktů bylo poskytnuto průmyslovým výrobcem k testování. Při výrobě extraktů byla použita dvě extrahovadla, tetrafluorethan (TFE) a ethanol (EtOH), a byly získány extrakty bez obsahu rozpouštědla. Následně byly extrakty námi zředěny dimethylsulfoxidem (DMSO) a pentylenglykolem (PG) v poměru 1:4 a 1:9 (Tabulka 1). Na extrakci byly použity květy a listy. V práci je snaha porovnat rozdíly v obsahu biologicky aktivních látek v extraktech připravených s jiným extrahovadlem nebo v jednotlivých odrůdách.

Tabulka 1: Použité extrakty

Odrůda	Název používaný v práci	Extrahovadlo ¹	WDMSO [g/g]	WPG 1:4 [g/g]	WPG 1:9 [g/g]
Santhica 70	extrakt 1	TFE	6,196	19,901	9,90
Santhica 70	extrakt 2	EtOH	6,188	19,891	9,82
Santhica 70	extrakt 3	TFE	6,197	19,888	7,92
Futura 75	extrakt 4	EtOH	6,205	19,899	10,02
Fibror 79	extrakt 5	EtOH	5,756	19,890	10,01

4.5 Konopný hydrolyzát

Konopný hydrolyzát byl připraven v paralelní bakalářské práci. Bylo rozpuštěno 160 g konopných výlisků z odrůdy Santhica 70 v jednom litru vody. Následně byl připravený hydrolyzát dán do autoklávu. Poté došlo k upravení pH na hodnotu 8,92 pomocí hydroxidu sodného. Po úpravě pH bylo do konopného hydrolyzátu přidáno 10 ml enzymu A a poté byl dán na 24 hodin na trepačku. Následující den došlo ke stáčení hydrolyzátu a odběru konopných výlisků. Následně byl hydrolyzát opět sterilizován. Výsledné pH konopného hydrolyzátu

¹ Koncentrace rozpouštědel není známa, z důvodu interního postupu průmyslového výrobce

bylo 6,54. Hydrolyzát byl následně rozdělen do menších zkumavek a uložen v mrazáku do té doby, než byl přidáván do kosmetických produktů. U konopného hydrolyzátu byl stanoven obsah proteinů (celkového dusíku) Kjeldahlovou metodou. Bylo potvrzeno, že připravený konopný hydrolyzát obsahoval 12,27 % proteinu [66].

4.6 Stanovení antioxidační aktivity

Spektrofotometrické stanovení antioxidační aktivity využívá 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonovou kyselinu (ABTS). Metoda spočívá v hodnocení schopnosti vzorku zhášet kation-radikál $ABTS^{\cdot+}$. Výsledná antiradikálová aktivita vzorku byla srovnána s antiradikálovou aktivitou syntetické standardní látky, v tomto případě derivátu vitamínu E TROLOXu.

Byl připraven standardní roztok TROLOXu o koncentraci 1 mg/ml a byla sestavena kalibrační křivka v rozmezí 50–400 μ l/ml. Zásobní roztok $ABTS^{\cdot+}$ byl zředěn ethanolem pro UV-VIS na absorbanci $0,7 \pm 0,02$ při $\lambda = 734$ nm.

Do kyvety bylo napipetováno 10 μ l destilované vody a přidán 1 ml zředěného $ABTS^{\cdot+}$. Vše bylo řádně promícháno a ihned byla změřena absorbance v čase 0 ($A_t=0$). Do další kyvety bylo napipetováno 10 μ l vhodně naředěného extraktu a byl přidán 1 ml $ABTS^{\cdot+}$. Vzorek byl dobře promíchán a uložen na temné místo na 10 minut. Po 10 minutách byla okamžitě změřena absorbance ($A_t=10$). Výsledné absorbance, které byly použity pro vyhodnocení analýzy, byly získány odečtením hodnoty absorbance vzorku v čase 10 ($A_t=10$) od slepého vzorku v čase 0 ($A_t=0$).

4.7 Stanovení chlorofylů

Stanovení chlorofylu A a B se měří spektrofotometricky při vlnových délkách $\lambda = 645$ a 663 nm. Jako blank bylo využito rozpouštědlo.

Nejprve byly extrakty zředěny ethanolem. Následně byla nastavena na spektrofotometru vlnová délka $\lambda = 645$ nm a proti blanku byl vzorek změřen 3 \times . Poté byla vlnová délka změněna na $\lambda = 663$ nm a opět byl každý vzorek změřen 3 \times .

Koncentrace chlorofylu A (c_a) a chlorofylu B (c_b) byly vypočítány pomocí rovnic (2) a (3).

$$c_a = 12,70 \cdot A_{663} - 2,69 \cdot A_{645} \quad (2)$$

$$c_b = 22,90 \cdot A_{645} - 4,68 \cdot A_{663} \quad (3)$$

4.8 Stanovení fenolických látek

Na stanovení fenolických látek se využívá reakce polyfenolů s Folin-Ciocalteuovým činidlem za vzniku modrého produktu, jehož intenzita byla měřena spektrofotometricky. Jako standard byla pro získání kalibrační křivky použita kyselina gallová. Byly připraveny její roztoky o rozdílné koncentraci v rozmezí 0,05–0,3 mg/ml.

Do zkumavky byl napipetován 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla zředěného vodou v poměru 1:9, 1 ml destilované vody a 100 μ l extraktu. Roztok byl pořádně promíchán a ponechán 5 minut stát. Následně byl přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Opět byl vzorek řádně promíchán na vortexu a ponechán 15 minut stát. Obsah přítomných polyfenolů byl změřen při

vlnové délce $\lambda = 750$ nm proti slepému vzorku. Slepý vzorek byl připraven stejným způsobem, akorát namísto 100 μ l extraktu bylo přidáno 100 μ l destilované vody.

4.9 Stanovení flavonoidů

Ke spektrofotometrickému stanovení celkových flavonoidů se využívá reakce s hlinitou solí a dusitanem sodným. Jako standard je zde použit katechin, ze kterého byla sestrojena kalibrační křivka v rozmezí 0,05–0,3 mg/ml.

Do zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml extraktu, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% dusitanu sodného. Roztok byl promíchán a ponechán 5 minut stát. Následně bylo přidáno 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého. Roztok byl promíchán a opět ponechán 5 minut stát. Nakonec bylo do roztoku přidáno 1,5 ml hydroxidu sodného a 1 ml destilované vody. Vše bylo promícháno a ponecháno 15 minut stát. Obsah flavonoidů byl měřen při vlnové délce $\lambda = 510$ nm proti slepému vzorku. Slepý vzorek byl připraven stejným způsobem, akorát místo 0,5 ml extraktu bylo přidáno 0,5 ml destilované vody.

4.10 Stanovení kanabinoidů pomocí kapalinové chromatografie

Obsahy kanabinoidů v jednotlivých extraktech byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie. Jako mobilní fáze A byl použit acetonitril a mobilní fází B byla Milli-Q voda. Gradientová eluce (Tabulka 2) měla průtok 1 ml/min a jako kolona byla použita kolona Arion Plus C18 3,0 μ m 150 mm \times 4,6 mm. Teplota separace byla 30 °C a byl použit detektor s diodovým polem. Pomocí naměřené kalibrace směsi kanabinoidů (CBG, CBD, CBN, CBC) v rozmezí 12,5–100 mg/ml byla následně dopočítána koncentrace jednotlivých kanabinoidů.

Tabulka 2: Gradientová eluce kanabinoidů

Čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0,0	30	70
0,3	30	70
2,3	100	0
5,3	100	0
8,3	30	70
11,0	30	70

4.11 Příprava kultivačních médií pro mikroorganismy

Pro každý mikroorganismus byla připravena živná média. Složení živných médií je uvedeno v tabulce 3. Média byla smíchána s destilovanou vodou a následně sterilizována. Po vychladnutí byla média připravena k použití.

Tabulka 3: Seznam kultivačních médií pro každý mikroorganismu

Mikroorganismus	Kultivační médium	m sypkého média na 100 ml [g]
<i>Escherichia coli</i>	LB (Lysogeny Broth)	2,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BHI (Brain Geart Infusion)	3,7
<i>Cutibacterium acnes</i>	BHI (Brain Geart Infusion)	3,7
<i>Candida glabrata</i>	SBD (Sabouraud Dextrose Broth)	3,0

4.12 Příprava agaru

Pro přípravu agaru bylo vždy naváženo potřebné množství média a následně bylo přidáno 1,5 g agaru na 100 ml tekutého média. Vše bylo rozpuštěno v destilované vodě a roztok byl sterilizován. Následně byl agar nalit na Petriho misky.

4.13 Antimikrobiální účinek

4.13.1 Agarový difúzní test

Pro 3 mikroorganismy (*S. epidermidis*, *E. coli* a *C. acnes*) byly provedeny agarové difúzní testy pro extrakty rozpuštěné v DMSO a v PG v poměru 1:4 a 1:9. Na připravené agarové misky s konkrétním kultivačním médiem pro každou bakterii bylo nanášeno 50 µl předem narostlé kultury. Pomocí plastové sterilní hokejky byla kultura rozetřena po celé misce. Pro *E. coli* a *S. epidermidis* byly provedeny jak difúzní diskové testy, tak i difúzní jamkové testy. Pro *C. acnes* byly provedeny pouze difúzní jamkové testy

Při difúzních diskových testech bylo na filtrační papírek napipetováno 2 µl vzorku a pomocí sterilní pinzety byly položeny na připravené agarové misky s kulturou. Na difúzní jamkové testy bylo nejprve na Petriho misky s agarem nanášeno 50 µl narostlé kultury a pomocí sterilní plastové hokejky byla kultura rozetřena po celé misce. Následně pomocí sterilní špičky byla do agaru vykrojena jamka, do které bylo vždy napipetováno 5 µl vzorku. Jako kontroly byly u diskových i jamkových testů použity 60% ethanol (pozitivní kontrola), dimethylsulfoxid (DMSO) a pentylenglykol (PG) (kontrola rozpouštědla) a destilovaná voda (negativní kontrola). Všechny vzorky byly prováděny v duplikátech. Po nanášení vzorku byly všechny misky uloženy na 24 hodin do termostatu při teplotě 37 °C. Poté byl vyhodnocen inhibiční účinek.

4.13.2 Bujónový diluční test

Na bujónový diluční test byly využity 96jamkové destičky. Pomocí dilučních testů byly měřeny konopné extrakty rozpuštěné v PG v poměru 1:4, extrakty rozpuštěné v DMSO, konopný hydrolyzát a finální šampon s přísadkou konopného hydrolyzáta a konopného extraktu. Také byly provedeny kontroly čistoty média, antimikrobiální test rozpouštědla (PG, DMSO). Byla provedena i pozitivní kontrola na 60% ethanol a negativní kontrola na čistotu kultury.

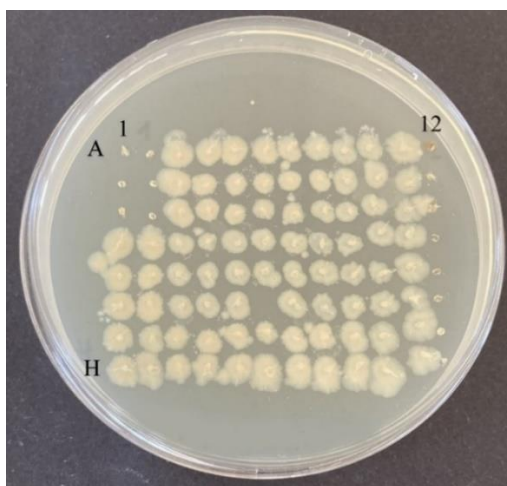
Nejdříve byly 24 hodin dopředu zaočkované mikroorganismy (*S. epidermidis*, *C. acnes*, *C. glabrata*), které se nechaly kultivovat. Následně byl každý mikroorganismus zředěn pomocí čistého média na koncentraci 0,5 MFU (McFarland jednotky) a poté byl zředěn sterilním médiem 2000×.

Nejprve bylo do každé jamky na destičce napipetováno 100 µl sterilního média pro každý mikroorganismus. Do jamek s nejvyšší koncentrací bylo přidáno 50 µl média navíc a poté bylo přidáno 50 µl vzorku. Poté bylo provedeno ředění dvojkovou řadou. Celý obsah (200 µl) byl pipetou promíchán a následně bylo 100 µl přeneseno do další jamky koncentrační řady. Při poslední koncentraci bylo 100 µl odstraněno, aby v každé jamce byl stejný objem. Nakonec bylo do jamek přidáno 100 µl naředěné kultury. Na kontrolu média bylo do jamek napipetováno 200 µl média. Na kontrolu kultury bylo napipetováno 100 µl média a 100 µl kultury a na pozitivní kontrolu bylo do jamek napipetováno 50 µl média, 50 µl 60% ethanolu a 100 µl kultury.

Všechny připravené destičky byly analyzovány pomocí ELISA při vlnové délce $\lambda = 630 \text{ nm}$. Následně byly destičky na 24 hodin uloženy do termostatu při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a po 24 hodinách byla opět změřena absorbance při stejné vlnové délce.

4.13.3 Ověření schopnosti buněk tvořit kolonie

Pro každý mikroorganismus (*S. epidermidis*, *C. acnes*, *C. glabrata*) byly připraveny agarové Petriho misky. Vytvořená papírová šablona, která měla uspořádání jako 96jamková destička, byla umístěna na spodní stranu misky. Po inkubaci a změření na ELISA po 24 hodinách byla směs v každé jamce zaočkovaná na agarové misky tak, jak byly umístěny v destičce pomocí sterilní kličky. Hotové Petriho misky byly umístěny do termostatu na 24 hodin při $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Druhý den bylo vizuálně vyhodnoceno, zda některé jamky obsahují živé mikroorganismy (Obr. 13).



Obr. 13: Ověření schopnosti kultury tvořit kolonie

4.13.4 Schopnost přežití mikroorganismů – stanovení pomocí resazurinu

Po inkubaci 24 hodin v termostatu, druhém změření na ELISA a vytvoření Petriho misek na ověření schopnosti buněk tvořit kolonie bylo do každé jamky přidáno $20 \mu\text{l}$ resazurinu o koncentraci $0,15 \text{ mg/ml}$. Resazurin je látka, která je schopna změnit barvu při životaschopnosti kultury. Modrá barva (negativní výsledek) znamená, že kultura v jamkách nebyla metabolicky aktivní. Růžová barva (pozitivní výsledek) znamená životaschopnost kultury (metabolickou aktivitu). Po nanesení se destička nechala 30 minut inkubovat při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a následně byla změřena dvakrát absorbance při vlnové délce $\lambda = 570 \text{ nm}$ (Obr. 14).



Obr. 14: Resazurinový test

4.14 Analytická centrifuga

Dva zkušební šampóny (jeden s konopným hydrolyzátem a jeden bez konopného hydrolyzátu) a finální verze šamponu byly dány na analytickou centrifugu a sledovala se stabilita kosmetického produktu. Každým šamponem byly naplněny dvě kyvety pomocí injekční stříkačky s jehlou po rysku. Vzorky byly dány do analytické centrifugy na 17 hodin při teplotě 25 °C na 4000 ot/min.

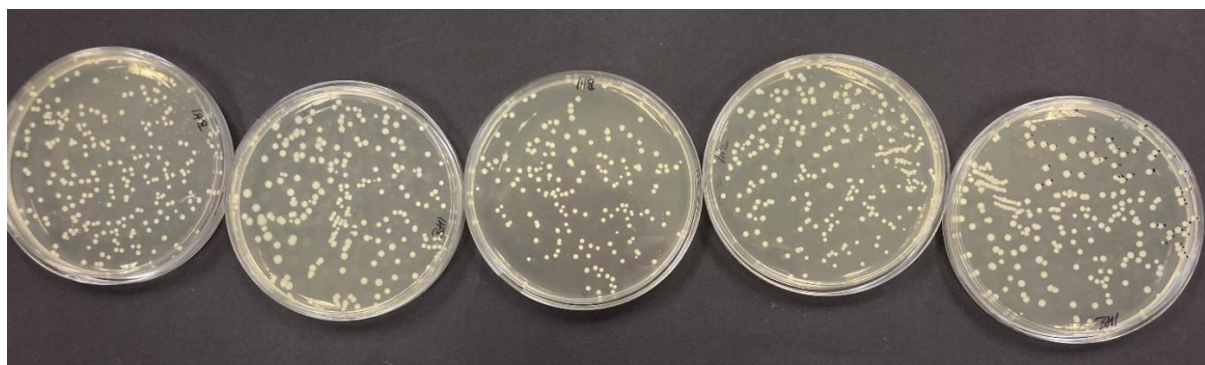
4.15 Zátěžový test

Zátěžový test byl proveden s mikroorganismy *E. coli*, *S. epidermidis* a *C. glabrata*, které byly zaočkovány do konopného hydrolyzátu s konzervantem. Byl sledován úbytek anebo nárůst mikroorganismů v čase, čímž se pozorovala účinnost konzervačního systému produktu.

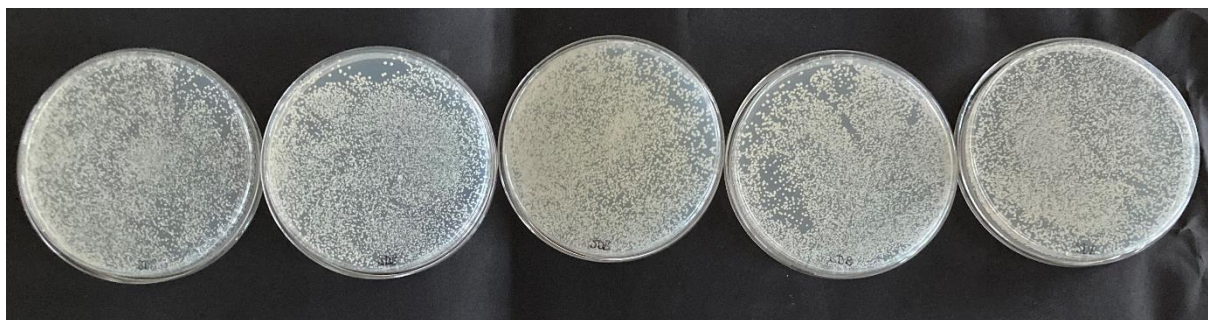
4.15.1 Stanovení přesné koncentrace mikroorganismů

Nejprve byla zjištěna přesná koncentrace mikroorganismu pomocí desítkového ředění. Den před stanovením byly zaočkovány mikroorganismy do tekutého média a ponechány v termostatu na 24 hodin při teplotě 37 °C. Z narostlé kultury byla do sterilní zkumavky naředěna koncentrace 0,5 MFU. Poté bylo provedeno desítkové ředění pomocí sterilní destilované vody. Na Petriho misky bylo naneseno 100 μl ze zkumavek s ředěním 10^{-4} , 10^{-5} a 10^{-6} a pomocí sterilní hokejky bylo rozetřeno na misky s agarem. Od každého ředění bylo pro každý mikroorganismus připraveno 5 misek. Po zaschnutí kultury byly misky dány do termostatu na 24 hodin při 37 °C.

Následující den byly na každé misce spočítány narostlé kolonie a byl vypočítán průměr. Pro *S. epidermidis* byly kolonie počítány na miskách s ředěním 10^{-4} a průměr činil 279 KTJ na 100 μl (Obr. 15). Pro *E. coli* byly kolonie také počítány na miskách s ředěním 10^{-4} a průměr činil 374 KTJ na 100 μl. U *C. glabrata* byly kolonie počítány na miskách s ředěním 10^{-4} a průměr činil 6 KTJ na 100 μl. Jelikož u *C. glabrata* se na misce s koncentrací 10^{-4} vytvořilo málo kolonií, byla poté nanesena na Petriho misky koncentrace 10^{-1} (Obr. 16). Na koncentraci 10^{-1} bylo ale mnoho kolonií, které nešlo snadno spočítat Proto byly na každé misce vytvořeny tři čtverce o obsahu 1cm². Hodnoty ze čtverců byly zprůměrovány a byl spočítán obsah kolonií na každé misce. Zde mohlo dojít k odchylce, protože šlo o další pasáž, kde mohl mikroorganismus vykazovat jinou rychlost množení.



Obr. 15: Petriho misky s agarem s naředěnou kulturou *S. epidermidis* 10^{-4}



Obr. 16: Petriho misky s agarem s naředěnou kulturou *C. glabrata* 10^{-1}

Bylo testováno 7 různých konzervantů v konopném hydrolyzátu v účinnosti konzervace vůči každému ze tří mikroorganismů. Byl navážen konopný hydrolyzát s konzervantem o celkové hmotnosti 5 g. Do sady zkumavek s testovaným vzorkem pro *S. epidermidis* bylo od každé přidáno 450 μ l kultury s ředěním 10^{-4} . Do sady vzorek pro *E. coli* bylo do každé přidáno 180 μ l kultury s ředěním 10^{-4} a do třetí sady vzorek pro *C. glabrata* bylo do každé přidáno 26 μ l kultury s ředěním 10^{-1} . Tabulka 4 znázorňuje, kolik bylo přidáno kolonií do jednotlivých hydrolyzátů s konzervanty. Všechny vzorky byly uchovány při laboratorní teplotě, aby co nejvíce odpovídaly podmínkám, při kterých jsou kosmetické přípravky používány.

Tabulka 4: Počet kolonií přidáno do konopného hydrolyzátu s konzervantem

Mikroorganismus	Ředění	m (naředěné kultury) [g]	m (celého produktu) [g]	Počet kolonií dáno do produktu [KTJ]
<i>S. epidermidis</i>	10^{-4}	0,45	5,45	1254
<i>E. coli</i>	10^{-4}	0,18	5,18	674
<i>C. glabrata</i>	10^{-1}	0,026	5,026	3286

4.15.2 Vyhodnocení zátěžového testu

Při zátěžovém testu byly provedeny celkem tři odběry, a to po 7, 14 a 32 dnech. Při každém odběru byly vzorky hydrolyzátu s kulturou vortexovány a následně bylo odebráno určité množství, které bylo dáno na Petriho misku s médiem a rozetřeno sterilní hokejkou. Po zaschnutí byly Petriho misky uloženy na 72 hodin do termostatu při teplotě 37 °C. Po uplynutí 72 hodin byly na každé misce spočítány narostlé kolonie mikroorganismu. Při vyhodnocování byly napočítané kolonie vztažené na 1 g vzorku podle rovnice (4).

$$c [KTJ/g] = \frac{\text{počet kolonií na misce [KTJ]}}{\text{množství dané na misku [g]}} \quad (4)$$

4.16 Využití konopí v kosmetice

Byl vyroben šampon na vlasy s přidávkou konopného hydrolyzátu a konopných extraktů. Konopný hydrolyzát byl přidáván převážně pro svůj obsah proteinů, abychom zjistili, jaké účinky mají proteiny na vlasy. Konopné extrakty 2 a 5 byly vybrány, neboť při stanovení biologicky aktivních látek, v nich bylo stanoveno nejvyšší množství. Rozpuštěné v pentylenglykolu byly z toho důvodu, že pentylenglykol je dvojsytný alkohol, který nemá vliv

na dehydrataci pokožky, ale má schopnost vázat vodu. Dobře proniká i do pokožky, čímž do ní dopravuje účinné látky.

4.16.1 Zkouška surfaktantů

Pěnivost šamponu je jednou z podmínek, které by měl šampon splňovat. Proto byl proveden test pěnivosti různých kombinací surfaktantů. Vždy byly do stejné kádinky naváženy kombinace surfaktantů (Tabulka 5) a poté byla přidána voda do stejné celkové hmotnosti 10 gramů. Poté bylo do kádinky vždy umístěno vrtulkové míchadlo a spustilo se míchání vzorku na stejnou rychlost po dobu 30 sekund. Následně bylo pozorováno, která kombinace surfaktantů vytvoří nejvíce pěny.

Tabulka 5: Složení surfaktantů při zkoušce pěnivosti

Zkouška 1	[g]	Zkouška 2	[g]
coco glukosid	1,52	coco glukosid	0,97
lauryl glukosid	1,49	lauryl glukosid	1,03
sodium cocoyl glutamát	0,49	decyl glukosid	1,11
voda	6,50	voda	7,01
Zkouška 3	[g]	Zkouška 4	[g]
coco glukosid	1,53	capryl/caprylyl glukosid	1,51
lauryl glukosid	1,49	coco glukosid	1,55
sodium cocoyl glycinát	1,01	lauryl glukosid	1,52
voda	6,00	voda	5,50
Zkouška 5	[g]	Zkouška 6	[g]
capryl/caprylyl glukosid	1,52	coco glukosid	1,53
coco glukosid	1,55	decyl glukosid	1,02
decyl glukosid	1,53	sodium myristoyl glutamát	0,31
voda	5,51	voda	7,21
Zkouška 7	[g]	Zkouška 8	[g]
amisaft	2,01	capryl/caprylyl glukosid	1,64
coco glukosid	0,30	coco glukosid	1,52
sodium myristoyl glutamát	1,58	sodium cocoyl glycinát	1,00
voda	6,20	voda	6,02
Zkouška 9	[g]	Zkouška 10	[g]
coco glukosid	1,55	coco glukosid	1,54
decyl glukosid	1,52	lauryl glukosid	1,50
sodium cocoyl glycinát	1,01	decyl glukosid	1,56
voda	6,01	voda	5,53

4.16.2 Výroba šamponu na vlasy s přidavkem konopí

Přesné navážky ingrediencí do šamponu jsou v tabulce 6. Do misky byl navážen glycerol a zahušťovadlo clearthix S, které byly spolu pořádně promíchány. Následně byl přidán ricinový olej. Do další misky byly postupně naváženy surfaktanty, které byly kvantitativně převedeny do další kádinky. Následně byla navážena do misky voda s konopným hydrolyzátem a konzervantem, které byly přility do kádinky k surfaktantům. Vodná fáze byla pomalu důkladně promíchána a poté se po částech přilávala ke glycerolu s olejem a směs se neustále míchala. Po homogenizaci byl přidán extrakt 2 a 5 v poměru 1:1, který byl smíchán

s pentylenglykolem v poměru 1:4. Šampon byl poté ponechán přes noc v nádobě, aby klesla pěna a následující den byl naplněn do lahviček (Obr. 17).

Tabulka 6: Složení finálního šamponu na vlasy s konopným proteinem

Složka	INCI	[g]	%
Glycerol	Glycerin	110,05	9,94
Clearthix S	Cellulose Gum, Algin	11,04	1,00
Ricinový olej	Ricinus communis (Castor) Seed Oil	33,15	3,00
Coco glukosid	Coco Glucoside	165,06	14,91
Lauryl glukosid	Lauryl Glucoside	165,04	14,91
Sodium cocoyl glycinát	Sodium Cocoyl Glycinate	11,01	0,99
Konopný hydrolyzát		220,09	19,88
Voda	Aqua	379,57	34,29
Ecokons	Benzyl Alcohol, Cymbopogon Flexuosus Herb Oil, Tocopherol	5,56	0,50
Extrakt 2+5 v PG 1:4		6,27	0,57
Celkem		1106,8	100,00



Obr. 17: Připravený finální šampon zamíchaný (vlevo) a následující den (vpravo)

4.17 Senzorická analýza šampónu s přidavkem konopného hydrolyzátu a extraktu

Senzorické analýzy se zúčastnilo 10 respondentů, kteří po dobu 14 dní testovali připravený šampon s konopným hydrolyzátem a extraktem (Obr. 18). Analýzy se zúčastnili 3 muži a 7 žen. 80 % respondentů bylo věkově mezi 20–30 lety. 20 % respondentů bylo věkově nad 50 let. Tři respondenti mají krátké vlasy. Další tři respondenti mají vlasy po ramena a dalším třem sahají vlasy po prsa. U jednoho respondenta je délka vlasů k pasu.

Během 14 dnů, kdy probíhalo testování, používali respondenti tento produkt na vlasy a zaznamenávali si své poznatky, pozitiva i negativa. Všichni respondenti se drželi pokynů, které jim byly uděleny na začátku testování. Během testovací doby byl udržován kontakt

a v případě nejasností nebo problémů byly okamžitě řešeny. Po uplynutí 14 dnů každý z respondentů na základě svých zkušeností se šamponem vyplnil dotazník, který se zabýval hodnocením připraveného šamponu a jeho vlivu na různé typy vlasů. Následně byly vyhodnoceny výsledky a posouzení, zda měl šampon na vlasy pozitivní účinky.



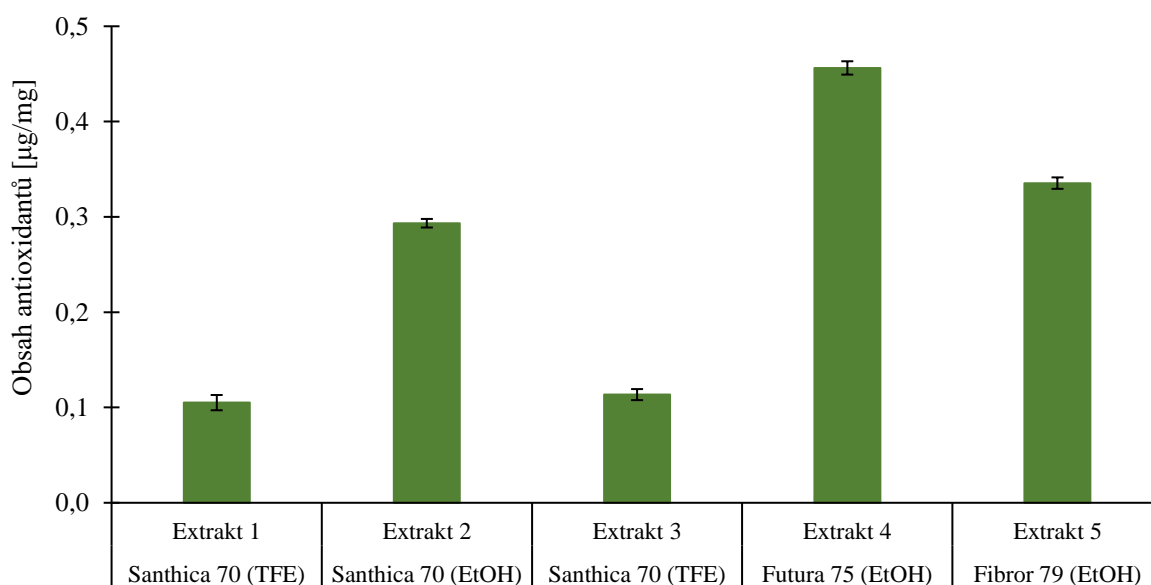
Obr. 18: Finální šampon připravený k testování

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Stanovení antioxidační aktivity

Podle postupu v kapitole 4.6 byl stanoven celkový obsah antioxidantů v jednotlivých konopných extraktech. Koncentrace jednotlivých extraktů byla vypočítána pomocí kalibrační rovnice $A = 0,0014 \cdot c$ (Příloha 1). U všech vzorků, které byly měřeny 3×, byl získán průměr a směrodatná odchylka. Následně byly obsahy přepočítány na 1 mg čistého vzorku.

Jak je vidět na Obr. 19, nejvyšší obsah antioxidantů byl stanoven v extraktu 4 (0,46 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Všechny ethanolové extrakty měly daleko vyšší obsah antioxidantů než tetrafluorethanové extrakty. Co se týče odrůd, nejvíce antioxidantů bylo detekováno v odrůdě Futura 75, následována odrůdou Fibror 79 a nejméně antioxidantů bylo naměřeno v odrůdě Santhica 70. I přesto, že extrakty 1, 2 a 3 pochází ze stejné odrůdy, hraje velkou roli extrahovadlo. Většinou jsou látky s antioxidační aktivitou polární, a tudíž mají vyšší rozpustnost v ethanolu, což je polární rozpouštědlo.



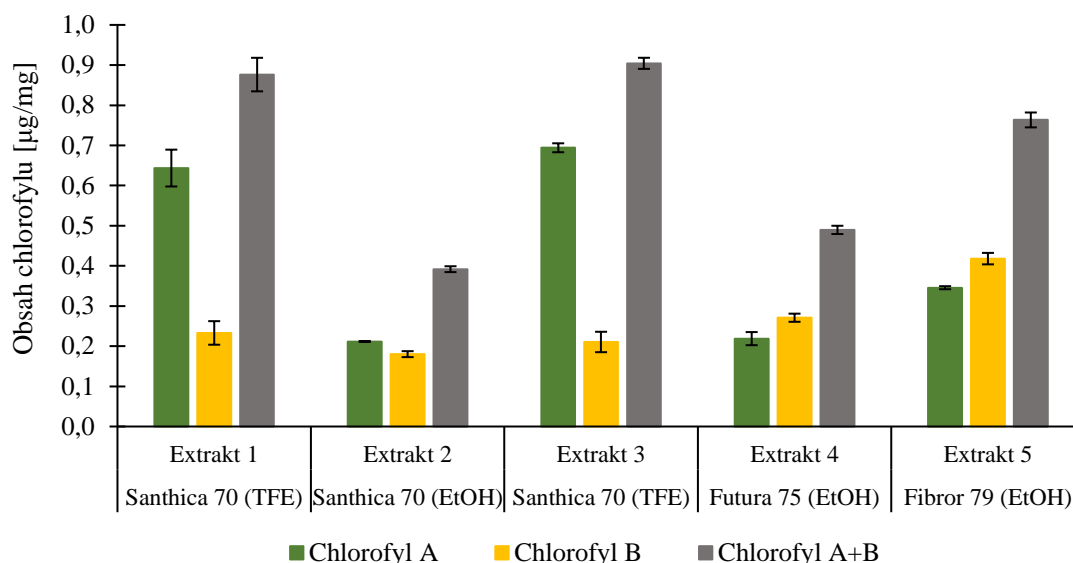
Obr. 19: Obsah antioxidantů v jednotlivých frakcích z konopí

5.2 Stanovení celkových chlorofylů

Ve všech extraktech byl stanoven spektrofotometricky obsah chlorofylů A a B a jejich součet při dvou vlnových délkách. Každý vzorek byl měřen v triplicátech a následně byla každá absorbance dosežena do rovnice v kapitole 4.7, která byla následně zprůměrována. Nakonec byly přepočítány obsahy chlorofylu na 1 mg čistého vzorku.

Obsahy chlorofylů v jednotlivých extraktech jsou zobrazeny na Obr. 20. Nejvíce chlorofylu A obsahoval extrakt 3 (0,69 $\mu\text{g}/\text{mg}$) a extrakt 1 (0,64 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Nejvíce chlorofylu B obsahoval extrakt 5 (0,42 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Naopak nejméně chlorofylu A i B obsahoval extrakt 2 (0,21 $\mu\text{g}/\text{mg}$) a (0,18 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Chlorofyl A obsahuje nepolární methylovou skupinu, která je v chlorofylu B nahrazena polární aldehydovou skupinou, což má za následek jejich rozdílnou rozpustnost. Extrakty rozpuštěné v TFE, který je nepolární, měly vyšší obsah chlorofylu A. Chlorofyl B byl naopak více zastoupený v ethanolových extraktech, neboť ethanol je polární rozpouštědlo. Celkový obsah chlorofylů byl nejnižší v ethanolovém extraktu z odrůdy

Santhica 70. Z ethanolových extraktů bylo nejvíce chlorofylů naměřeno v odrůdě Fibror 79. Následovala odrůda Futura 75 a nejméně bylo detekováno v odrůdě Santhica 70.

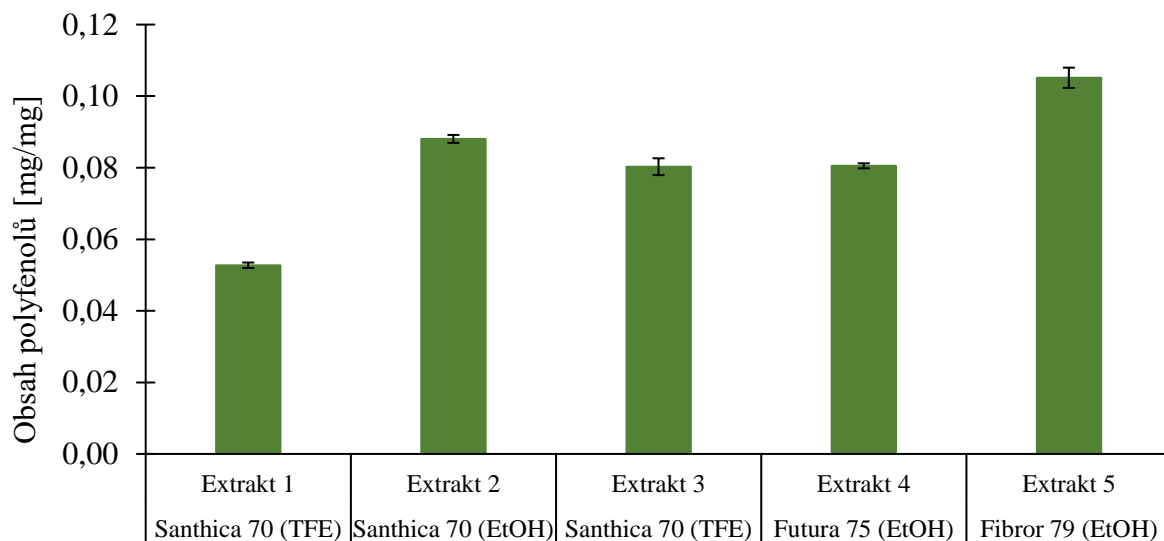


Obr. 20: Obsah chlorofylů v jednotlivých frakcích z konopí

5.3 Stanovení celkových fenolických látek

Stanovení celkových polyfenolů u konopných extraktů probíhalo podle postupu popsaného v kapitole 4.8. Koncentrace byla vypočítána pomocí kalibrační rovnice $A = 2,8525 \cdot c$ (Příloha 2). Všechny extrakty byly měřeny v triplicátech a následně byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Nakonec byly výsledky přepočítány na 1 mg původního vzorku.

Celkový obsah fenolických látek v jednotlivých odrůdách je znázorněn na Obr. 21. Největší množství fenolických látek bylo naměřeno u extraktu 5 (0,11 mg/mg). Naopak nejmenší množství bylo zjištěno u extraktu 1 (0,053 mg/mg). Polyfenoly jsou polární látky, z toho důvodu ethanolové extrakty obsahovaly větší množství fenolických látek než tetrafluorethanové extrakty. Nejvíce fenolických látek bylo detekováno v odrůdě Fibror 79. Můžeme si všimnout, že v extraktu 4 bylo detekováno podobné množství jako u extraktu 3. Oba extrakty byly ovšem připraveny z jiné odrůdy i jiným extrahovadlem. Z toho důvodu byla odrůda Futura 79 nejméně bohatá na fenolické látky. U celkových fenolů také hodně záleží na tom, v jakém vývoji je rostlina sbírána. Během vývoje květů dochází ke snížení fenolických látek. Právě u tetrafluorethanových extraktů, které byly připravovány ze stejné odrůdy vidíme, že byl rozdílný obsah polyfenolů, protože každý extrakt byl z jiné šarže a pro každou sklizeň mohly být jiné podmínky pěstování.

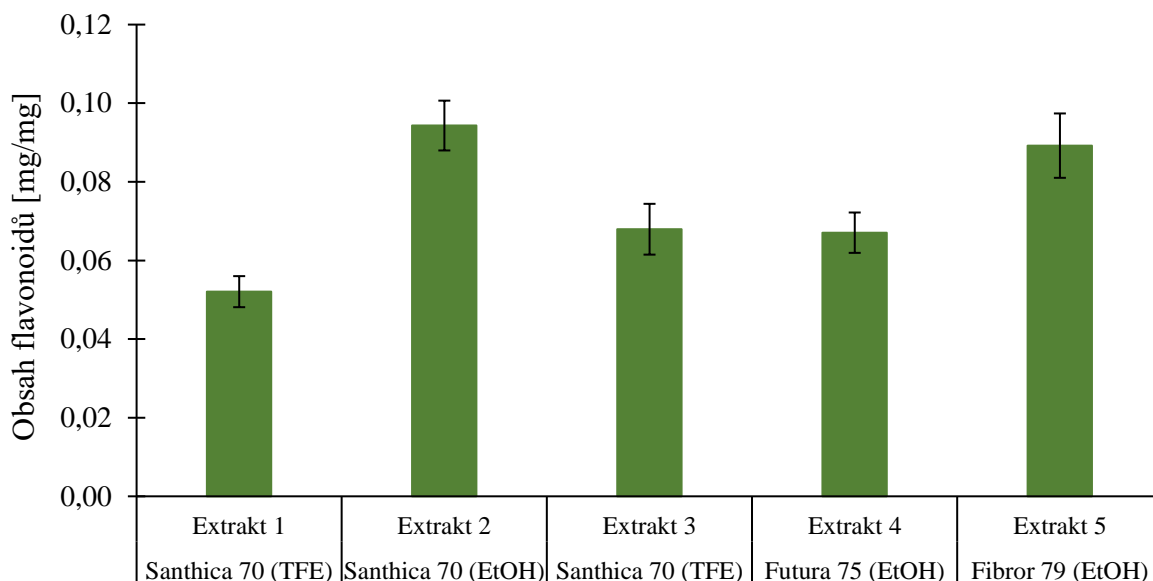


Obr. 21: Celkový obsah fenolických látek v jednotlivých frakcích z konopí

5.4 Stanovení celkových flavonoidů

Stanovení celkových flavonoidů u konopných extraktů probíhalo podle postupu popsaného v kapitole 4.9. Koncentrace byla vypočítána pomocí kalibrační rovnice $A = 3,3631 \cdot c$ (Příloha 3). Všechny extrakty byly měřeny v triplicátech a následně byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Nakonec byly výsledky přepočítány na 1 mg původního vzorku.

Na Obr. 22 vidíme celkový obsah flavonoidů v jednotlivých extraktech. Největší množství flavonoidů bylo naměřeno v extraktu 2 (0,094 mg/mg). Naopak nejmenší množství flavonoidů bylo detekováno v extraktu 1 (0,052 mg/mg). Flavonoidy patří do skupiny fenolických látek a jedná se o polární látky. Z toho důvodu i zde byl vyšší výtěžek u ethanolových extraktů. U extraktu 2 bylo naměřeno větší množství flavonoidů, než je celkový obsah fenolických látek. To může být způsobeno degradací nebo tím, že fenoly obsahují jak polární, tak i nepolární látky a ethanol, jako polární rozpouštědlo, lépe extrahuje polární látky. Také může sehrávat roli i odchylka měření. V porovnání ethanolových extraktů vyrobených z různých odrůd, nejvíce flavonoidů bylo zastoupeno v odrůdě Santhica 70. Následovala odrůda Fibror 79 a nakonec Futura 75, ve které je obsah flavonoidů podobný jako v extraktu 3, který byl vyroben tetrafluorethanovou extrakcí z odrůdy Santhica 70. I zde bylo prokázáno, že velmi záleží na podmínkách pěstování. U extraktů 1 (0,052 mg/mg) a 3 (0,068 mg/mg) byly zjištěné rozdílné obsahy i přesto, že se jedná o stejnou odrůdu konopí.

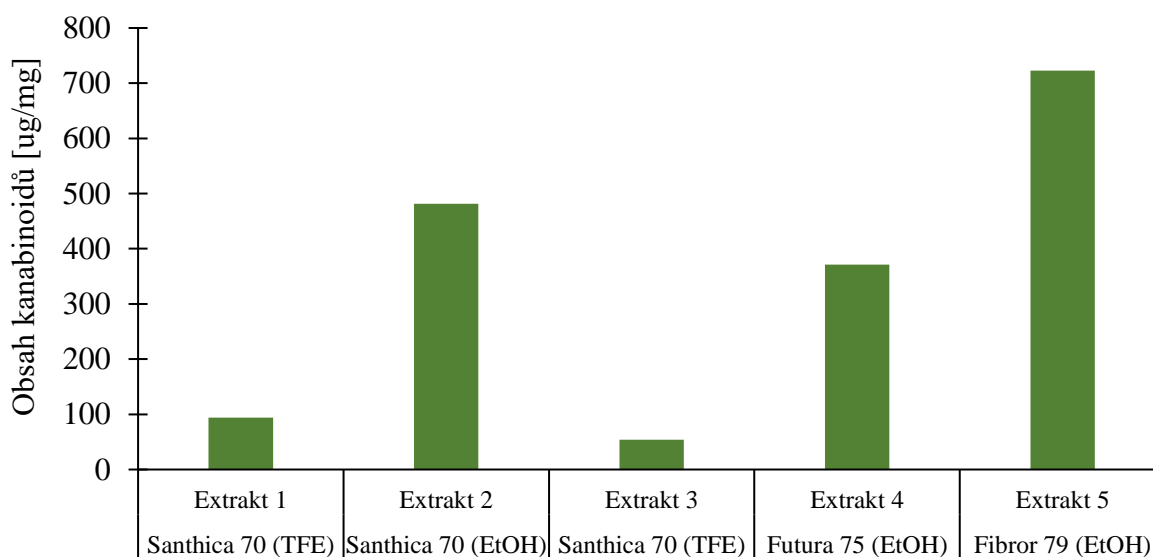


Obr. 22: Celkový obsah flavonoidů v jednotlivých frakcích z konopi

5.5 Stanovení celkového obsahu kanabinoidů

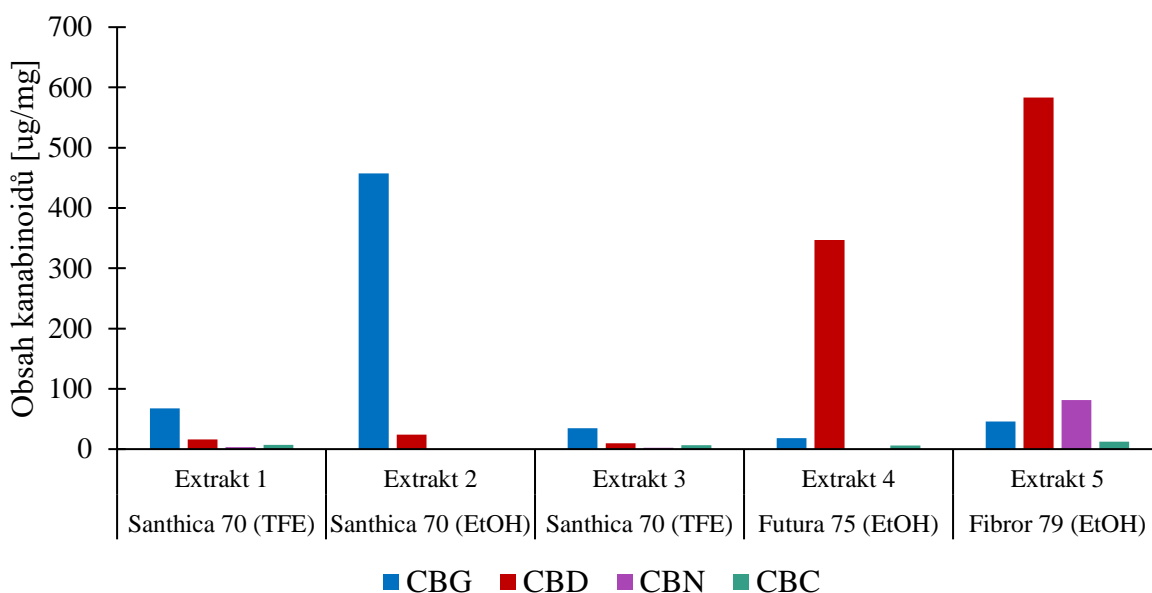
Stanovení kanabinoidů proběhlo metodou HPLC, která je popsána v kapitole 4.10. Navážené čisté extrakty byly rozpuštěné ve směsi acetonitril-ethanol. Rozpuštěné vzorky byly před analýzou přefiltrovány a následně byl každý vzorek vhodně zředěn. Naměřené plochy píků byly vloženy do kalibračních křivek pro jednotlivé kanabinoidy (Příloha 4) a byl vypočítán obsah kanabinoidu v 1 mg čistého extraktu.

Na Obr. 23 je znázorněn celkový obsah kanabinoidů v jednotlivých extraktech. Vidíme, že nejbohatší na kanabinoidy byl extrakt 5 (722,9 $\mu\text{g}/\text{mg}$) vyrobený z odrůdy Fibror 79. Tato odrůda obsahovala i nejvyšší obsah fenolických látek. Nejméně kanabinoidů bylo naměřeno pro extrakt 3 (53,74 $\mu\text{g}/\text{mg}$) z odrůdy Santhica 70. Ethanolové extrakty obsahovaly daleko vyšší obsah kanabinoidů než tertrafluorethanové extrakty. V porovnání ethanolových extraktů byla odrůda Santhica 70 bohatší na kanabinoidy než Futura 75, ale méně bohatá než Fibror 79.



Obr. 23: Celkový obsah kanabinoidů v jednotlivých extraktech

Jednotlivé zastoupení kanabinoidů v jednotlivých extraktech vidíme na Obr. 24. Nejvyšší zastoupení CBG bylo naměřeno v extraktu 2 (457,4 µg/mg). Nejvyšší obsah CBD byl analyzován v extraktu 5 (583,3 µg/mg), kde bylo naměřeno i nejvyšší množství CBN (81,45 µg/mg) a CBC (12,5 µg/mg). CBG a CBD byly identifikovány ve všech extraktech. CBN bylo detekováno pouze u extraktů 1, 3 a 5. CBC obsahovaly všechny extrakty kromě extraktu 2. Z profilů kanabinoidů můžeme vidět vlastnosti jednotlivých odrůd. Dle námi naměřených výsledků byl Fibror 79 nejbohatší na CBD, následovaný CBN, CBD a CBC. U Santhicy 70 byl nejvýraznější CBG a následovalo CBD. Futura 75 obsahovala nejvíce kanabinoidu CBD následovaný CBG. U extraktů vyrobených z odrůdy Santhica 70 vidíme, že ethanolový extrakt obsahoval daleko vyšší množství CBG než tetrafluorethanové extrakty. Oproti tomu, tetrafluorethanové extrakty obsahovaly určité množství kanabinoidů CBN i CBC, které nebyly v ethanolovém extraktu vůbec detekovány.



Obr. 24: Obsah jednotlivých kanabinoidů obsažené v extraktech

5.6 Stanovení antimikrobiálního účinku pomocí difúzních testů

5.6.1 Escherichia coli

Podle postupu v kapitole 4.13.1 byla stanovena antimikrobiální aktivita konopných extraktů pomocí agarového difúzního testu.

Pro *E. coli* byl nejprve proveden agarový diskový difúzní test pro extrakty rozpuštěné v DMSO a extrakty rozpuštěné v PG v poměru 1:9.

Proti *E. coli* žádný ze vzorků nevykazoval velký inhibiční účinek. V tabulce 7 jsou zaznamenány velikosti inhibičních zón jednotlivých vzorků. Je vidět, že největší inhibiční zóna byla naměřena pro samotný pentylenglykol. To znamená, že extrakty v něm rozpuštěné samy o sobě nevykazují příliš antimikrobiální aktivitu vůči *E. coli*, poněvadž jejich hodnota inhibiční zóny je menší. U extraktů rozpuštěných v DMSO se neprojevil žádný inhibiční účinek. Co se týče extrahovadla, ukázalo se, že vzorky extrahované v EtOH měly vyšší antimikrobiální aktivitu, neboť u těchto extraktů byla pozorovatelná inhibiční zóna. Ani u jednoho tetrafluorethanového extraktu nebyl detekován žádný inhibiční účinek. Co se týče odrůdy konopí, největší antimikrobiální aktivitu byla zjištěna u Santhicy 70. Nicméně i přesto, že byly

vidět určité inhibiční zóny, nedá se říci, že extrakty dokázaly *E. coli* inhibovat a *E. coli* byla i nadále metabolicky aktivní.

Tabulka 7: Antimikrobiální aktivita proti *E. coli* – diskový test

Extrakt	Velikost inhibiční zóny [mm]		
	Extrakt v DMSO	Extrakt v PG 1:4	Extrakt v PG 1:9
Extrakt 1 Santhica 70 (TFE)			
Extrakt 2 Santhica 70 (EtOH)			7,5
Extrakt 3 Santhica 70 (TFE)			
Extrakt 4 Futura 75 (EtOH)			7,6
Extrakt 5 Fibror 79 (EtOH)			6,7
rozpouštědlo			8,3

Následně byly pro extrakty, které vůči *E. coli* vykazovaly určitý inhibiční účinek, provedeny jamkové difúzní testy. Při tomto testu se ovšem neprojevila u žádného extraktu ani u samotného PG antimikrobiální aktivita a *E. coli* byla vůči všem extraktům metabolicky aktivní. Již dříve bylo prokázáno, že inhibiční účinek konopných extraktů je vůči gramnegativním bakteriím velmi nízký.

5.6.2 *Staphylococcus epidermidis*

Pro *S. epidermidis* byl nejprve proveden diskový difúzní test pro extrakty rozpuštěné v DMSO a PG v poměru 1:9. Z tabulky 8 vyplývá, že proti bakterii *S. epidermidis* vykazovaly inhibiční účinek extrakty v DMSO i v PG. U samotného PG byla oproti DMSO naměřena inhibiční zóna. Vyšší antimikrobiální aktivita byla spatřena pro extrakty rozpuštěné v PG, kde největší byla pro extrakt 2 (27,7 mm). Inhibiční účinek extraktů v PG byl podpořen i antimikrobiální aktivitou samotného rozpouštědla, proto byly inhibiční zóny extraktů v PG vyšší než pro extrakty v DMSO. Jak u extraktů v DMSO, tak v PG bylo prokázáno, že vyšší antimikrobiální aktivitu měly ethanolové extrakty. Tetrafluorethanové extrakty vykazovaly velmi podobné velikosti inhibičních zón. Po seřazení velikosti inhibičních zón pro extrakty v DMSO a PG bylo zjištěno, že pořadí bylo stejné. I přesto, že byly extrakty v rozdílném rozpouštědle, dokázaly si zachovat svoji antimikrobiální aktivitu. Z odrůdy byl naměřen nejsilnější účinek u Santhicy 70, nicméně nebyl o mnoho vyšší než u zbylých odrůd. I přesto, že byly všechny vzorky prováděny v duplikátech, na některých miskách došlo ke spojení inhibičních zón.

Agarové jamkové difúzní testy byly provedeny pro extrakty v DMSO a v PG v poměru 1:4 i 1:9. Bohužel i při jamkových testech se některé inhibiční zóny duplikátů spojily a nebylo možné určit velikost zóny. Kromě extraktu 5 v PG v poměru 1:9, kde nešlo určit ani u jednoho vzorku inhibiční zónu, se u ostatních podařilo inhibiční zónu naměřit alespoň pro jeden vzorek. Velikosti inhibičních zón jsou znázorněny v tabulce 9.

Vůči *S. epidermidis* byla prokázána antimikrobiální aktivita u všech extraktů. U samotných rozpouštědel nebyla naměřena. U většiny extraktů v DMSO byly vyšší velikosti inhibičních

účinků, kde nejvyšší byl naměřen pro extrakt 2 (25,5 mm). U extraktů v PG v různých poměrech vidíme, že vyšší inhibiční zóny byly naměřeny v poměru 1:4, kde je nižší obsah PG, u kterého nebyla antimikrobiální aktivita potvrzena. Čím méně rozpouštědla extrakt obsahoval, tím vyšší byla antimikrobiální aktivita. Z pohledu extrahovadel byly pro ethanolové i tetrafluorethanové extrakty získány podobné velikosti. Z odrůd měla nejsilnější inhibiční účinky Santhica 70.

Tabulka 8: Antimikrobiální aktivita proti *S. epidermidis* – diskový test

Extrakt	Velikost inhibiční zóny [mm]		
	Extrakt v DMSO	Extrakt v PG 1:4	Extrakt v PG 1:9
Extrakt 1 Santhica 70 (TFE)	11,9		15,6
Extrakt 2 Santhica 70 (EtOH)	17,4		27,7
Extrakt 3 Santhica 70 (TFE)	11,8		13,5
Extrakt 4 Futura 75 (EtOH)	16,5		25,6
Extrakt 5 Fibror 79 (EtOH)	15,4		24
rozpouštědlo		6	

Tabulka 9: Antimikrobiální aktivita proti *S. epidermidis* – jamkový test

Extrakt	Velikost inhibiční zóny [mm]		
	Extrakt v DMSO	Extrakt v PG 1:4	Extrakt v PG 1:9
Extrakt 1 Santhica 70 (TFE)	20	15,8	12,7
Extrakt 2 Santhica 70 (EtOH)	25,5	22,7	15
Extrakt 3 Santhica 70 (TFE)	15,3	16,8	11,3
Extrakt 4 Futura 75 (EtOH)	16,5	15,2	10,3
Extrakt 5 Fibror 79 (EtOH)	17,6	13,3	nelze určit
rozpouštědlo			

5.6.3 *Cutibacterium acnes*

Pro *C. acnes* byl proveden pouze agarový jamkový test pro všechny extrakty. Z tabulky 10 vyplývá, že proti *C. acnes* vykazovaly inhibiční účinek extrakty rozpuštěné v DMSO i v PG. Nicméně, bakterii se nepodařilo usmrtit úplně, jako *S. epidermidis*, a *C. acnes* byla i nadále metabolicky aktivní. Samotný DMSO na rozdíl od PG nevykazoval antimikrobiální aktivitu. Vyšší inhibiční zóny byly zjištěny pro extrakty v DMSO, kde nejvyšší byla pro extrakt 4

(21,4 mm). Velmi podobnou měl i extrakt 2 (21,3 mm). Každý extrakt byl přitom vyroben z jiné odrůdy.

U extraktů v PG v různých poměrech byly pro každý extrakt rozdílné hodnoty. Z toho důvodu, že u samotného PG byla naměřena inhibiční zóna, se očekávalo, že při vyšším množství rozpouštědla bude velikost inhibiční zóny vyšší. To se potvrdilo pro extrakty 4 a 5, kde při poměru 1:9 došlo ke zvětšení inhibiční zóny. U extraktů 1, 2, 3, které byly vyrobeny ze Santhicy 70 nebyla tato hypotéza potvrzena a vyšší inhibiční zóna byla naměřena při nižším množství rozpouštědla. U obou tetrafluorethanových extraktů byly velikosti inhibičních zón velmi podobné a měly silnější účinky než ethanolové extrakty z jiných odrůd, ale nižší než ethanolový extrakt ze stejné odrůdy.

Tabulka 10: Antimikrobiální aktivita proti *C. acnes* – jamkový test

Extrakt	Velikost inhibiční zóny [mm]		
	extrakt v DMSO	Extrakt v PG 1:4	Extrakt v PG 1:9
Extrakt 1 Santhica 70 (TFE)	13,9	13,1	13,3
Extrakt 2 Santhica 70 (EtOH)	21,3	18,2	14,4
Extrakt 3 Santhica 70 (TFE)	20,1	13,7	12
Extrakt 4 Futura 75 (EtOH)	21,4	6,7	11,2
Extrakt 5 Fibror 79 (EtOH)	12	4,2	10,2
rozpouštědlo		6,2	

5.7 Stanovení antimikrobiálního účinku pomocí dilučních testů

Pro vzorky byl proveden bujónový diluční test podle postupu v kapitole 4.13.2. Byl měřen antibakteriální a antifugální účinek vůči *S. epidermidis*, *C. acnes* a *C. glabrata*.

Každý vzorek byl do posledního sloupce jamky A–H12 dán v nejvyšší koncentraci. Následovalo ředění dvojkovou řadou. Rozložení destičky je zobrazeno v tabulce 11. Pro analýzu byly použity extrakty v DMSO v koncentraci v rozmezí 60–66 mg/ml, kterou nazýváme původní koncentrace. U extraktů v PG v poměru 1:4 byla původní koncentrace 152–204 mg/ml. U šamponů, které byly zředěny vodou v poměru 1:4 byla původní koncentrace v rozmezí 206–209 mg/ml. Jednotlivé koncentrace pro jednotlivé vzorky jsou vyobrazeny v tabulce 12.

Tabulka 11: Rozložení mikrotitrační destičky při dilučním testu

	Kontroly		Ředění dvojkovou řadou									12																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11																			
A	kontrola média		512	256	128	64	32	16	8	4	2	vzorek 1																		
B																														
C																														
D	kontrola kultury											512	256	128	64	32	16	8	4	2	vzorek 2									
E																														
F																														
G	pozitivní kontrola (ethanol)																				512	256	128	64	32	16	8	4	2	rozpouštědlo
H																														

Pro všechny vzorky byla provedena zákalová metoda (Obr. 25) i metoda s resazurinem (Obr. 26). Z důvodu, že naše extrakty obsahovaly zelený pigment chlorofyl, byly silně zbarvené, čímž docházelo při měření absorbance k tomu, že naše hodnota, zvláště při vyšších koncentracích, kde jsou vzorky nejsytější, překračovala hodnotu 1.

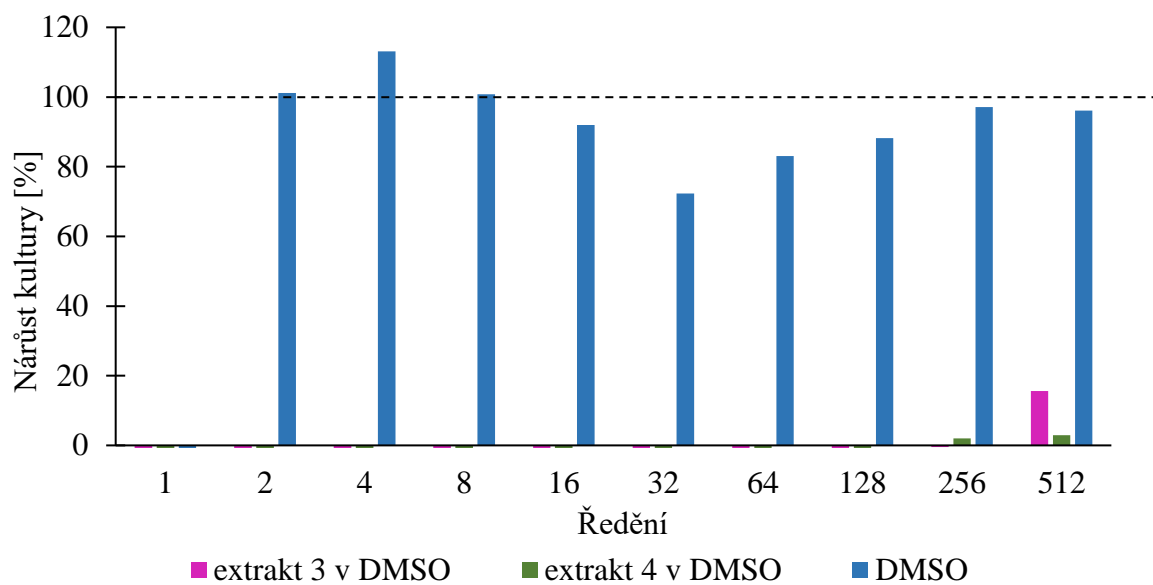
Na destičkách byl měřen zákal pomocí ELISA na začátku testu v čase 0 a po uplynutí 24 hodin. Získané absorbance byly od sebe odečteny, čímž byl zjištěn nárůst mikroorganismu. Od všech hodnot byl odečten účinek čistého média. Následně byly výsledky přepočítány na nárůst kultury v procentech, kde 100 % značí nárůst čisté kultury. Čím nižší procento bylo získáno, tím nižší nárůst kultury a silnější inhibiční účinek.

Při použití resazurinu, který slouží jako indikátor životaschopnosti buněk, byla absorbance měřena po 30 minutách inkubace při 37 °C. Zelené extrakty, které absorbují viditelné záření vedly k tomu, že byly naše hodnoty absorbancí vysoké, což by značilo, že metabolická aktivita byla v dané jamce vysoká, jak je vidět na Obr. 27. Tyto výsledky nekorelují s barevným výsledkem v mikrodestičce (Obr. 26), kde bylo spatřeno po napipetování resazurinu modré zbarvení, což značí, že buňky nejsou aktivní. Oproti tomu růžová barva prokazuje životaschopnost buněk.

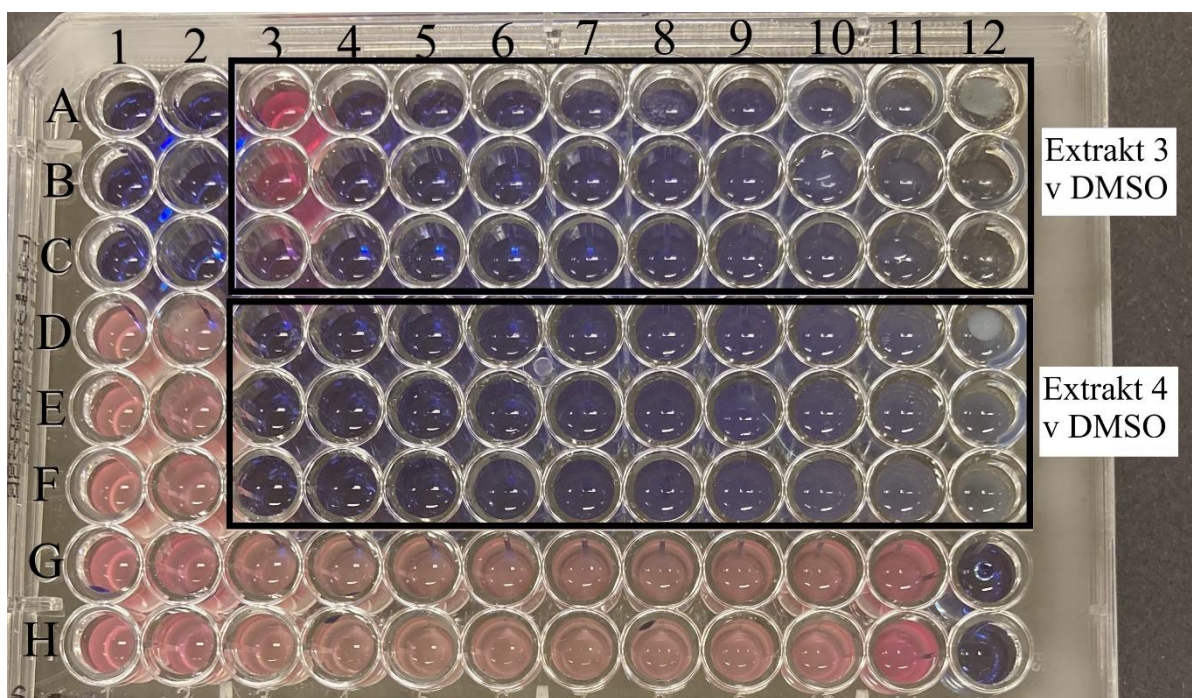
V následujících grafech jsou znázorněny výsledky zákalové metody, kde je vyobrazen nárůst kultury v jednotlivých vzorcích pro jednotlivá ředění. Zjišťování minimální inhibiční koncentrace (MIC) probíhalo vizuálně z mikrodestičky. Ke všem testům bylo provedeno i ověření schopnosti kultury tvořit kolonie na Petriho miskách, čímž byl zjištěn baktericidní účinek.

Tabulka 12: Přesná koncentrace jednotlivých vzorků při testování antimikrobiální aktivity

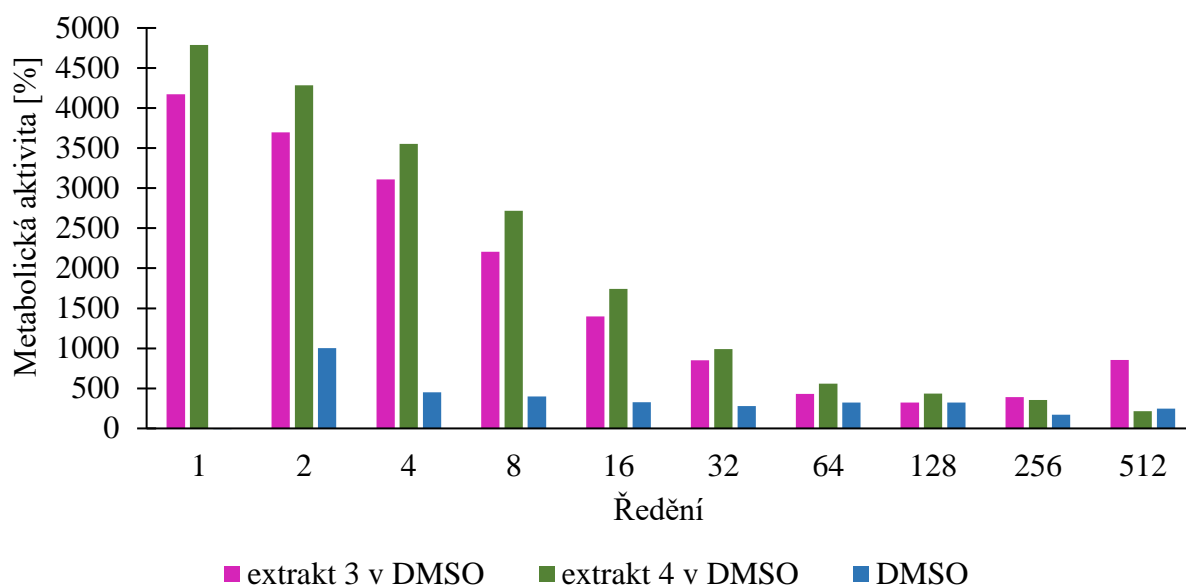
Vzorek	c (nejnižší) [mg/ml]									c (nejvyšší) [mg/ml]	c (původní) [mg/ml]
Extrakt 1 v DMSO	0,03	0,06	0,13	0,26	0,52	1,03	2,06	4,13	8,25	16,50	66
Extrakt 2 v DMSO	0,03	0,06	0,13	0,26	0,52	1,03	2,06	4,13	8,25	16,50	66
Extrakt 3 v DMSO	0,03	0,06	0,13	0,25	0,50	1	2	4	8	16	64
Extrakt 4 v DMSO	0,03	0,06	0,12	0,25	0,49	0,98	1,97	3,94	7,88	15,75	63
Extrakt 5 v DMSO	0,03	0,06	0,12	0,25	0,49	0,94	1,88	3,75	7,50	15	60
Extrakt 1 v PG 1:4	0,07	0,15	0,30	0,59	1,19	2,38	4,75	9,50	19	38	152
Extrakt 2 v PG 1:4	0,09	0,19	0,38	0,75	1,50	3	6	12	24	48	192
Extrakt 3 v PG 1:4	0,09	0,18	0,35	0,70	1,41	2,81	5,63	11,25	22,50	45	180
Extrakt 4 v PG 1:4	0,10	0,20	0,40	0,80	1,59	3,19	6,38	12,75	25,50	51	204
Extrakt 5 v PG 1:4	0,10	0,20	0,39	0,78	1,56	3,13	6,25	12,50	25	50	200
2+5 v PG	0,10	0,19	0,38	0,77	1,53	3,06	6,13	12,25	24,50	49	196
Konop. hydr	0,08	0,16	0,31	0,63	1,25	2,50	5	10	20	40	160
Šampon s hydr	0,10	0,20	0,40	0,80	1,61	3,22	6,44	12,88	25,75	51,50	206
Šampon final	0,10	0,20	0,41	0,81	1,63	3,25	6,50	13	26	52	208
Šampon bez hydr	0,10	0,20	0,41	0,82	1,63	3,27	6,53	13,06	26,13	52,25	209



Obr. 25: Zákalová metoda – nárůst kultury ve vzorku pro jednotlivá ředění



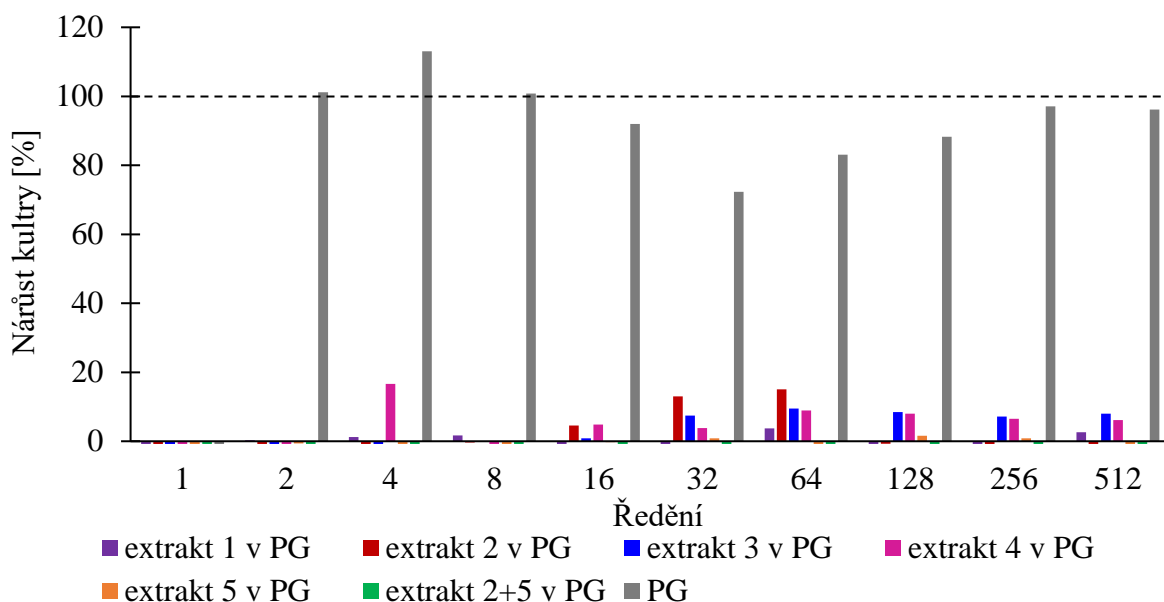
Obr. 26: Inhibiční účinek extraktů vůči *S. epidermidis* v jednotlivých koncentracích



Obr. 27: Resazurinový test vzorků pro jednotlivá ředění

5.7.1 Staphylococcus epidermidis

Všech pět extraktů a kombinace extraktu 2 + 5 rozpuštěných v PG v poměru 1:4 vykazovaly při ředění velmi nízký nárůst kultury, a to do 20 % (Obr. 28). Při nejnižších ředění byl pro všechny extrakty nárůst nulový. Samotný PG měl při nejnižším ředění také nulový nárůst, nicméně postupným ředěním se nárůst *S. epidermidis* zvyšoval. Z toho vyplývá, že samotný PG neměl inhibiční účinky vůči bakterii. Extrakt 2+5, který byl použit i do šamponu měl nulový nárůst ve všech ředění. Protože i samotné extrakty 2 a 5 měly malé nárůsty kultury, jejich kombinací se antimikrobiální aktivita vůči bakterii zvýšila.

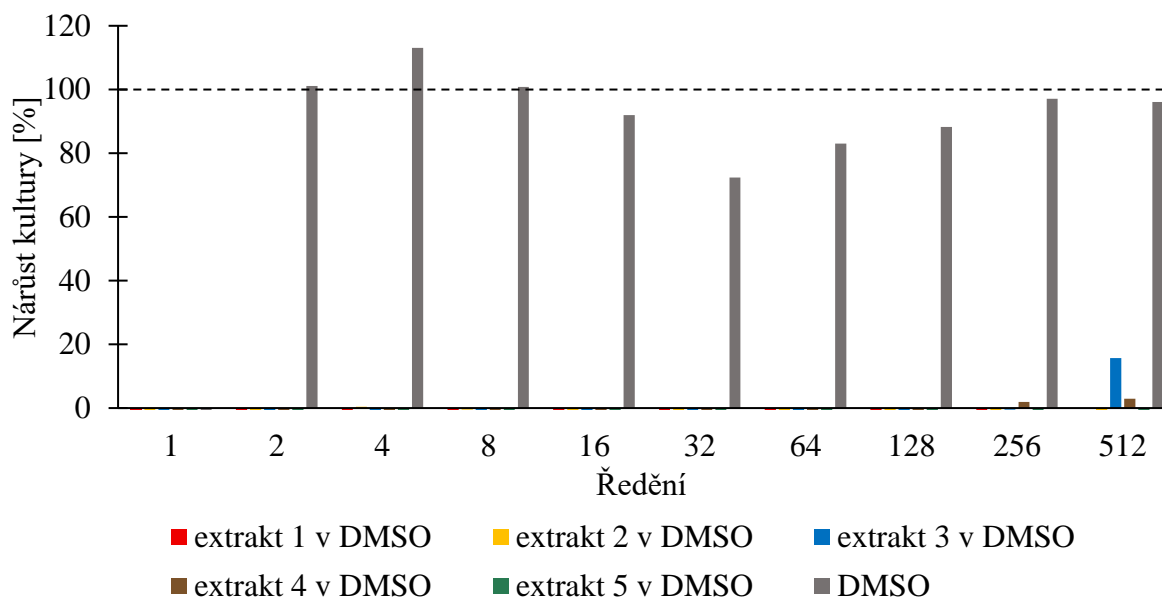


Obr. 28: Nárůst *S. epidermidis* v extraktech v PG

Nárůst *S. epidermidis* v extraktech rozpuštěných v DMSO můžeme vidět na Obr. 29. U všech extraktů byl nárůst nulový. Pouze u tetrafluorethanového extraktu 3 bylo při ředění 512× zjištěno, že došlo k nárůstu kultury o necelých 20 %. I u ethanolového extraktu 4 z odrůdy

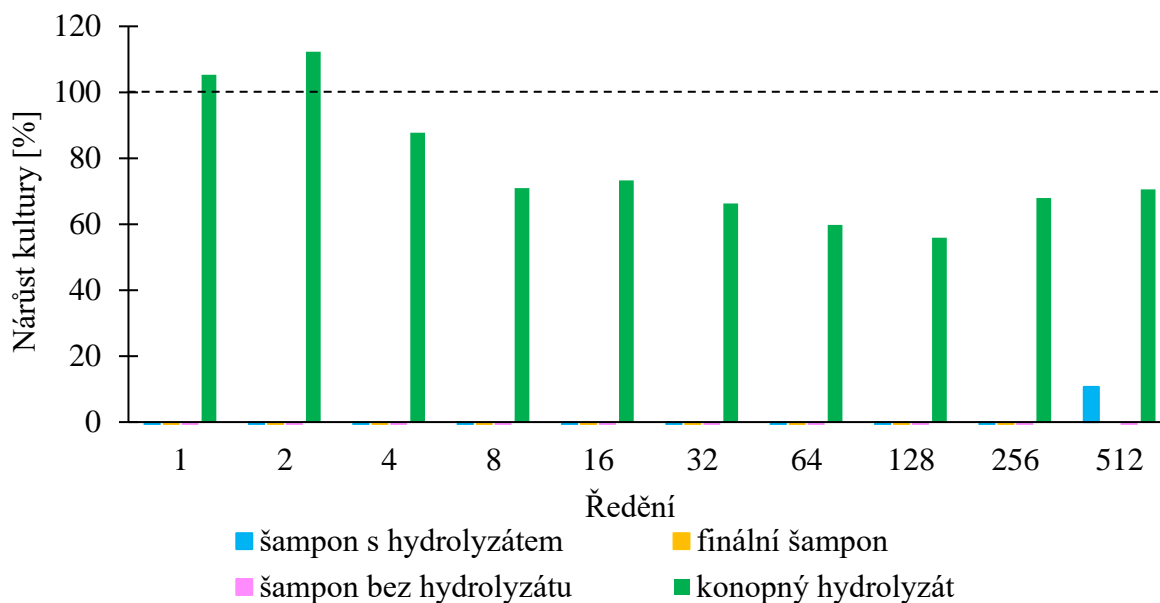
Futura 75 byl při ředění 256× a 512× spatřen nízký nárůst. U samotného DMSO byl nulový nárůst pouze při nejvyšší koncentraci. U dalších ředění se nárůst *S. epidermidis* pohyboval až k hranici 100 %, tedy k nárůstu čisté kultury, tudíž vůči bakterii nevykazoval inhibiční účinky.

Při porovnání extraktů v DMSO a PG bylo zjištěno, že extrakty v DMSO měly vyšší antimikrobiální aktivitu, neboť u většiny nedošlo k téměř žádnému nárůstu kultury a oproti extraktům v PG a dokázaly bakterii inhibovat v nižších koncentracích.



Obr. 29: Nárůst *S. epidermidis* v extraktech v DMSO

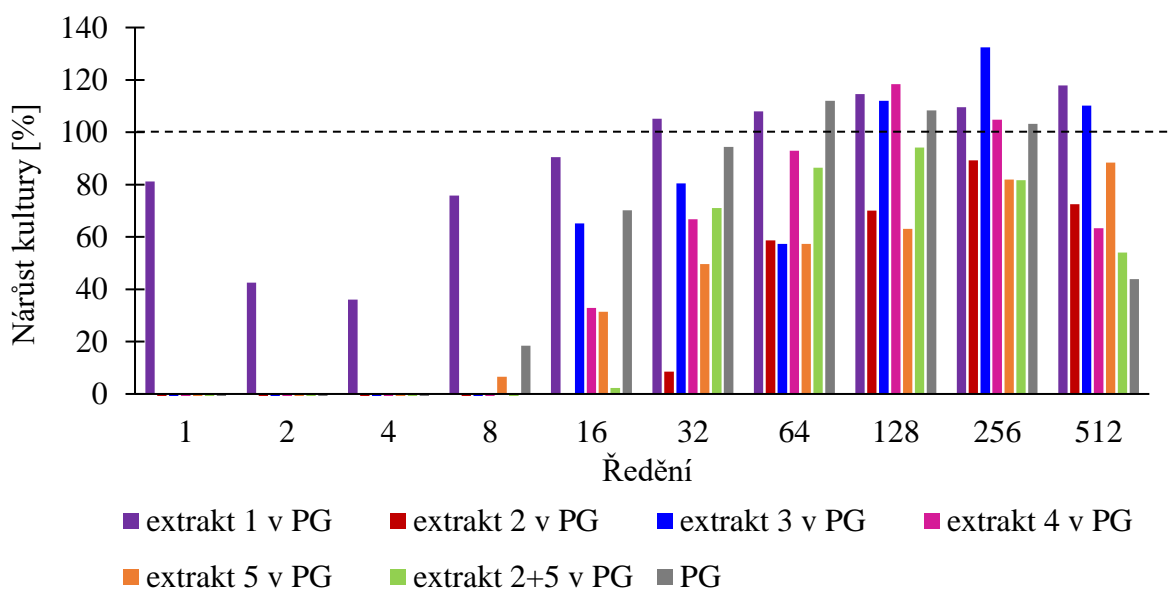
Nárůst *S. epidermidis* v šamponech a konopném hydrolyzátu je zobrazen na Obr. 30. Můžeme vidět, že ve finálním šamponu ani v šamponu bez hydrolyzátu nebyl evidován žádný nárůst kultury. U šamponu s konopným hydrolyzátem byl minimální nárůst kultury při ředění 512× (15 %). U samotného konopného hydrolyzátu se kultuře žilo o poznání lépe a došlo k výraznému nárůstu kultury, který při ředění 1× a 2× překročil hranici 100 %. Z toho vyplývá, že samotný konopný hydrolyzát neměl vůči *S. epidermidis* žádné inhibiční účinky. Nízký nárůst v šamponech mohl být způsoben konzervantem, který se zde nachází. U finálního šamponu může být nulový nárůst podpořen přidáním konopných extraktů, které vykazovaly vůči bakterii inhibiční účinek.



Obr. 30: Nárůst *S. epidermidis* v konopném hydrolyzátu a šamponech

5.7.2 *Cutibacterium acnes*

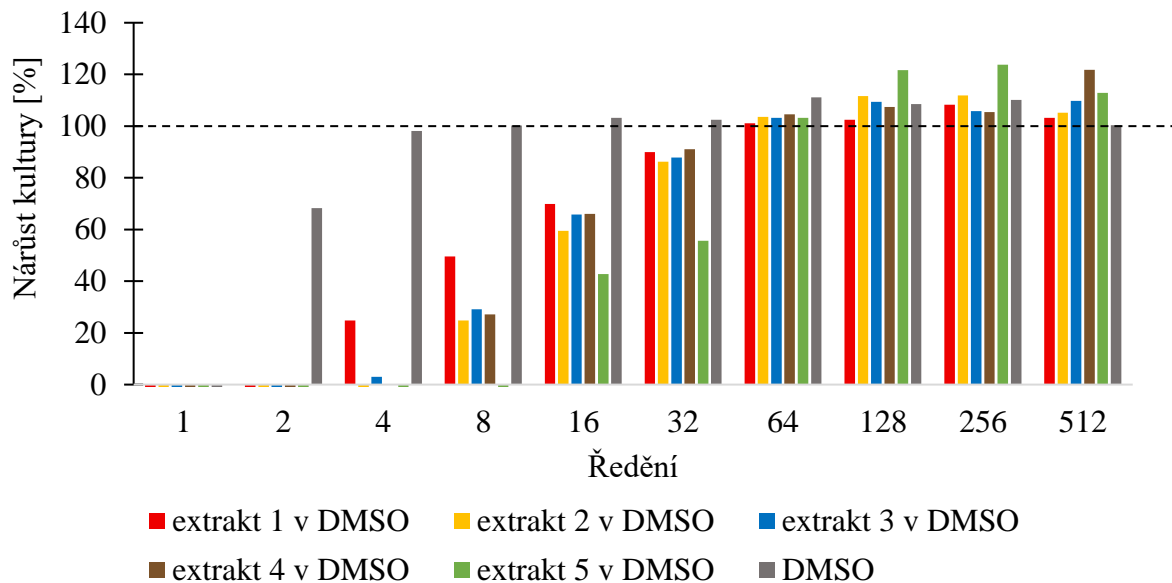
Na Obr. 31 je zobrazen nárůst *C. acnes* v extraktech rozpuštěných v PG. Je vidět, že u většiny extraktů od ředění 16× byl velký nárůst kultury, který v mnoha případech překročil hranici 100 %, a to zejména u extraktů 1 a 3. Jedná se o tetrafluorethanové extrakty, což dokazuje, že ethanolové extrakty měly silnější inhibiční účinek než tetrafluorethanové. Při nižších ředění nebyl detekován nárůst kultury u žádného extraktu, kromě extraktu 3. U ethanolových extraktů byl nejvyšší nárůst kultury naměřen pro extrakt 4 z odrůdy Futura 75. Samotný PG vůči *C. acnes* neměl vysoké inhibiční účinky. Při nižších ředění nebyl pozorován nárůst kultury, ale při vyšším ředění postupně narůstal, až také dosáhl hranice nárůstu čisté kultury.



Obr. 31: Nárůst *C. acnes* v extraktech v PG

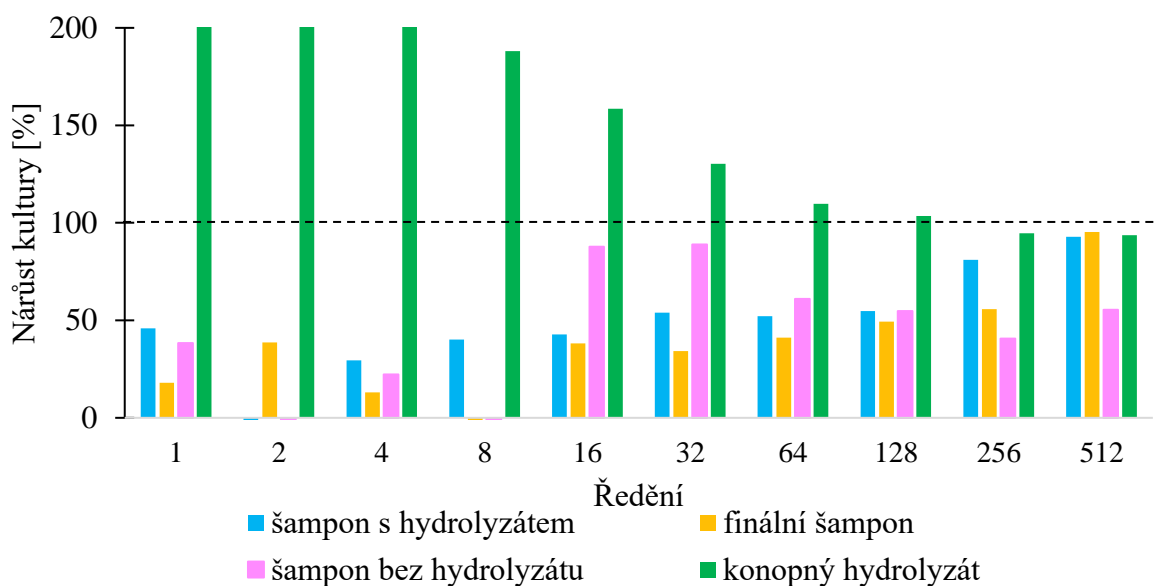
Na Obr. 32 vidíme nárůst *C. acnes* v extraktech v DMSO. Pouze u nejnižších ředění byl nárůst kultury nízký. Při dalším ředění byl sledován lineární nárůst kultury a od ředění 64×

překročily všechny extrakty hranici 100 %. Vůči *C. acnes* měly ethanolové i tetrafluorethanolové extrakty velmi podobné nárůsty kultury, kde u nižších ředění byly nejnižší nárůsty pro ethanolový extrakt 5 vyrobený z odrůdy Fibror 79. U samotného DMSO byl nárůst *C. acnes* nízký pouze při nejvyšším ředění. Následně velmi rychle nárůst stoupal, až se také dostal přes hranici nárůstu čisté kultury.



Obr. 32: Nárůst *C. acnes* v extraktech v DMSO

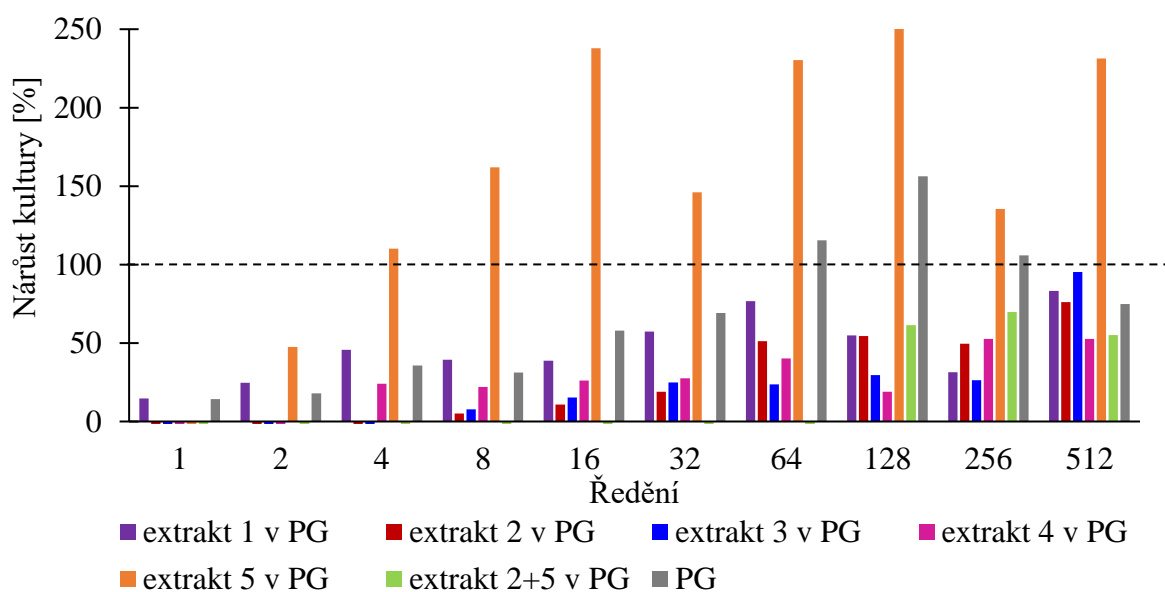
Nárůst *C. acnes* v konopném hydrolyzátu a jednotlivých šamponech je zobrazen na Obr. 33. U konopného hydrolyzátu bylo zjištěno, že při nižších ředění byl nárůst kultury dvojnásobný než při vyšších ředění. Co se týče šamponů, od ředění 16× byl nárůst pro každý šampon okolo 50 %. U šamponu bez konopného hydrolyzátu byl nárůst ještě vyšší. Postupně při dalším ředění docházelo k nárůstu téměř ke 100 %. Z důvodu, že rozdíly nárůstu byly velmi odlišné v jednotlivých ředění, lze se domnívat, že mohlo dojít k chybě během pipetování. Šampon při promíchání napěňoval a je možné, že nebyl rovnoměrně rozředěn.



Obr. 33: Nárůst *C. acnes* v konopném hydrolyzátu a šamponech

5.7.3 *Candida glabrata*

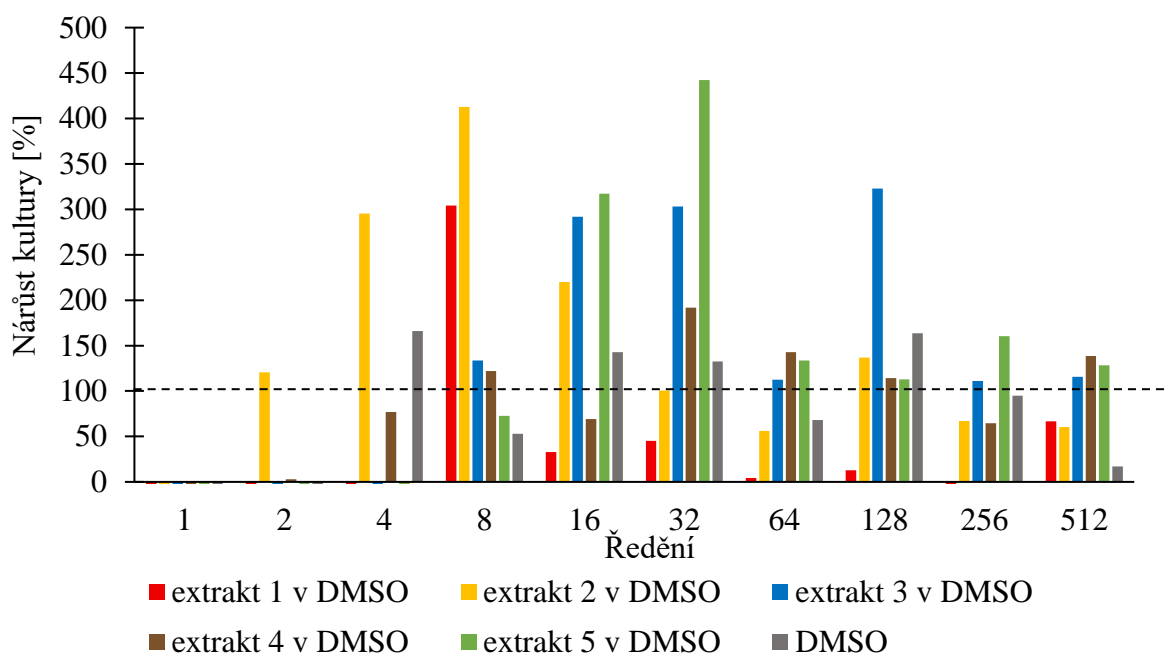
Na Obr. 34 je znázorněn nárůst *C. glabrata* v extraktech v PG. U některých extraktů byl prokázán nižší nárůst kultury a ve většině ředění byl kolem 20–50 %. Nejnižší nárůsty byly zaznamenány u extraktu 2, 3, 4. Extrakt 2 byl vyroben ethanolovou extrakcí z odrůdy Santhica 70. Extrakt 3 byl také vyroben ze Santhicy 70, ale tetrafluorethanovou extrakcí. Extrakt 4 byl vyroben ethanolovou extrakcí z odrůdy Futura 75. Naopak u extanolového extraktu 5, vyrobeného z odrůdy Fibror 79, docházelo k podpoře růstu kvasinky, neboť ve většině ředění byl překročen nárůst čisté kultury. Samotný PG měl při všech ředění určitý nárůst kultury. Při nižších ředění se pohyboval v oblasti 50 %. Při vyšších ředění ovšem došlo k překročení nárůstu o 100 %.



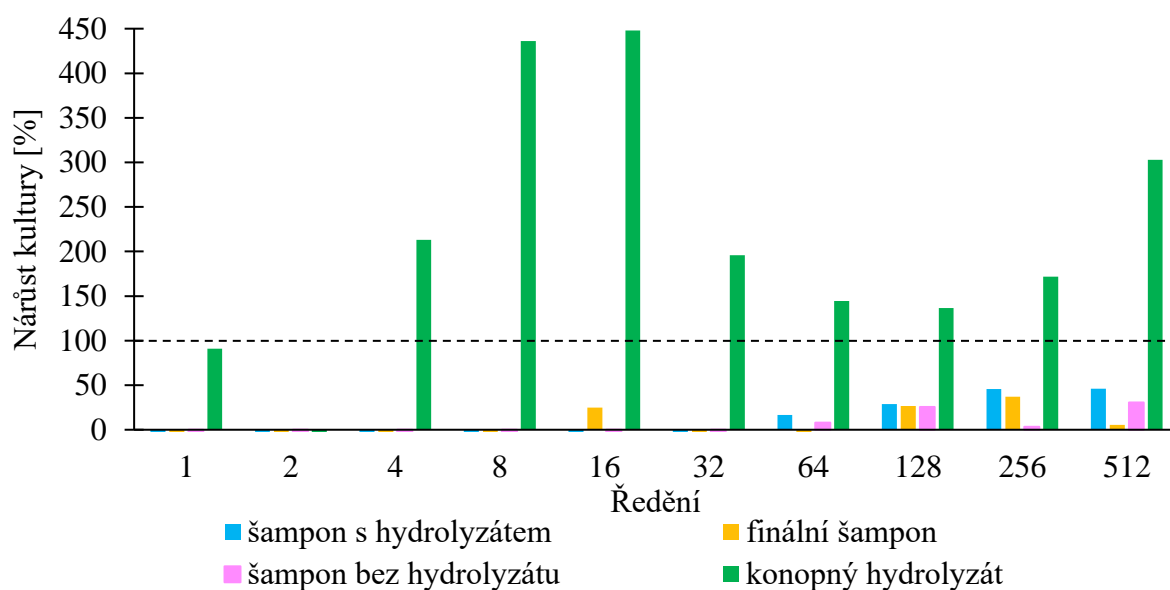
Obr. 34: Nárůst *C. glabrata* v extraktech v PG

Nárůst *C. glabrata* pro extrakty rozpuštěné v DMSO jsou vyobrazeny na Obr. 35. Při nejvyšším ředění byl nárůst kultury u všech extraktů nulový. Můžeme si povšimnout, že poté došlo k velkému nárůstu kultury u všech extraktů a u některých byla výrazně překročena hranice 100 %. Z toho plyne, že extrakty v DMSO nemají vůči kvasince inhibiční účinek. Samotné rozpouštědlo, i když u něho byl také naměřen nárůst kultury v jednotlivých ředění, byl nižší než pro jednotlivé extrakty. Z toho vyplývá, že určitý inhibiční účinek vůči kvasince způsobovalo rozpouštědlo. Naopak konopné extrakty nárůst kvasinky podporovaly, zejména ethanolový extrakt 5 z odrůdy Fibror 79.

Nárůst *C. glabrata* v konopném hydrolyzátu a samotných šamponech je zobrazen na Obr. 36. I u samotného hydrolyzátu bylo zjištěno, že kvasinka dokáže využít prostředí a dochází k vysokému nárůstu kultury. U šamponů byl nárůst kultury daleko nižší než pro samotný hydrolyzáat. Při nižších ředění byl nulový a až při vyšších se pohyboval kolem 50 %. Nižší nárůst kultury byl nejspíše způsoben konzervantem, který byl přidán do šamponů.



Obr. 35: Životaschopnost *C. glabrata* v extraktech v DMSO



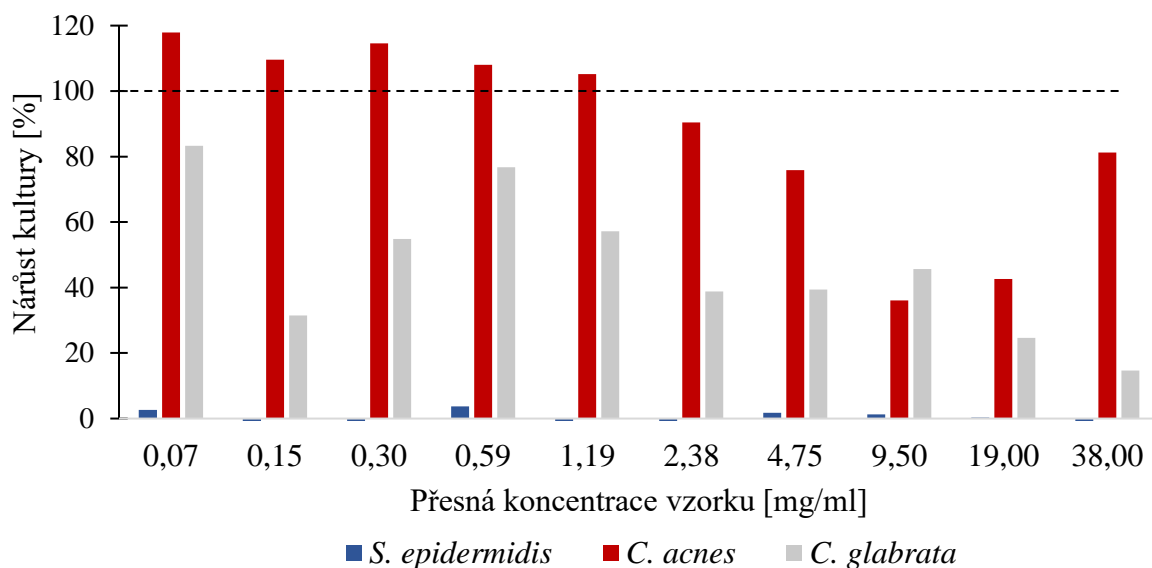
Obr. 36: Nárůst *C. glabrata* v konopném hydrolyzátu a šamponech

5.7.4 Celkové zhodnocení působení vzorků konopí vůči mikroorganismům

Na následujících grafech jsou zobrazeny nárůsty kultur jednotlivých mikroorganismů pro daný vzorek v jeho přesné koncentraci, které vidíme v tabulce 12. Nejvyšší koncentrace odpovídá jamce s nejnižším ředěním.

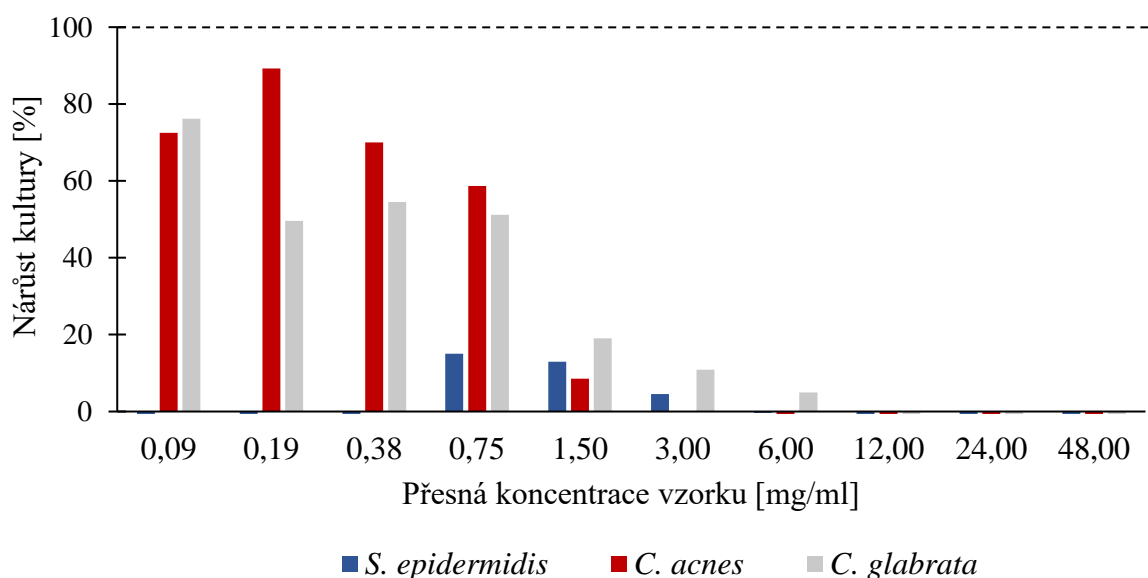
Na Obr. 37 můžeme vidět nárůst všech kultur v extraktu 1 v PG (tetrafluoertanový extrakt ze *Santhica* 70) pro přesné koncentrace v jednotlivých jamkách mikrodestičky. Můžeme vidět, že nárůst *S. epidermidis* byl ve všech koncentracích minimální. Oproti tomu *C. acnes* měl velký nárůst a došlo až k překročení nárůstu čisté kultury o necelých 20%. U *C. glabrata* byl zaznamenán nárůst kultury v rozmezí 50–80% a nejnižší byl při koncentraci 38 mg/ml. Při vizuálním pozorování resazurinu měl vůči *S. epidermidis* extrakt inhibiční účinek pro všechny

koncentrace (MIC < 0,07 mg/ml). Vůči *C. acnes* projevil inhibiční účinek pouze při nejvyšší koncentraci, stejně jako vůči *C. glabrata*. (MIC = 38 mg/ml).



Obr. 37: Nárůst mikroorganismů v extraktu 1 v PG

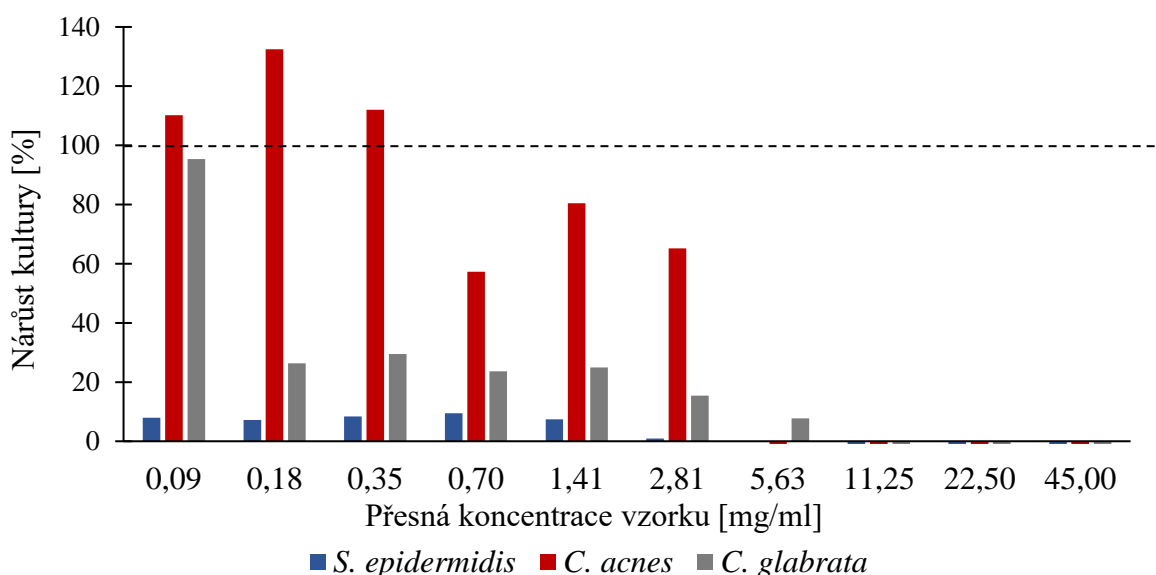
Nárůst jednotlivých kultur v extraktu 2 v PG (ethanolový extrakt ze Santhica 70) vidíme na Obr. 38. Až po koncentraci 12 mg/ml vidíme u všech kultur nulový nárůst. Od koncentrace 1,50 mg/ml začínal nárůst kultury zejména pro *C. acnes*, nicméně nedošlo k překročení hranice 100 % jako u extraktu 1. Vůči *S. epidermidis* měl extrakt silnější inhibiční účinek a vizuálně byl shledán u všech použitých koncentrací (MIC < 0,09 mg/ml). U *C. acnes* byl inhibiční účinek spatřen do koncentrace 12 mg/ml (MIC = 12 mg/ml). U *C. glabrata* byl inhibiční účinek viděn do koncentrace 6 mg/ml (MIC = 6 mg/ml).



Obr. 38: Nárůst mikroorganismů v extraktu 2 v PG

Extrakt 3 v PG (tetrafluoerethanový extrakt ze Santhica 70) měl vůči *S. epidermidis* silný inhibiční účinek a nárůst *S. epidermidis* byl ve většině koncentrací nulový nebo do 10 %

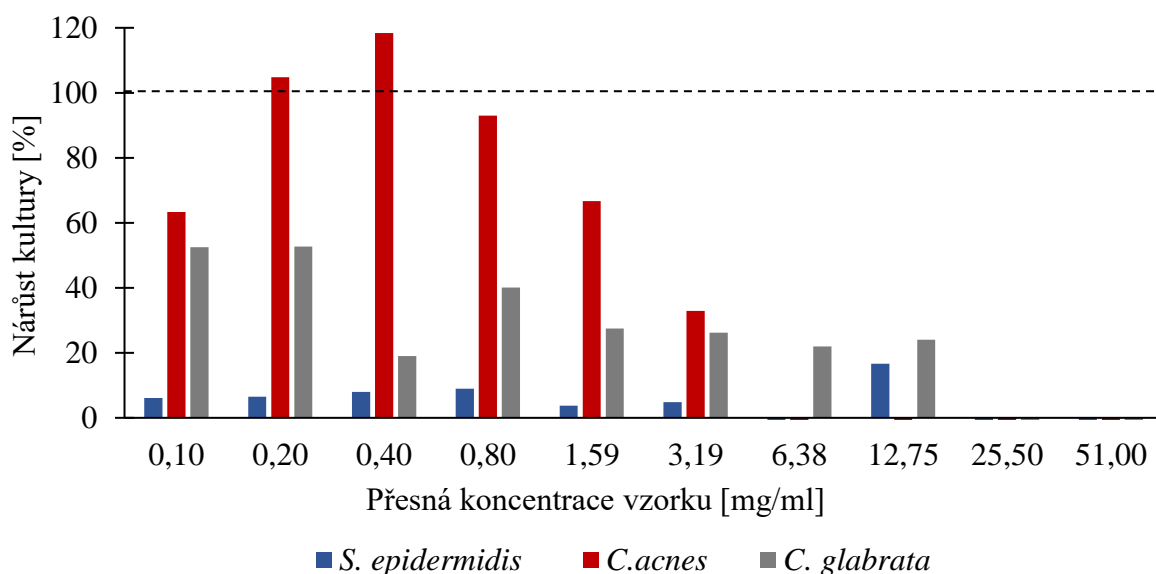
(Obr. 39). Vůči *C. acnes* nebyl tak účinný a již od koncentrace 2,81 mg/ml byl pozorován nárůst kultury přibližně 60 %. Při nejnižších koncentracích byla dokonce překročena hranice nárůstu čisté kultury. Vůči *C. glabrata* měl extrakt 3 silnější inhibiční účinky než vůči *C. acnes*. Nárůst kultury se pohyboval od koncentrace 5,63 mg/ml v rozmezí 10–30 %. Pouze pro nejnižší koncentraci docházelo téměř ke 100% nárůstu. Vůči *S. epidermidis* byl pro extrakt 3 prokázán inhibiční účinek pro všechny použité koncentrace (MIC < 0,09 mg/ml). Vůči *C. acnes* vykazoval vzorek malý inhibiční účinek (MIC = 22,50 mg/ml). Vůči *C. glabrata* byl inhibiční účinek větší než vůči *C. acnes*, ale mnohem nižší než vůči *S. epidermidis* (MIC = 5,63 mg/ml).



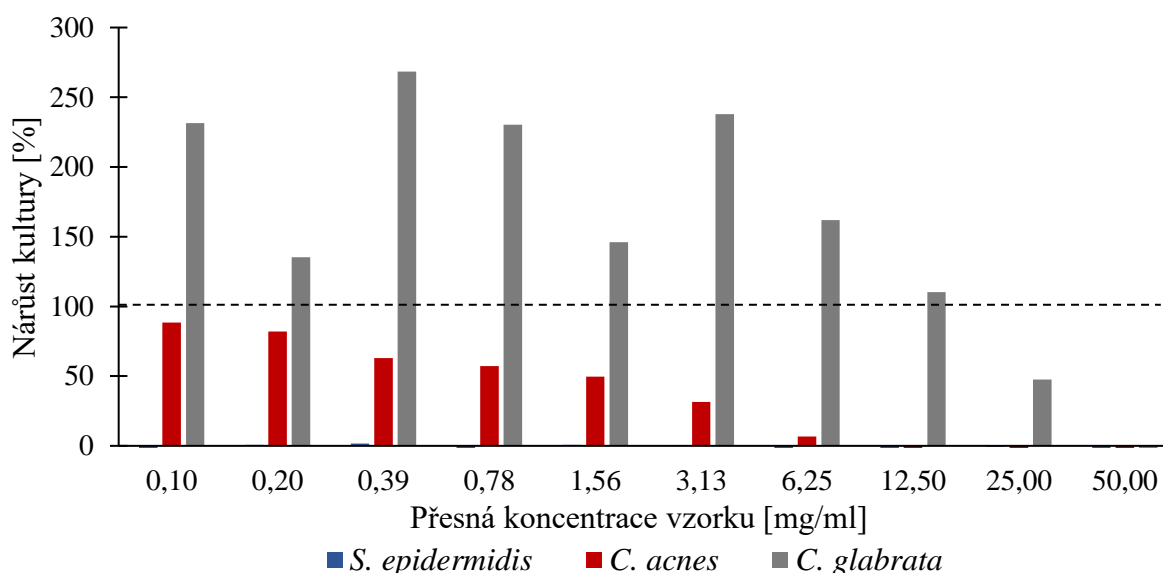
Obr. 39: Nárůst mikroorganismů v extraktu 3 v PG

Pro extrakt 4 v PG (ethanolový extrakt z odrůdy Futura 75) vidíme na Obr. 40, že nárůst *S. epidermidis* nebyl příliš vysoký a pohyboval se pod 10 %. Nárůst *C. glabrata* je o trochu vyšší a pohybuje se v rozmezí 20–50 %. *C. acnes* měl nejvyšší nárůst při koncentraci 0,40 mg/ml, kde přesahoval hranici 100 %. Co se týče inhibičního účinku, měl extrakt 4 vůči *S. epidermidis* silný inhibiční účinek a byl zaznamenán ve všech koncentracích (MIC < 0,1 mg/ml). Vůči *C. acnes* měl slabý minimální účinek a byl pouze při nejvyšší koncentraci (MIC = 51 mg/ml). U *C. glabrata* byl o jednu koncentraci vyšší než vůči *C. acnes* (MIC = 25,50 mg/ml).

U extraktu 5 v PG (ethanolový extrakt z odrůdy Fibror 79) byl nárůst *S. epidermidis* pro všechny koncentrace nulový, jak je zobrazeno na Obr. 41. Nárůst *C. acnes* od koncentrace 6,25 mg/ml lineárně stoupal, ale nepřesáhl hranici 100% nárůstu čisté kultury oproti jiným extraktům. Nejvyšší nárůst byl zaznamenán vůči *C. glabrata*. Pouze při koncentraci 50 mg/ml nebyl žádný nárůst. Pro ostatní koncentrace došlo k překročení hranice 100 %, kde nejvyšší nárůst byl zaznamenán při koncentraci 0,39 mg/ml. Vůči *S. epidermidis* byl spatřen silný inhibiční účinek, a to u všech použitých koncentrací (MIC < 0,1 mg/ml). Vůči *C. acnes* se určitý inhibiční účinek projevil, ale nebyl tak výrazný jako vůči *S. epidermidis* (MIC = 12,50 mg/ml). Vůči *C. glabrata* byl zpozorován nejnižší inhibiční účinek (MIC = 50 mg/ml).

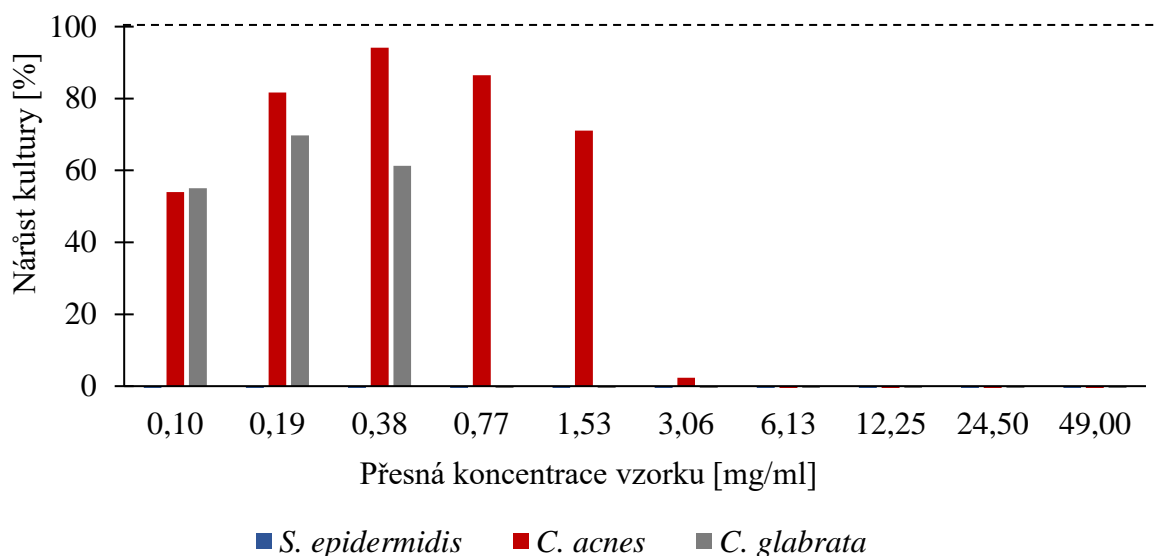


Obr. 40: Nárůst mikroorganismů v extraktu 4 v PG



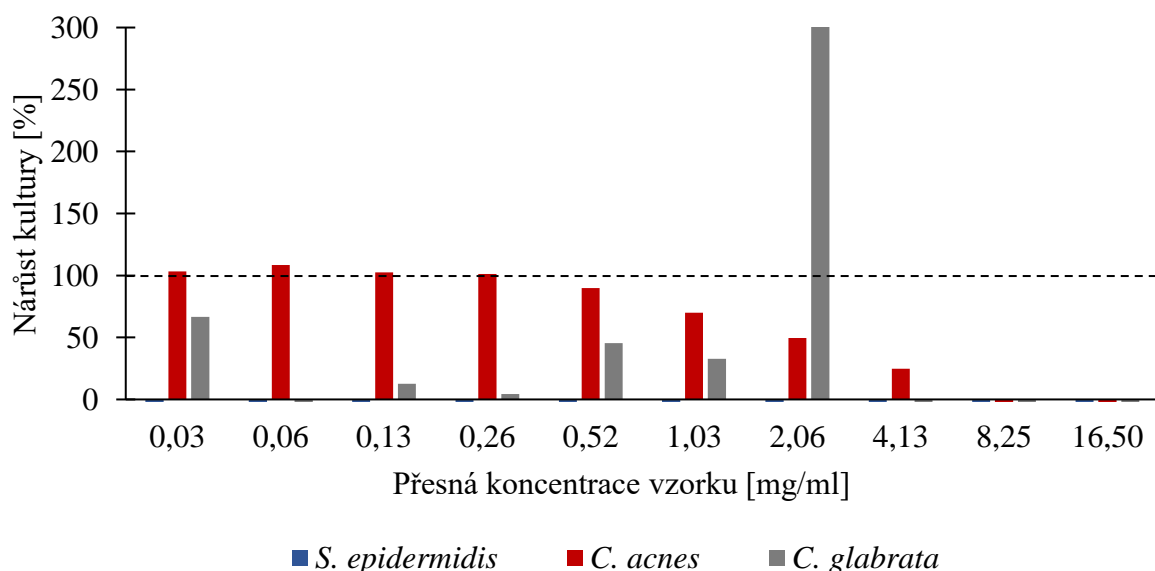
Obr. 41: Nárůst mikroorganismů v extraktu 5 v PG

Pro extrakt 2+5 v PG, který byl také použit ve finálním šamponu je nárůst *S. epidermidis* nulový (Obr. 42). Nepatrný nárůst *C. acnes* se projevil až při koncentraci 3,06 mg/ml, ale při nižších koncentracích dosahoval téměř 100% nárůstu. Nárůst *C. glabrata* se projevil až u koncentrace 0,38 mg/ml a pohyboval se do 70 %. Co se týče inhibičního účinku, vůči *S. epidermidis* byl zaznamenán při všech použitých koncentracích (MIC < 0,10 mg/ml). Vůči *C. acnes* i *C. glabrata* se projevil daleko menší inhibiční účinek, a to pouze do koncentrace 12,25 mg/ml (MIC = 12,25 mg/ml).



Obr. 42: Nárůst mikroorganismů v extraktu 2+5 v PG

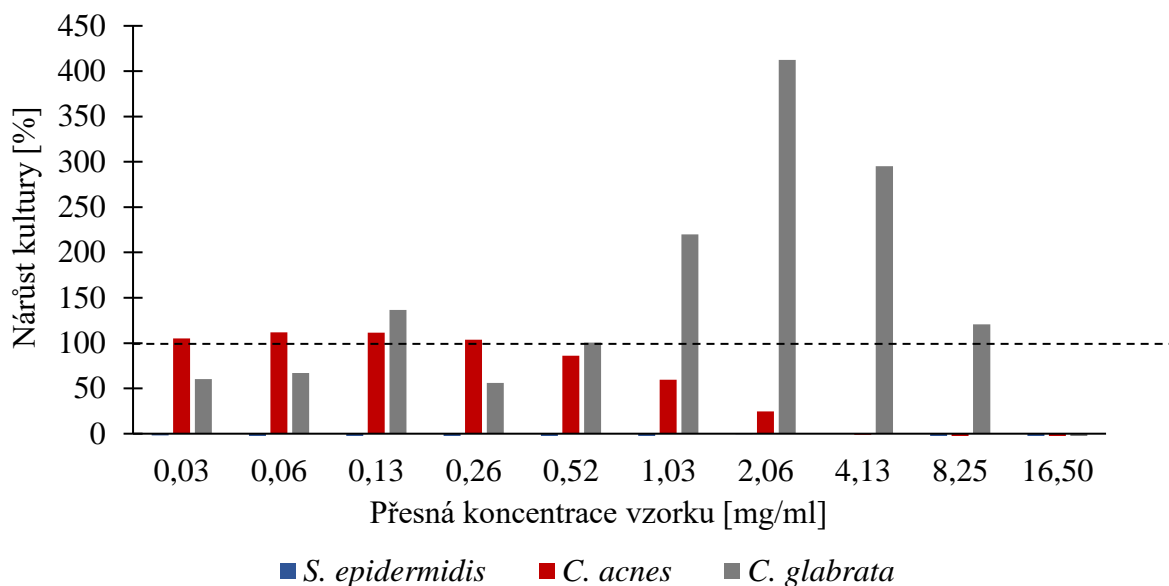
U extraktu 1 v DMSO byl nárůst *S. epidermidis* ve všech koncentracích nulový, jak je vidět na Obr. 43. Nárůst *C. acnes* v extraktu byl do koncentrace 8,25 mg/ml nulový. Následně začal narůstat, až se pohyboval u hranice 100 %. *C. glabrata* zaznamenala nejvyšší nárůst v extraktu při koncentraci 2,06 mg/ml, kde došlo k výraznému nárůstu kultury. Poté nárůst velmi klesl a byl do 60 %. Vůči *S. epidermidis* měl extrakt inhibiční účinek ve všech použitých koncentracích (MIC < 0,03 mg/ml). Pro *C. acnes* se inhibiční účinek projevil pouze u nejvyšší koncentrace (MIC = 16,50 mg/ml). U *C. glabrata* byl o jednu koncentraci vyšší (MIC = 8,25 mg/ml).



Obr. 43: Nárůst mikroorganismů v extraktu 1 v DMSO

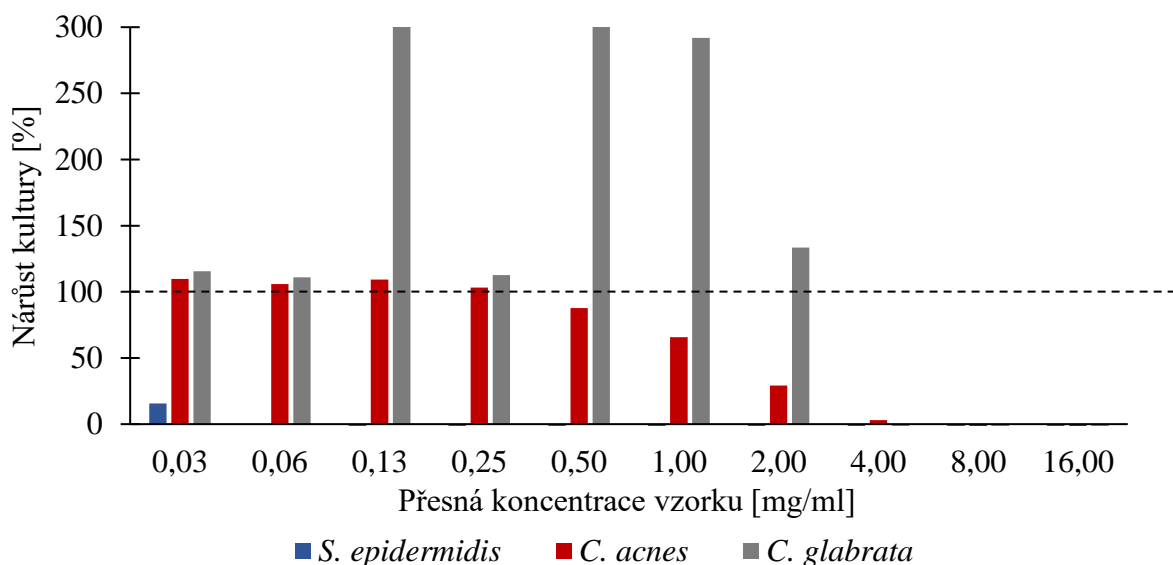
Také u extraktu 2 v DMSO (Obr. 44), jako v předchozích případech, byl nárůst *S. epidermidis* ve všech koncentracích nulový. Nárůst *C. acnes* byl do koncentrace 4,13 mg/ml nulový. Následně začal narůstat až se dostal přes hranici 100 %. Nárůst *C. glabrata* byl při

vyšších koncentracích vyšší než při nižších a výrazně překročil hranici 100 %. Nejvyšší nárůst byl při koncentraci 2,06 mg/ml, stejně jako u extraktu 1. Vůči *S. epidermidis* prokázal extrakt inhibiční účinek pro všechny koncentrace (MIC < 0,03 mg/ml). Vůči *C. acnes* měl nízký inhibiční účinek (MIC = 16,50 mg/ml) a vůči *C. glabrata* také (MIC = 8,25 mg/ml).



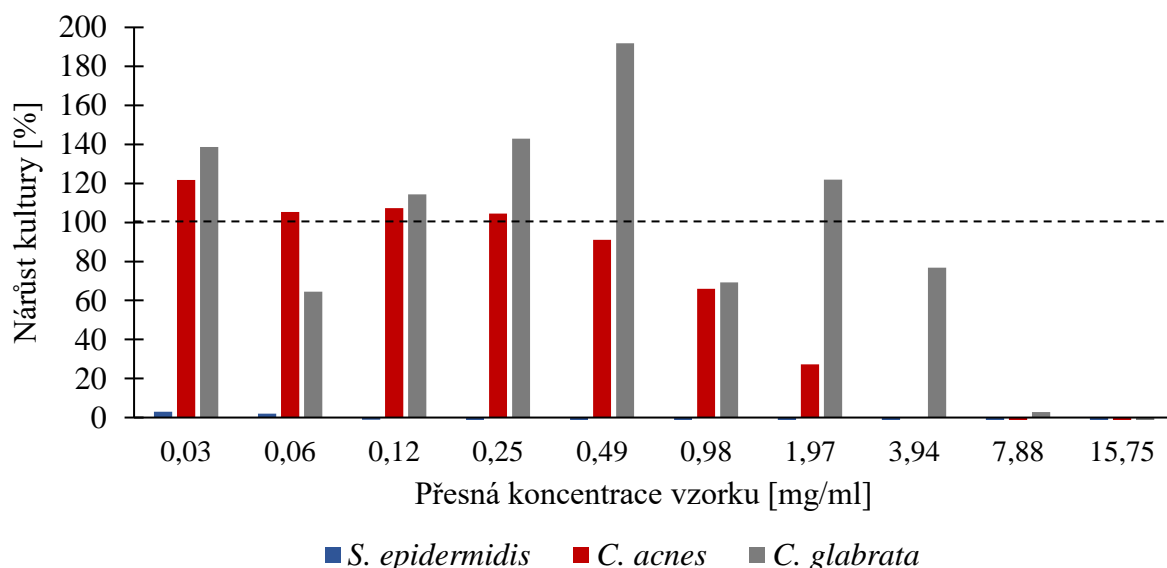
Obr. 44: Nárůst mikroorganismů v extraktu 2 v DMSO

I v extraktu 3 v DMSO byl nárůst *S. epidermidis* nulový (Obr. 45). Nejvyšší nárůst byl při nejnižší koncentraci (20 %). Nárůst *C. acnes* byl nejdříve nulový, následně začal lineárně růst, až při nižších koncentracích dosáhl hranice 100 %. Nejvyšší nárůst v extraktu měla *C. glabrata*. Při třech koncentracích byl její nárůst necelých 300 %. Při nejnižších koncentracích byl poté 100%. Vůči *S. epidermidis* byl zjištěn inhibiční účinek (MIC = 0,06 mg/ml). Vůči *C. acnes* se projevilo minimální inhibiční účinek, a to pouze při nejvyšší koncentraci (MIC = 16 mg/ml). U *C. glabrata* byl inhibiční účinek o trochu vyšší (MIC = 8 mg/ml).



Obr. 45: Nárůst mikroorganismů v extraktu 3 v DMSO

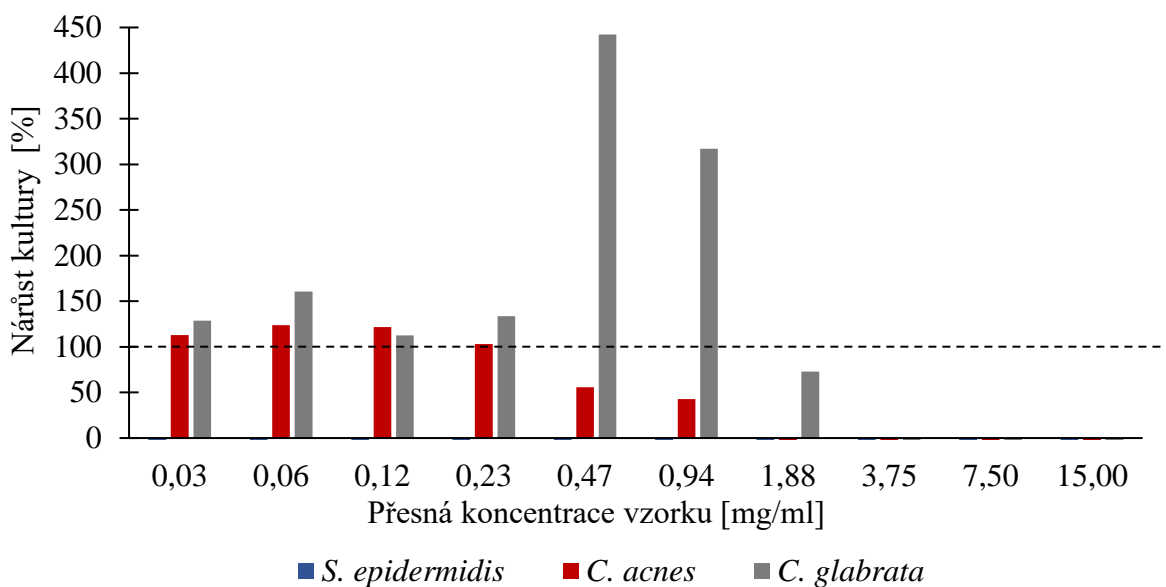
Na Obr. 46 je znázorněn nárůst kultur v extraktu 4 v DMSO. Kultura *C. acnes* od koncentrace 1,97 mg/ml postupně narůstala až překročila nárůst čisté kultury. Nejvyšší nárůsty byly zaznamenány u *C. glabrata*. Při koncentraci 0,49 mg/ml dosahoval nárůst téměř 200 %. I extrakt 4 v DMSO měl vůči *S. epidermidis* inhibiční účinek pro všechny koncentrace (MIC < 0,03 mg/ml). Vůči *C. acnes* byl pozorován pouze při nejvyšší koncentraci (MIC = 15,75 mg/ml). Vůči *C. glabrata* také nebyl silný inhibiční účinek (MIC = 7,88 mg/ml).



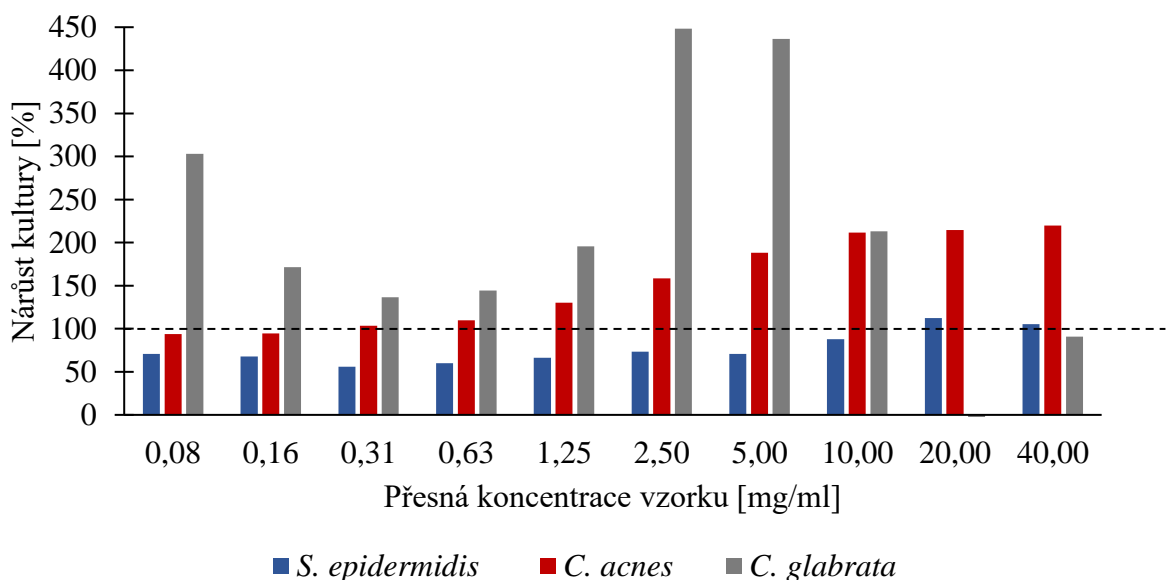
Obr. 46: Nárůst mikroorganismů v extraktu 4 v DMSO

U extraktu 5 v DMSO byl velmi podobný průběh nárůstu, jako u ostatních extraktů v DMSO. Na Obr. 47 můžeme vidět, že pro *S. epidermidis* byl nárůst nulový. U *C. acnes* při nižších koncentracích překračoval hranici 100 %. Při vyšších nebyl nárůst zaznamenán. Nejvyšší nárůst *C. glabrata* byl zaznamenán u koncentrace 0,47 mg/ml, kde dosahoval hodnoty 450 %. Ani extrakt 5 v DMSO nebyl výjimkou a prokázal se u něho inhibiční účinek vůči *S. epidermidis* ve všech koncentracích (MIC < 0,3 mg/ml). Vůči *C. acnes* byl inhibiční účinek pouze při nejvyšší koncentraci (MIC = 15 mg/ml) a ani vůči *C. glabrata* nemá extrakt příliš vysoký inhibiční účinek (MIC = 7,50 mg/ml).

U samotného konopného hydrolyzátu je z Obr. 48 patrné, že nemá silné inhibiční účinky ani vůči jednomu mikroorganismu, neboť u všech došlo k výraznému nárůstu kultury, která v mnoha případech překračovala hranici nárůstu čisté kultury. Všechny mikroorganismy dokázaly v hydrolyzátu přežít (MIC > 40 mg/ml) a dobře prospívat. Došlo zřejmě k využití některých složek hydrolyzátu jako živin. Konopný hydrolyzát je jediný, ve kterém dokázala přežít i bakterie *S. epidermidis*.

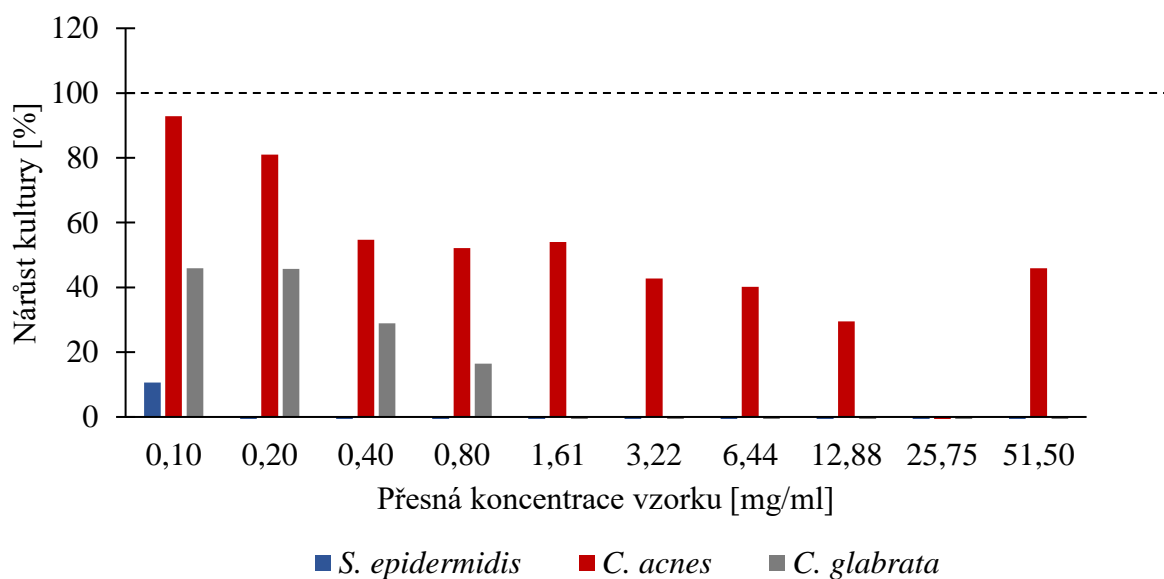


Obr. 47: Nárůst mikroorganismů v extraktu 5 v DMSO



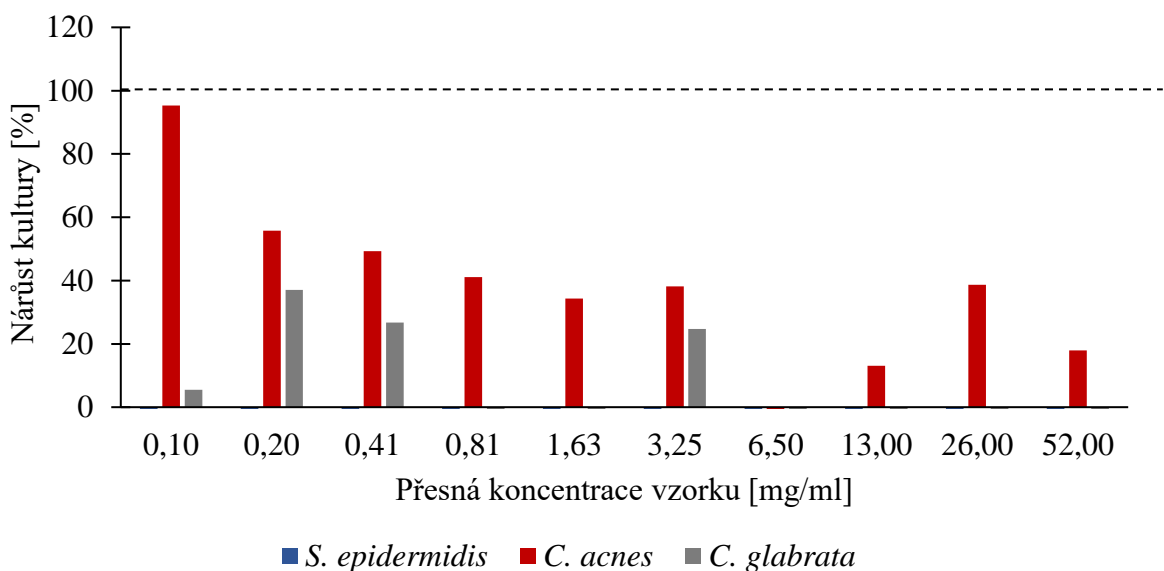
Obr. 48: Nárůst mikroorganismů v konopném hydrolyzátu

Na Obr. 49 je znázorněn nárůst kultur pro šampon s přidavkem konopného hydrolyzátu. Můžeme vidět, že nárůst *S. epidermidis* byl prokázán jen při koncentraci 0,10 mg/ml, ale pohyboval se okolo 10 %. Nejvyšší nárůst v šamponu byl prokázán u *C. acnes*, který při nejnižší koncentraci dosahoval hodnoty téměř 100 %, ale nedošlo k překročení. *C. glabrata* měl nižší nárůst, který se pohyboval v rozmezí 20–40 %, a to při nižších koncentracích. Při vyšších koncentracích nebyl nárůst *C. glabrata* prokázán. Vůči *S. epidermidis* šampon s konopným hydrolyzátem projevil vysoký inhibiční účinek (MIC = 0,20 mg/ml). Vůči *C. acnes* nebyl prokázán žádný inhibiční účinek (MIC > 51,50 mg/ml). Vůči *C. glabrata* byl prokázán minimální (MIC = 51,50 mg/ml).



Obr. 49: Nárůst mikroorganismů v šamponu s konopným hydrolyzátem

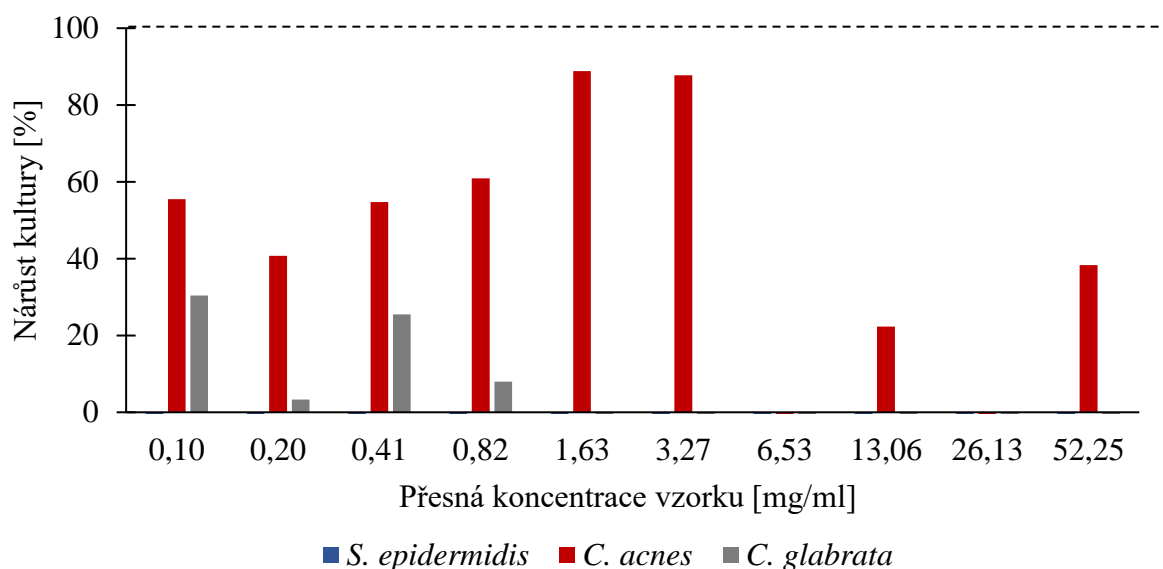
Nárůst všech mikroorganismů ve finálním šamponu je zobrazen na Obr. 50. Vůči *S. epidermidis* prokazoval silné účinky a nárůst *S. epidermidis* byl ve všech koncentracích nulový. Nárůst *C. acnes* je u většiny koncentrací v rozmezí 20–60 %. Nejvyšší nárůst byl zaznamenán u koncentrace 0,10 mg/ml, kde dosahoval téměř 100 %. *C. glabrata* neměl ve finálním šamponu vysoké nárůsty a pohybovaly se do 40 %. I finální šampon měl vůči *S. epidermidis* silný inhibiční účinek, jenž byl prokázán ve všech použitých koncentracích (MIC < 0,10 mg/ml). Vůči *C. acnes* se stejně jako u šamponu s hydrolyzátem neprojevil žádný inhibiční účinek (MIC > 52 mg/ml) a vůči *C. glabrata* byl velmi malý (MIC = 52 mg/ml).



Obr. 50: Nárůst mikroorganismů ve finálním šamponu

Ani šampon bez konopného hydrolyzátu nebyl výjimkou, a i zde nebyl prokázán nárůst *S. epidermidis* (Obr. 51). Nárůst *C. acnes* se při koncentracích 3,27 mg/ml a 1,63 mg/ml blížil k hranici 100 %. *C. glabrata* měl viditelný nárůst od koncentrace 0,82 mg/ml a pohyboval se

v rozmezí 10–30 %. Vůči *S. epidermidis* se projevilo inhibiční účinek (MIC = 0,20 mg/ml). Pro *C. acnes* nebyl jako v předchozích případech zaznamenán žádný inhibiční účinek (MIC > 52,25 mg/ml) a pro *C. glabrata* byl zaznamenán velmi malý (MIC = 52,25 mg/ml). Protože tento šampon neobsahoval ani konopný extrakt ani konopný hydrolyzát, byly veškeré inhibiční účinky způsobené přidaným konzervantem.



Obr. 51: Nárůst mikroorganismů v šamponu bez konopného hydrolyzátu

5.7.5 Ověření schopnosti buněk tvořit kolonie

Po změření absorbance po 24 hodinách byla každá jamka v destičce zaočkována pomocí sterilní kličky do agarů v Petriho misce pomocí papírové šablony. Následně byly vyhotovené misky dány na 24 hodin do termostatu při teplotě 37 °C.

Tato analýza doplňuje měření inhibičního účinku a je možné zjistit baktericidní účinek. I přesto, že byl v určité koncentraci poznamenán pokles kultury, neznamená to, že veškerá kultura byla úplně usmrcena a může se proto ve vhodnějším prostředí začít opět množit.

V tabulce 13 je znázorněna kontrola usmrcení *S. epidermidis* pro extrakty rozpuštěné v DMSO a v PG. U všech extraktů bylo shledáno, že bakterie byla usmrcena. U ethanolových extraktů rozpuštěných v DMSO i v PG se podařilo bakterii usmrtit ve všech použitých koncentracích. U tetrafluorethanových extraktů také došlo k usmrcení bakterie, ale ne pro nejvyšší koncentraci. Samotná rozpouštědla mají rozdílnou antimikrobiální aktivitu. U DMSO došlo k usmrcení kolonií pouze při nejvyšší koncentraci. Naproti tomu u PG se podařilo *S. epidermidis* usmrtit i při nižší koncentraci. Extrakty v DMSO mají vůči *S. epidermidis* vyšší antimikrobiální aktivitu, jelikož dokázaly bakterii usmrtit při nižších koncentracích než extrakty v PG.

I přesto, že u extraktů v PG byl při zákalové metodě zjištěn určitý nárůst kolonií, již nebyly natolik životaschopné, aby se v jiném prostředí opět namnožily, a došlo k jejich usmrcení, což bylo zjištěno i pomocí vizuálního pozorování resazurinu. U extraktu v DMSO byl při zákalové metodě spatřen nízký nárůst kultury pouze u nejvyšší koncentrace extraktu 3, který byl potvrzen i pozitivním zbarvením resazurinu.

Tabulka 13: Kontrola životaschopnosti *S. epidermidis* v extraktech v DMSO a v PG

Extrakt	MBC [mg/ml]	
	Extrakt v DMSO	Extrakt v PG 1:4
Extrakt 1 Santhica 70 (TFE)	0,06	0,15
Extrakt 2 Santhica 70 (EtOH)	< 0,03	< 0,09
Extrakt 3 Santhica 70 (TFE)	0,06	0,18
Extrakt 4 Futura 75 (EtOH)	< 0,03	< 0,1
Extrakt 5 Fibror 79 (EtOH)	< 0,03	< 0,1
Extrakt 2+5 Santhica 70 + Fibror 79 (EtOH)		< 0,1
rozpouštědlo	0,25	0,6

V tabulce 14 jsou hodnoty minimální baktericidní koncentrace pro samotný konopný hydrolyzát a šampony. Můžeme vidět, že samotný konopný hydrolyzát nedokázal *S. epidermidis* usmrtit ani v nejvyšší koncentraci a byla potvrzena životaschopnost bakterie. U šamponů již byla prokázána minimální baktericidní koncentrace a podařilo se *S. epidermidis* usmrtit téměř pro všechny použité koncentrace, poněvadž šampony obsahovaly konzervační látku, která dokázala bakterii usmrtit.

I přesto, že při zákalové metodě nebyl u finálního šamponu ani šamponu bez hydrolyzátu zjištěn nárůst bakterie při žádné koncentraci, která byla u finálního šamponu také vizuálně potvrzena negativním zbarvením resazurinu, dokázala se kultura v nejnižší koncentraci opět rozmnožit.

Tabulka 14: Kontrola životaschopnost *S. epidermidis* v konopném hydrolyzátu a šamponech

	MBC [mg/ml]
konopný hydrolyzát	> 40
šampon s hydrolyzátem	0,2
finální šampon	0,2
šampon bez hydrolyzátu	0,2

V tabulce 15 jsou zobrazeny výsledky ověření životaschopnosti *C. acnes* vůči extraktům v DMSO i v PG. Vidíme, že většina extraktů dokázala usmrtit kulturu pouze při nejvyšší koncentraci. Nejnižší MBC byla zjištěna pro extrakt 3 v PG. U extraktů v PG vidíme, že tetrafluorethanové extrakty měly nižší minimální baktericidní koncentraci než ethanolové extrakty. To znamená, že měly vyšší schopnost bakterii usmrtit. V porovnání rozpouštědel měly

vyšší antimikrobiální aktivitu extrakty v DMSO, neboť došlo k namnožení kolonií při nižších koncentracích.

Ve srovnání se zákalovou metodou u extraktů v PG byl u řady extraktů minimální nárůst při více koncentracích, což bylo zpozorováno i negativním zbarvením resazurinu. Nicméně po nanesení vzorků do jiného prostředí se dokázala bakterie u většiny koncentrací opět rozmnožit.

Tabulka 15: Kontrola životaschopnosti *C. acnes* v extraktech v DMSO a v PG

Extrakt	MBC [mg/ml]	
	Extrakt v DMSO	Extrakt v PG 1:4
Extrakt 1 Santhica 70 (TFE)	16,50	38
Extrakt 2 Santhica 70 (EtOH)	16,50	48
Extrakt 3 Santhica 70 (TFE)	16	22,50
Extrakt 4 Futura 75 (EtOH)	15,75	51
Extrakt 5 Fibror 79 (EtOH)	15	50
Extrakt 2+5 Santhica 70 + Fibror 79 (EtOH)		24,50
rozpouštědlo	0,25	0,25

Ani jeden ze šamponů ani samotný konopný hydrolyzát nedokázal *C. acnes* usmrtit úplně, jak je zobrazeno v tabulce 16. Ve všech případech došlo k tomu, že kultura narostla při každé koncentraci. I přesto, že při zákalové metodě byl pro šampony nárůst až do ředění 8× velmi nízký, téměř nulový, kolonie dokázaly přežít a opět se namnožit. I přesto, že šampony obsahovaly konzervant, nedokázaly kolonie usmrtit.

Tabulka 16: Kontrola životaschopnosti *C. acnes* v konopném hydrolyzátu a šamponech

	MBC [mg/ml]
konopný hydrolyzát	> 40
šampon s hydrolyzátem	> 51,50
finální šampon	> 52
šampon bez hydrolyzátu	> 52,25

V tabulce 17 je znázorněné ověření životaschopnosti *C. glabrata* pro extrakty rozpuštěné v DMSO i v PG. Můžeme vidět, že extrakty v DMSO dokázaly kvasinku usmrtit pouze při vyšších koncentracích. U extraktů v PG byla nejnižší minimální baktericidní koncentrace u extraktu 3. U samotných rozpouštědel můžeme vidět, že neměly silný antifugální účinek a podařilo se kolonie usmrtit jen při vysokých koncentracích.

U extraktů v DMSO bylo při zákalové metodě vidět, že se podařilo kulturu usmrtit při dvou nejvyšších koncentracích, což bylo vizuálně zpozorováno i při metodě s resazurinem. Po ověření životaschopnosti se prokázalo, že u některých extraktů se dokázaly kolonie v lepším prostředí rozmnožit.

Tabulka 17: Kontrola životaschopnosti *C. glabrata* v extraktech v DMSO a v PG

Extrakt	MBC [mg/ml]	
	Extrakt v DMSO	Extrakt v PG 1:4
Extrakt 1 Santhica 70 (TFE)	8,25	38
Extrakt 2 Santhica 70 (EtOH)	16,50	12
Extrakt 3 Santhica 70 (TFE)	16	5,63
Extrakt 4 Futura 75 (EtOH)	15,75	25,50
Extrakt 5 Fibror 79 (EtOH)	7,88	51
Extrakt 2+5 Santhica 70 + Fibror 79 (EtOH)		25
rozpuštědlo	0,25	0,13

U samotného konopného hydrolyzátu a jednotlivých šamponů se neprokázal vůči *C. glabrata* žádný antifugální účinek, jak zobrazuje tabulka 18. Kvasinka přežila ve všech použitých koncentracích. I přes to, že při zákalové metodě byl nárůst kultury u šamponů spatřen jen při nižších koncentracích a pohyboval se do 50 % a při vizuálním pozorování resazurinu bylo spatřeno negativní zbarvení, dokázala se *C. glabrata* ve vhodnějším prostředí opět namnožit.

Tabulka 18: Kontrola životaschopnosti *C. glabrata* v konopném hydrolyzátu a šamponech

	MBC [mg/ml]
konopný hydrolyzát	> 40
šampon s hydrolyzátem	> 51,50
finální šampon	> 52
šampon bez hydrolyzátu	> 52,25

5.8 Zátěžový test

Výsledky zátěžového testu jsou vyobrazeny v tabulce 19. U každého konzervantu je uvedeno, kolik kolonií bylo vloženo do jednoho gramu produktu a následně kolik kolonií obsahoval 1 g produktu v časech odběru 7, 14, 32 dnů. Poslední sloupec znázorňuje rozdíl mezi počátečním

počtem kolonií v produktu a konečným počtem, kde (-) znázorňuje úbytek kolonií a (+) nárůst kolonií.

Tabulka 19: Počáteční a zjištěné koncentrace mikroorganismů v jednotlivých konzervantech

Konzervant	Mikroorganismus	Počet KTJ dáno do produktu [KTJ/g]	T7 [KTJ/g]	T14 [KTJ/g]	T32 [KTJ/g]	Počet kolonií oproti původnímu vzorku
E-L. Green A 2%	<i>S. epidermidis</i>	230	15	310	0	(-)
E-L. Green C 2%			0	105	5	(-)
E-L. Green OR 2%			0	320	75	(-)
Cosgard 0,9%			5	395	295	(+)
Ecokons 0,9%			10	260	0	(-)
Euxyl K903 0,9%			4365	485	25	(-)
Fenoxyethanol 0,8%			20	445	5	(-)
E-L. Green A 2%	<i>E. coli</i>	130	63176	10	140	(+)
E-L. Green C 2%			5	0	590	(+)
E-L. Green OR 2%			80290	20	7820	(+)
Cosgard 0,9%			5	0	0	(-)
Ecokons 0,9%			0	0	10	(-)
Euxyl K903 0,9%			5	20	0	(-)
Fenoxyethanol 0,8%			0	0	0	(-)
E-L. Green A 2%	<i>C. glabrata</i>	654	0	20	0	(-)
E-L. Green C 2%			0	0	0	(-)
E-L. Green OR 2%			140	0	0	(-)
Cosgard 0,9%			890	20	0	(-)
Ecokons 0,9%			10	0	0	(-)
Euxyl K903 0,9%			1320	0	0	(-)
Fenoxyethanol 0,8%			410	0	0	(-)

Pro *S. epidermidis* došlo po 7 dnech u všech konzervantů, až na Euxyl K903 k poklesu kolonií. Bohužel při druhém odběru došlo u všech konzervantů k velkému nárůstu. Jediný Euxyl K903 měl při druhém odběru výrazný pokles oproti prvnímu odběru. Při posledním odběru došlo k poklesu a u dvou konzervantů (E-Leen Green A a Ecokons) došlo k úplnému usmrcení kolonií.

Pro *E. coli* většina konzervantů vykazovala velký úbytek kolonií, prakticky úplný. U Ecokons a Fenoxyethanol nebyla zjištěna přítomnost žádné kolonie při prvním odběru. Pouze E-Leen Green A a E-Leen Green OR měly tak velký nárůst, že jednotlivé kolonie nebylo možné spočítat. Proto byly na každé misce vyznačeny tři čtverce o obsahu 1 cm² a z jejich průměru následně spočítán obsah celé misky. Během druhého odběru u čtyř konzervantů (E-Leen Green C, Cosgard, Ecokons, Fenoxyethanol) nebyla spatřena žádná kolonie. Dokonce i u E-Leen Green A a E-Leen Green OR došlo k výraznému poklesu. Při posledním odběru u tří konzervantů (Fenoxyethanol, Euxyl K903, Cosgard) nebyla spatřena žádná kolonie.

Ecokons, u kterého se při druhém odběru neobjevila žádná kolonie, při posledním odběru vzrostl počet na 10 KTJ/g. Ještě větší nárůst při posledním odběru byl spatřen u konzervantu E-Leen Green C, u které byla při posledním odběru koncentrace 590 KTJ/g. Největší nárůst měl ale E-Leen Green OR, kde koncentrace vzrostla na 7820 KTJ/g.

Pro kvasinku *C. glabrata* při prvním odběru dva konzervanty (E-Leen Green A a E-Leen Green C (2%)) neobsahovaly žádnou kolonii. Nejvyšší množství kolonií při prvním odběru obsahoval Euxyl K903 (0,9%), kde jeho koncentrace byla 1320 KTJ/g. O něco vyšší nárůst, než byla původní koncentrace, měl Cosgard (0,9%), který při prvním odběru měl koncentraci 890 KTJ/g. Při druhém odběru už pouze u dvou konzervantů (E-Leen Green A a Cosgard) byly spatřeny kolonie. Co se týče Cosgardu, oproti prvním odběru došlo k výraznému poklesu a koncentrace byla 20 KTJ/g. U E-Leen Green A došlo k nárůstu. Při posledním odběru u žádného konzervantu nebyla spatřena žádná kolonie.

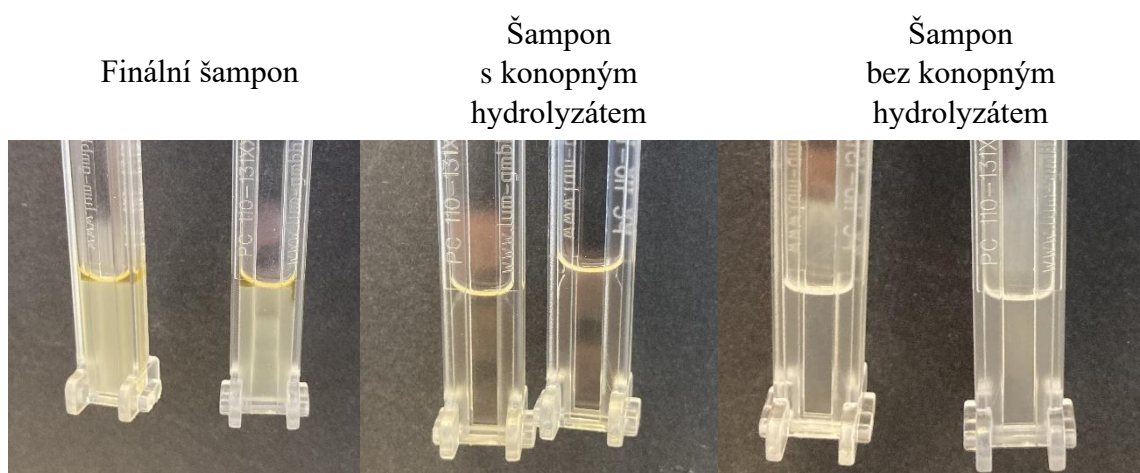
Při porovnání počtu kolonií na počátku a na konci zátěžového testu si můžeme všimnout, že pouze u Cosgardu byl zaznamenán nárůst kolonií pro *S. epidermidis* oproti původnímu počtu (295 KTJ/g). U *E. coli* byl nárůst zaznamenán pro tři konzervanty, a to E-Leen Green A (140 KTJ/g), E-Leen Green C (590 KTJ/g) a E-Leen Green OR (7820 KTJ/g). U *C. glabrata* došlo u všech konzervantů k poklesu, až k samému zabití kvasinky.

I přesto, že E-Leen Green A, C a OR byly do hydrolyzátu přidávány v nejvyšším procentu, u všech docházelo k nárůstu kolonií *E. coli*. Ostatní konzervanty, i přestože byly v nižším procentu, dokázaly snížit počet kolonií v produktu. Jako jeden z nejlepších konzervantů lze vyhodnotit Ecokons. I přesto, že při druhém odběru bakterii *S. epidermidis* výrazně zvýšily počet kolonií, při posledním odběru již byla miska čistá. U *E. coli* patřil také mezi nejlepší, stejně tak u *C. glabrata*.

5.9 Analytická centrifuga

Na analytické centrifuze byla testována koloidní stabilita šamponů. U šamponu, který neobsahuje konopný hydrolyzát bylo na první pohled v kyvetě vidět, že nedošlo k oddělení fází. U šamponu s konopným hydrolyzátem i finálního šamponu došlo k tomu, že konopný hydrolyzát, který v sobě obsahoval malé částičky, okem přehlédnutelné, se při vysoké odstředivé síle usadily na vrchu kyvety, jak je vidět na Obr. 52.

Pomocí programu, který vyhodnocuje výsledky z analytické centrifugy, byly získány hodnoty nestability. Čím je hodnota nestability nižší, tím je vzorek stabilnější. V tabulce 20 jsou zobrazeny hodnoty indexu nestability. Podle výsledků je finální šampon nejvíce stabilní. U šamponu bez hydrolyzátu je vidět, že index nestability je u každého vzorku jiný. To mohlo být způsobeno přítomností vzduchové bubliny na začátku měření.

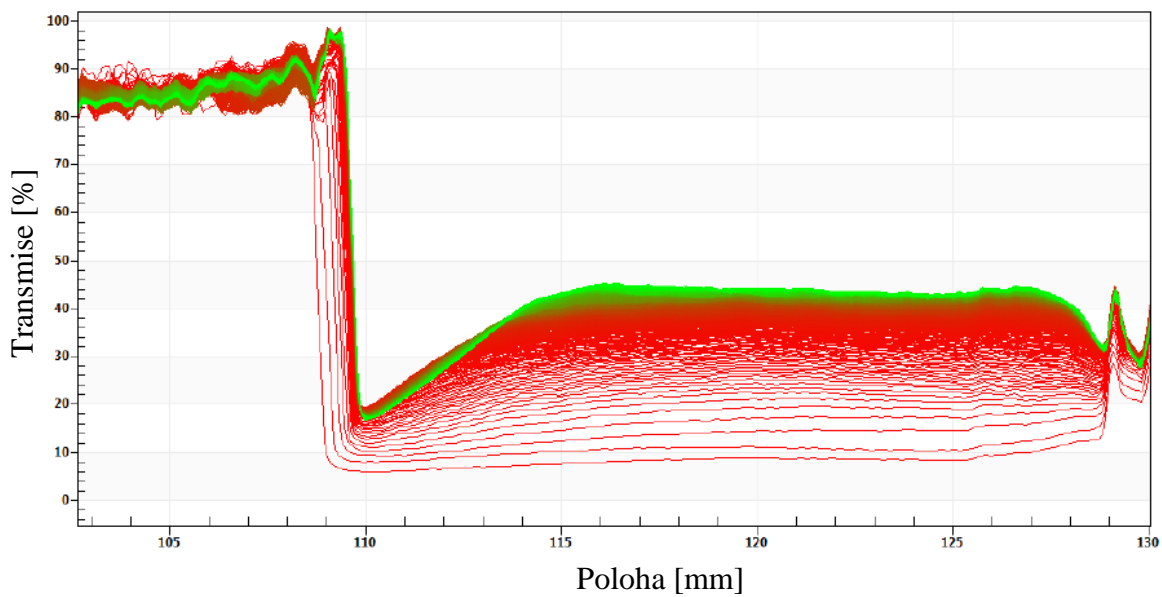


Obr. 52: Šampony v kyvetách po skončení odstředivého testu

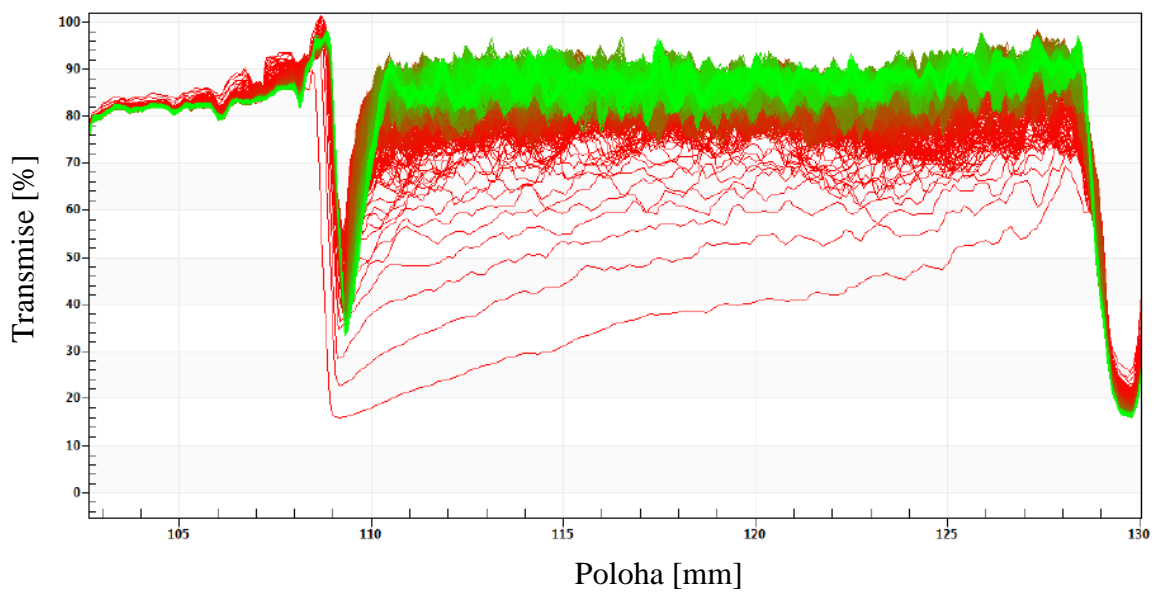
Tabulka 20: Index nestability pro testované šampony

Šampon	Index nestability
Finální šampon	0,400
Finální šampon	0,393
Šampon s hydrolyzátem	0,865
Šampon s hydrolyzátem	0,871
Šampon bez hydrolyzátu	0,334
Šampon bez hydrolyzátu	0,571

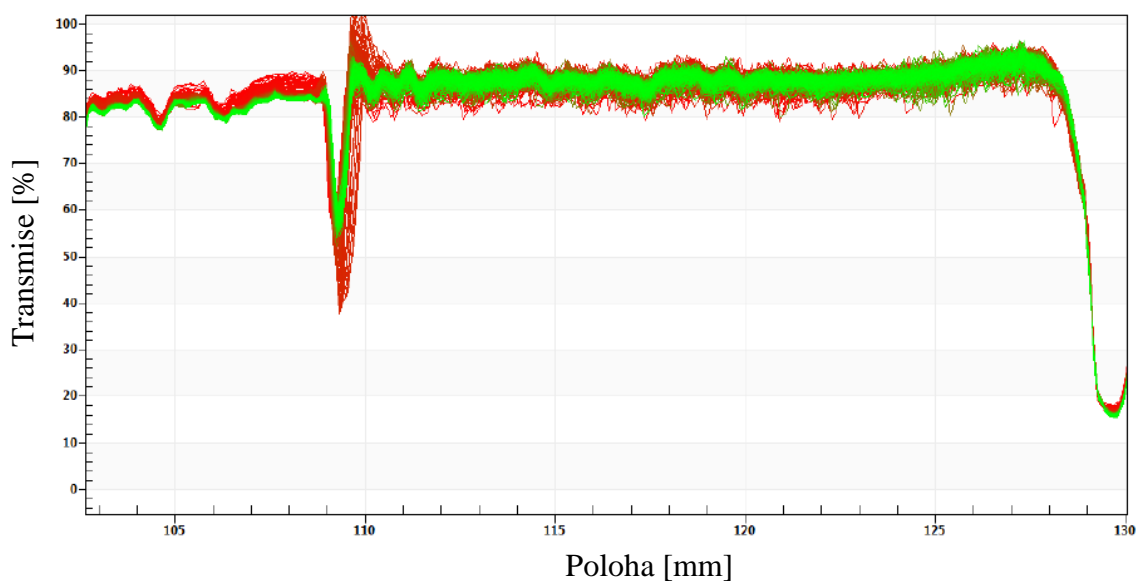
Také byly získány grafy v závislosti transmise paprsku na poloze. Nižší hodnota polohy (105 mm) odpovídá vršku kyvety a maximální hodnota (130 mm) odpovídá spodku kyvety. Zelené a červené křivky znázorňují čas, kdy nejdříve byly zaznamenávány červené křivky a zelené odpovídají poslednímu záznamu. Jestli se všechny křivky překrývají, nedošlo během analýzy k separaci ani sedimentaci. Pokud došlo během testu k sedimentaci nebo separaci, křivky budou od sebe oddělené, jak můžeme vidět na Obr. 53 a Obr. 54. Právě u finálního šamponu a šamponu s hydrolyzátem byla pozorována sedimentace konopného hydrolyzátu a došlo k rozptylu křivek již od nízkých hodnot, které odpovídají vršku kyvety, neboť se sedimenty usadily na vrchu. Šampon bez hydrolyzátu, který se zdá vizuálním pozorováním v kyvetě stabilní, na Obr. 55 vidíme, že k určitému oddělení při vršku kyvety také došlo.



Obr. 53: Závislost transmise na poloze v kyvetě – Finální šampon



Obr. 54: Závislost transmise na poloze v kyvetě – Šampon s hydrolyzátem



Obr. 55: Závislost transmise na poloze v kyvetě – Šampon bez hydrolyzátu

5.10 Zkouška surfaktantů

Podle postupu v kapitole 4.16.1 a tabulky 5 byly vždy připraveny směsi surfaktantů, které byly rozpuštěny ve vodě. U všech vzorků se vždy vytvořila pěna, ale ve většině případů byla velmi řídká a rychle spadla. Nejméně pěny se vytvořilo při zkoušce č. 5 (Obr. 56). Vytvořilo se jen malé množství pěny, která moc dlouho nevydržela. Pravděpodobně je to způsobeno tím, že surfaktant capryl/caprylyl glukosid má velmi dobré mycí schopnosti, ale jeho pěna není stabilní. I přes to, že byl capryl/caprylyl glukosid smíchán s coco glukosidem a decyl glukosidem, které zvyšují hustotu pěny, nebyla vytvořena dostatečně hustá pěna. Podobné výsledky poskytly i zkoušky č. 1, 4, 6, 8, 9, 10.

Nejlepší pěnu vytvořily zkoušky č. 2, 3, 7. U zkoušky č. 2 byly použity pouze neionogenní surfaktanty a zde se vytvořily i bublinky. Zkoušky č. 2 a 10, které obsahovaly stejné surfaktanty, ale v jiném procentuálním složení, vytvořily rozdílné pěny. Zde vyšla lépe zkouška č. 2, kde byl každý surfaktant zastoupen v 10 %.

Nejvíce pěny vytvořila zkouška č. 3, kde byly použity dva neionogenní a jeden aniontový surfaktant. Pěna byla velmi hustá a hned nepadla. Všechny tři surfaktanty samy o sobě vytváří bohatou krémovou pěnu, což se ještě jejich kombinací podpořilo. Následně byla tato kombinace surfaktantů použita do finálního šamponu na vlasy.



Obr. 56: Zkouška pěnivosti surfaktantů – nejlepší č.3 (nalevo) a nejhorší č.5 (napravo)

5.11 Senzorická analýza testovaného šamponu

Připravený šampon na vlasy s přidavkem konopného proteinu a konopných extraktů byl sensoricky hodnocený 10 respondenty (Tabulka 21). Testování probíhalo 14 dní a respondenti používali šampon podle instrukcí. Po uplynutí 14 dní respondenti hodnotili produkt pomocí dotazníku (Příloha 5), kde první otázky byly orientovány na získání informací, jak si respondenti běžně myjí vlasy a druhá část se týkala testovaného šamponu a jak respondentům vyhovoval.

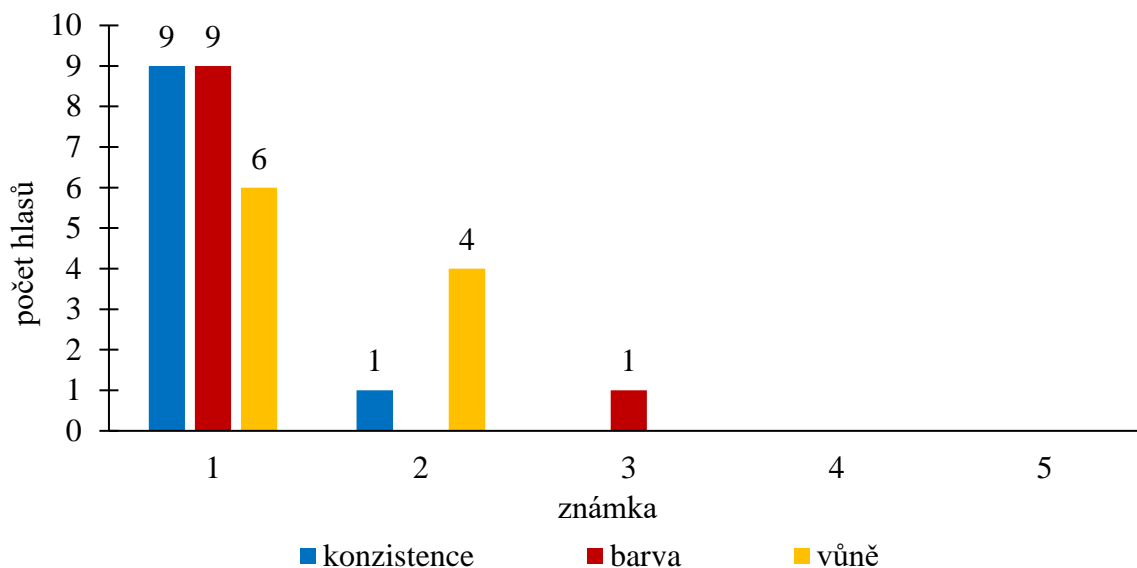
Tabulka 21: Základní informace o respondentech

Číslo respondenta	Pohlaví	Věk	Délka vlasů
1	muž	20–30	krátké
2	žena	20–30	po prsa
3	muž	20–30	krátké
4	žena	20–30	po prsa
5	žena	20–30	dlouhé (k pasu)
6	žena	více než 50	po ramena
7	muž	20–30	krátké
8	žena	více než 50	po ramena
9	žena	20–30	po ramena
10	žena	20–30	po prsa

Většina respondentů si myje vlasy 1–3× do týdne. Našly i se tací, kteří myjí vlasy téměř každý den a u některých je to pro každý týden jiné. Také nanášení je rozdílné. Někdo nanáší šampon při každém mytí dvakrát, někdo pouze jednou. U většiny respondentů je rozhodující při výběru šamponu především složení. Během testování si všichni respondenti, až na jednoho, umyli vlasy celkem minimálně 5×.

V další části měli respondenti hodnotit na škále 1–5 konzistenci, barvu a vůni šamponu. Hodnota 1 znázorňovala nejlepší (výborná) a hodnota 5 nejhorší (nedostačující). Všichni

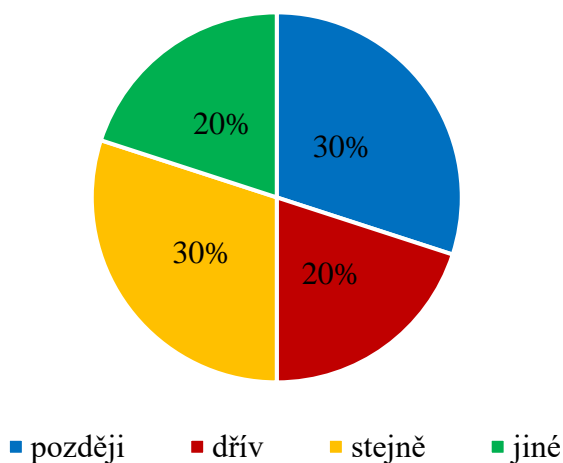
hodnotili vzhled šamponu pozitivně. U většiny dostal šampon ve všech oblastech známku výbornou. Výsledky hodnocení zobrazuje Obr. 57.



Obr. 57: Počet hlasů respondentů při hodnocení vzhledu testovacího šamponu

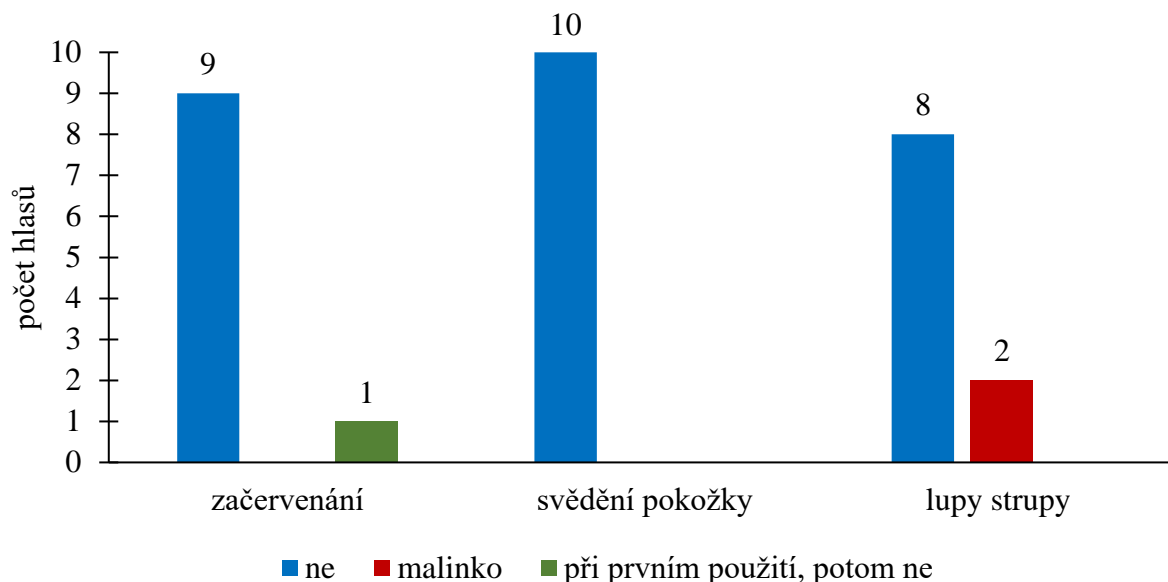
Co se týče pěnivosti samotného šamponu, podle 8 lidí z 10 pěnil šampon dostatečně na druhé nanesení. U jednoho respondenta napěnil šampon už na první použití. Bohužel jeden respondent měl problém napěnit šampon i při druhém mytí. Různá pěnivost na vlasech může být způsobena rozdílnými vlastnostmi a typy vlasů. Respondent konzultoval způsob mytí vlasů, ale bohužel i při dodržení veškerých pokynů, které u ostatních respondentů byly účinné, nepodařilo se šampon dostatečně napěnit.

U šamponu se projeví i dobré čistící vlastnosti. Na Obr. 58 vidíme, že u 60 % respondentů měl šampon pozitivní odezvu, kde se vlasy mastily buď za delší dobu, nebo za podobnou jako s obvyklým produktem. U 20 % se vlasy mastily dříve a u zbylých se nedalo přesně určit. Jeden z respondentů trávil během testování určitý čas v posilovně a vlasy se dost potily. Druhému respondentovi se vlasy nemastí ani s běžnými produkty.



Obr. 58: Počet procent respondentů při odmast'ovacích účinkách testovacího šamponu

U žádného z respondentů se neprojeví větší negativní účinky, jak vyobrazuje Obr. 59. Pouze u jednoho z deseti respondentů se objevilo začervenání při prvním použití. Při následujícím používání již začervenání nebylo sledováno. U dvou respondentů se objevily stroupky a lupy. Testovací šampon jim na pokožku hlavy nemusel tolik vyhovovat a mohlo docházet k vysušování.



Obr. 59: Počet hlasů respondentů pro jednotlivé negativní účinky

Po uplynutí testovací doby se u většiny respondentů objevilo kladné hodnocení na celkový vzhled vlasů. Šest respondentů mělo pocit, že jsou vlasy pevnější a zacelenější. Někteří měli pocit, že jsou vlasy méně vysušené po umytí a měli pocit čistších vlasů. U jednoho respondenta nebyla sledována žádná změna a jeden měl pocit, že jeho vlasy nejsou tak nadýchané, jak bývají při používání běžného šamponu.

Při otázce „co by respondenti na šamponu vylepšili“ bylo nejvíce hlasů pro vůni (3 hlasy). Do šamponu byl přidán konzervant Ekokons, který je vyroben z citrusů a sám má citrusový nádech, tedy již do šamponu nebyl přidáván žádný esenciální olej a je možné, že každému citrusová vůně vyhovovala. Jeden respondent by také rád změnil barvu šamponu.

Na závěr se respondenti měli rozhodnout, zda by měli zájem šampon používat i nadále a všech deset respondentů by i nadále šampon chtělo používat. Na šamponu by se dalo mnoho věcí vylepšit. Například zaměřit se na jinou kombinaci surfaktantů a pokusit se, aby všem šampon pění dostatečně a neměli žádné alergické reakce. Z estetického hlediska by bylo možné šampon také ještě více vylepšit a přidat vůni, kterou by si respondenti vybrali. Bohužel každý člověk má jiné vlasy a jinou pokožku a nelze dosáhnout toho, aby určitý produkt osobní péče vyhovoval všem. Z toho důvodu máme v kosmetických produktech tak velký výběr, aby každý našel pro sebe to nejvhodnější.

6 ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývá možnostmi využití vybraných frakcí technického konopí v kosmetice. Teoretická část se zabývá charakteristikou samotné rostliny, jejím využitím, průmyslovým zpracováním a přehledem jednotlivých biologicky aktivních látek v ní obsažených. V experimentální části byl zjišťován celkový obsah antioxidantů, fenolických látek, flavonoidů, chlorofylů a kanabinoidů v pěti průmyslových extraktech, na které byly použity dva typy extrahovadel (ethanol, tetrafluorethan). Následně byly čisté vzorky zředěny dimethylsulfoxidem. V další části byl připraven šampon na vlasy s přídavkem konopných extraktů rozpuštěných v pentylenglykolu a konopného hydrolyzátu. U šamponu byla provedena senzorická analýza s cílem zjistit, zda má šampon určité pozitivní účinky na vlasy. Nakonec byl stanoven antimikrobiální a antifugální účinek extraktů rozpuštěných v pentylenglykolu a dimethylsulfoxidu a také u samotného konopného hydrolyzátu a šamponu.

U extraktů byl stanoven obsah antioxidantů, chlorofylů, fenolických látek, flavonoidů a obsah kanabinoidů. Z hlediska rozdílných extrahovadel, nejvíce biologicky aktivních látek bylo stanoveno v ethanolových extraktech. U tetrafluorethanových extraktů bylo identifikováno pouze větší množství chlorofylu. Nejvíce antioxidantů bylo nalezeno v odrůdě Fedora 75 (0,456 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Nejvíce polyfenolů obsahovala odrůda Fibror 79 (0,108 mg/mg). Nejvíce flavonoidů bylo stanoveno v odrůdě Santhica 70 (0,0943 mg/mg). Při porovnávání dvou extraktů z odrůdy Santhica 70 v tetrafluorethanu byly zjištěny rozdílné hodnoty. To bylo způsobeno tím, že každý extrakt byl připraven z jiného ročníku a obsah látek se může vlivem klimatických podmínek lišit. Nejvyšší celkový obsah kanabinoidů byl stanoven v odrůdě Fibror 79 (722,91 $\mu\text{g}/\text{mg}$), která měla nejvyšší zastoupení kanabinoidu CBD. Nejbohatší odrůda na CBG je Santhica 70 (457,4 $\mu\text{g}/\text{mg}$).

V další části byl připraven šampon na vlasy s přídavkem konopného hydrolyzátu a konopných extraktů rozpuštěných v pentylenglykolu. Pomocí Kjeldahlovy metody byl stanoven obsah proteinu (celkového dusíku) v našem hydrolyzátu (12,27 %). Extrakty byly do šamponu použity dva, a to ty, které obsahovaly nejvyšší množství biologicky aktivních látek. Aby měl šampon i dobré pěnové schopnosti, byl proveden test pěnivosti. Kombinace surfaktantů, která vykazovala nejvyšší pěnivost, byla následně použita i do výsledného produktu. Tento šampon testovalo 10 respondentů po dobu 14 dnů, kteří následně hodnotili tento produkt. U většiny došlo k pozitivním účinkům na vlasy. Také by měli zájem tento šampon používat i nadále. Výsledný šampon byl také analyzován na koloidní stabilitu na analytické centrifuze. Zde ale došlo k oddělení malých částecek obsažených v konopném hydrolyzátu.

Pro správný výběr konzervantu do šamponu byl proveden test konzervace na sedmi konzervantech v konopném hydrolyzátu. Nejlepší konzervační účinky se projevíly u konzervantu Ekokons, který dokázal u testovaných mikroorganismů snižovat jejich počet kolonií, až u druhů *Candida glabrata* a *Staphylococcus epidermidis* došlo po 32 dnech k úplnému zahynutí kultury. I vůči *E. coli* vykázal velký pokles oproti jiným konzervantům.

Nakonec byly provedeny antimikrobiální testy, kde bylo prokázáno, že extrakty mají antimikrobiální účinek. Vůči *Staphylococcus epidermidis* byl inhibiční účinek prokázán jak u extraktů rozpuštěných v dimethylsulfoxidu, tak v pentylenglykolu. Podařilo se inhibovat bakterii téměř ve všech použitých koncentracích. Bylo zjištěno, že u extraktů rozpuštěných v pentylenglykolu i dimethylsulfoxidu mají ethanolové extrakty silnější antimikrobiální účinek

než tetrafluorethanové. Nicméně extrakty v dimethylsulfoxidu měly ještě o něco vyšší antimikrobiální účinek, protože dokázaly bakterii usmrtit v nižších koncentracích než extrakty rozpuštěné v pentylenglykolu. Vůči bakterii *Cutibacterium acnes* byl antimikrobiální účinek extraktů mnohem nižší a ve většině koncentracích se podařilo bakterii přežít. Silnější antibakteriální účinek byl ale vůči *Cutibacterium acnes* prokázán v extraktech rozpuštěných v dimethylsulfoxidu, kde u všech extraktů byla minimální baktericidní koncentrace 16 mg/ml. U extraktů rozpuštěných v pentylenglykolu byl prokázán vyšší antibakteriální účinek u extraktů z odrůdy *Santhica 70*. V porovnání extrahovadel měly vyšší účinky tetrafluorethanové extrakty než ethanolové. Vůči kvasince *C. glabrata* se projevíly minimální inhibiční účinky u extraktů v PG i DMSO. Ve většině extraktech došlo k nárůstu kultury a docházelo zřejmě k utilizaci některých složek v extraktech jako živin. U finálního šamponu se prokázaly antibakteriální účinky pouze vůči *Staphylococcus epidermidis*. Jak bakterie *Cutibacterium acnes*, tak kvasinka *Candida glabrata* dokázala v šamponu přežít. U samotného konopného hydrolyzátu nebyla ani vůči jednomu mikroorganismu prokázána antimikrobiální ani antifugální aktivita. U vyrobených šamponů na vlasy byla detekována určitá antimikrobiální i antifugální aktivita. U finálního šamponu můžeme inhibiční účinky přiřadit ke konopným extraktům, které šampon obsahoval. Nicméně tato aktivita byla nejspíše u všech šamponů způsobena konzervantem.

Závěrem můžeme potvrdit, že konopí seté je velmi všestranná rostlina, která obsahuje množství biologicky aktivních látek. Velmi ovšem záleží jak na odrůdě, roku sběru rostliny, tak i následně na extrahovačce. V rámci vlasové kosmetiky se projevíly pozitivní účinky při přidání konopného hydrolyzátu a extraktu do produktu. Tím by se po potřebné optimalizaci mohlo rozšířit na trhu portfolio výrobků s obsahem konopných složek o produkt s komplexním biologickým účinkem.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] STRZELCZYK, Malgorzata, Malgorzata LOCHYNSKA a Magdalena CHUDY. Systematics and Botanical Characteristics of Industrial Hemp Cannabis Sativa L. <https://doi.org/10.1080/15440478.2021.1889443> [online]. 2021, 1–23 [vid. 2022-03-10]. ISSN 1544-0478. Dostupné z: doi:10.1080/15440478.2021.1889443
- [2] MNEKIN, Léonid a Lionel RIPOLL. Topical Use of Cannabis sativa L. Biochemicals. *Cosmetics 2021, Vol. 8, Page 85* [online]. 2021, **8**(3), 85 [vid. 2023-01-22]. ISSN 2079-9284. Dostupné z: doi:10.3390/COSMETICS8030085
- [3] VÁGI, Erika, Margit BALÁZS, Attila KOMOCZI, Máté MIHALOVITS a Edit SZÉKELY. Fractionation of phytocannabinoids from industrial hemp residues with high-pressure technologies. *The Journal of Supercritical Fluids* [online]. 2020, **164**, 104898 [vid. 2022-03-08]. ISSN 0896-8446. Dostupné z: doi:10.1016/J.SUPFLU.2020.104898
- [4] *Cannabis sativa Pflanze Kostenloses Stock Bild - Public Domain Pictures* [online]. [vid. 2023-03-23]. Dostupné z: <https://www.publicdomainpictures.net/de/view-image.php?image=91240&picture=cannabis-sativa-pflanze>
- [5] LIU, Yi, Hong Yan LIU, Sheng Hong LI, Wei MA, Ding Tao WU, Hua Bin LI, Ai Ping XIAO, Liang Liang LIU, Fan ZHU a Ren You GAN. Cannabis sativa bioactive compounds and their extraction, separation, purification, and identification technologies: An updated review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2022, **149**, 116554 [vid. 2022-03-09]. ISSN 0165-9936. Dostupné z: doi:10.1016/J.TRAC.2022.116554
- [6] PREEDY, Victor R. *Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment*. 1. vyd. 2017. ISBN 0128007567.
- [7] HEMP SEED CATALOGUE EU REGISTERED VARIETIES [online]. 2022, 12 [vid. 2023-05-01]. Dostupné z: <https://hempoint.cz/wp-content/uploads/2022/01/Hemp-seeds-2022.pdf>
- [8] KOLTAI, Hinanit a Dvora NAMDAR. Cannabis Phytomolecule „Entourage“: From Domestication to Medical Use. *Trends in Plant Science* [online]. 2020, **25**(10), 976–984 [vid. 2022-03-08]. ISSN 1360-1385. Dostupné z: doi:10.1016/J.TPLANTS.2020.04.007
- [9] BAKOWSKA-BARCZAK, Anna, Tomasz POPEK, Yussef ESPARZA a Harmandeep KAUR. Industrial hemp-based dietary supplements and cosmetic products. *Industrial Hemp: Food and Nutraceutical Applications* [online]. 2022, 247–299 [vid. 2023-01-22]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-90910-5.00010-5
- [10] VASANTHA RUPASINGHE, H. P., Amy DAVIS, Shanthanu K. KUMAR, Beth MURRAY a Valtcho D. ZHELJAZKOV. Industrial Hemp (Cannabis

- sativa subsp. sativa) as an Emerging Source for Value-Added Functional Food Ingredients and Nutraceuticals. *Molecules* [online]. 2020, **25**(18) [vid. 2023-02-11]. ISSN 14203049. Dostupné z: doi:10.3390/MOLECULES25184078
- [11] OSEYKO, Mykola, Nataliia SOVA, Maryna LUTSENKO a Viktoriia KALYNA. Chemical aspects of the composition of industrial hemp seed products. *Ukrainian Food Journal* [online]. 2019, **8**(3), 544–559 [vid. 2022-05-16]. ISSN 23135891. Dostupné z: doi:10.24263/2304-974X-2019-8-3-11
- [12] HUSSAIN, Tajammul, Ganga JEENA, Thanet PITAKBUT, Nikolay VASILEV a Oliver KAYSER. Cannabis sativa research trends, challenges, and new-age perspectives. *iScience* [online]. 2021, **24**(12), 103391 [vid. 2023-02-04]. ISSN 2589-0042. Dostupné z: doi:10.1016/J.ISCI.2021.103391
- [13] SANTOS-SÁNCHEZ, Guillermo, Ana Isabel ÁLVAREZ-LÓPEZ, Eduardo PONCE-ESPAÑA, Antonio CARRILLO-VICO, Carlotta BOLLATI, Martina BARTOLOMEI, Carmen LAMMI a Ivan CRUZ-CHAMORRO. Hempseed (*Cannabis sativa*) protein hydrolysates: A valuable source of bioactive peptides with pleiotropic health-promoting effects. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2022, **127**, 303–318 [vid. 2023-02-09]. ISSN 0924-2244. Dostupné z: doi:10.1016/J.TIFS.2022.06.005
- [14] FARINON, Barbara, Romina MOLINARI, Lara COSTANTINI a Nicolò MERENDINO. The Seed of Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.): Nutritional Quality and Potential Functionality for Human Health and Nutrition. *Nutrients* 2020, Vol. 12, Page 1935 [online]. 2020, **12**(7), 1935 [vid. 2023-02-25]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/NU12071935
- [15] *hemp / Description, Products, Seeds, Fiber, & Uses / Britannica* [online]. [vid. 2022-05-16]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/plant/hemp>
- [16] MUSSIG JORG, Stevens Christia. *Industrial Applications of Natural Fibres: Structure, Properties and Technical Applications (Wiley Series in Renewable Resource)*. 1. vyd. B.m.: Wiley, 2010. ISBN 0470695080.
- [17] GLIVAR, Taja, Jan ERŽEN, Samo KREFT, Marjeta ZAGOŽEN, Andreja ČERENAK, Barbara ČEH a Eva TAVČAR BENKOVIĆ. Cannabinoid content in industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) varieties grown in Slovenia. *Industrial Crops and Products* [online]. 2020, **145**, 112082 [vid. 2023-02-11]. ISSN 0926-6690. Dostupné z: doi:10.1016/J.INDCROP.2019.112082
- [18] POJIĆ, Milica, Aleksandra MIŠAN, Marijana SAKAČ, Tamara Dapčević HADNACROSSED D SIGNEV, Bojana ŠARIĆ, Ivan MILOVANOVIĆ a Miroslav HADNACROSSED D SIGNEV. Characterization of byproducts originating from hemp oil processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2014, **62**(51), 12346–12442 [vid. 2023-03-23]. ISSN 15205118. Dostupné z: doi:10.1021/JF5044426/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2014-044426_0002.JPEG

- [19] DEVI, Vibha a Shabina KHANAM. Comparative study of different extraction processes for hemp (*Cannabis sativa*) seed oil considering physical, chemical and industrial-scale economic aspects. *Journal of Cleaner Production* [online]. 2019, **207**, 645–657 [vid. 2022-03-09]. ISSN 0959-6526. Dostupné z: doi:10.1016/J.JCLEPRO.2018.10.036
- [20] TANG, Chuan He, Zi TEN, Xian Sheng WANG a Xiao Quan YANG. Physicochemical and functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2006, **54**(23), 8945–8950 [vid. 2023-02-12]. ISSN 00218561. Dostupné z: doi:10.1021/JF0619176/ASSET/IMAGES/LARGE/JF0619176F00005.JPEG
- [21] *Hemp in Food FAQs | Minnesota Department of Agriculture* [online]. [vid. 2023-02-19]. Dostupné z: <https://www.mda.state.mn.us/food-feed/hemp-food-faqs>
- [22] PERTWEE, Roger G. *Handbook of Cannabis*. 1. vyd. B.m.: Oxford University Press, 2014. ISBN 0199662681.
- [23] MONTERO, Lidia, Sven W. MECKELMANN, Hyerin KIM, Juan F. AYALA-CABRERA a Oliver J. SCHMITZ. Differentiation of industrial hemp strains by their cannabinoid and phenolic compounds using LC × LC-HRMS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2022, **414**(18), 5445–5459 [vid. 2023-02-11]. ISSN 16182650. Dostupné z: doi:10.1007/S00216-022-03925-8/TABLES/2
- [24] *Chemical formulas of natural cannabinoids Vector Image* [online]. [vid. 2023-02-22]. Dostupné z: <https://www.vectorstock.com/royalty-free-vector/chemical-formulas-of-natural-cannabinoids-vector-3737996>
- [25] MORENO, Teresa, Fernando MONTANES, Stephen J. TALLON, Tina FENTON a Jerry W. KING. Extraction of cannabinoids from hemp (*Cannabis sativa* L.) using high pressure solvents: An overview of different processing options. *The Journal of Supercritical Fluids* [online]. 2020, **161**, 104850 [vid. 2022-04-20]. ISSN 0896-8446. Dostupné z: doi:10.1016/J.SUPFLU.2020.104850
- [26] *Structures of the main endocannabinoids, anandamide and 2-AG, which... | Download Scientific Diagram* [online]. [vid. 2023-03-23]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Structures-of-the-main-endocannabinoids-anandamide-and-2-AG-which-bind-to-CB1-and-CB2_fig1_266945311
- [27] ANDRE, Christelle M., Jean Francois HAUSMAN a Gea GUERRIERO. *Cannabis sativa*: The plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2016, **7**(FEB2016), 19 [vid. 2023-02-11]. ISSN 1664462X. Dostupné z: doi:10.3389/FPLS.2016.00019/BIBTEX
- [28] IZZO, Luana, Luigi CASTALDO, Alfonso NARVÁEZ, Giulia GRAZIANI, Anna GASPARI, Yelko RODRÍGUEZ-CARRASCO a Alberto RITIENI. Analysis of Phenolic Compounds in Commercial *Cannabis sativa* L.

- Inflorescences Using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 631 [online]. 2020, **25**(3), 631 [vid. 2023-02-11]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/MOLECULES25030631
- [29] LOWE, Henry, Blair STEELE, Joseph BRYANT, Ngeh TOYANG a Wilfred NGWA. Non-Cannabinoid Metabolites of Cannabis sativa L. with Therapeutic Potential. *Plants* 2021, Vol. 10, Page 400 [online]. 2021, **10**(2), 400 [vid. 2023-02-12]. ISSN 2223-7747. Dostupné z: doi:10.3390/PLANTS10020400
- [30] TURA, Matilde, Diana ANSORENA, Iciar ASTIASARÁN, Mara MANDRIOLI a Tullia Gallina TOSCHI. Evaluation of Hemp Seed Oils Stability under Accelerated Storage Test. *Antioxidants* [online]. 2022, **11**(3), 490 [vid. 2023-02-26]. ISSN 20763921. Dostupné z: doi:10.3390/ANTIOX11030490/S1
- [31] VISWANATHAN, Mothi Bharath, Kiyoul PARK, Ming Hsun CHENG, Edgar B. CAHOON, Ismail DWEIKAT, Tom CLEMENTE a Vijay SINGH. Variability in structural carbohydrates, lipid composition, and cellulosic sugar production from industrial hemp varieties. *Industrial Crops and Products* [online]. 2020, **157**, 112906 [vid. 2023-02-12]. ISSN 0926-6690. Dostupné z: doi:10.1016/J.INDCROP.2020.112906
- [32] FICHEUX, Anne Sophie, Marie Pierre GOMEZ-BERRADA, Alain Claude ROUDOT a Pierre Jacques FERRET. Consumption and exposure to finished cosmetic products: A systematic review. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2019, **124**, 280–299 [vid. 2023-02-22]. ISSN 0278-6915. Dostupné z: doi:10.1016/J.FCT.2018.11.060
- [33] *Emulsifier for Cosmetic - Types, Uses , Benefits & Limitations* [online]. [vid. 2023-02-11]. Dostupné z: <https://cosmetics.specialchem.com/selection-guide/emulsifiers-selection-for-cosmetics>
- [34] ANDRE BAREL, HOWARD I. MAIBACH, Andre O. Barel. *Handbook of Cosmetic Science and Technology, Second Edition*. 3. vyd. B.m.: Informa Healthcare, 2009. ISBN 1420069632.
- [35] KRS, Václav. *Materiály I*. 1. vyd. 2001. ISBN 80-86073-73-4.
- [36] DAVE, Nikunj a Tejas JOSHI. A Concise Review on Surfactants and Its Significance. *International Journal of Applied Chemistry* [online]. 2017, **13**(3), 663–672 [vid. 2023-03-18]. ISSN 09731792. Dostupné z: doi:10.37622/IJAC/13.3.2017.663-672
- [37] ANUROVA, M. N., E. O. BAKHRUSHINA, N. B. DEMINA a E. S. PANTELEEVA. Modern Preservatives of Microbiological Stability (Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal* [online]. 2019, **53**(6), 564–571 [vid. 2023-02-22]. ISSN 15739031. Dostupné z: doi:10.1007/S11094-019-02038-4/TABLES/8

- [38] DIAS, Maria Fernanda Reis Gavazzoni. Hair Cosmetics: An Overview. *International Journal of Trichology* [online]. 2015, **7**(1), 2 [vid. 2023-02-12]. ISSN 09749241. Dostupné z: doi:10.4103/0974-7753.153450
- [39] YANG, Fei Chi, Yuchen ZHANG a Maikel C. RHEINSTÄDTER. The structure of people's hair. *PeerJ* [online]. 2014, **2014**(1) [vid. 2023-02-12]. ISSN 21678359. Dostupné z: doi:10.7717/PEERJ.619/SUPP-1
- [40] SINCLAIR, Rodney D. Healthy Hair: What Is it? *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* [online]. 2007, **12**(2), 2–5 [vid. 2023-02-17]. ISSN 1087-0024. Dostupné z: doi:10.1038/SJ.JIDSYMP.5650046
- [41] CORPORATION, Allured Publishing. *Hair care : from physiology to formulation*. B.m.: Allured Pub. Corp, 2008. ISBN 9786000039783.
- [42] ALONSO, Laura a Elaine FUCHS. The hair cycle. *Journal of Cell Science* [online]. 2006, **119**(3), 391–393 [vid. 2023-02-12]. ISSN 0021-9533. Dostupné z: doi:10.1242/JCS.02793
- [43] KOLARSICK, Paul AJ, Maria ANN KOLARSICK a Carolyn GOODWIN. Anatomy and Physiology of the Skin [online]. 2006 [vid. 2023-02-17]. Dostupné z: https://www.ons.org/sites/default/files/publication_pdfs/1%20SS%20Skin%20Cancer_chapter%201.pdf
- [44] *Hair Growth Cycle Skin. Follicle Anatomy Anagen Phase, Hair Growth Diagram Illustration Stock Vector - Illustration of dermatology, animation: 147324261* [online]. [vid. 2023-02-17]. Dostupné z: <https://www.dreamstime.com/hair-growth-cycle-skin-follicle-anatomy-anagen-phase-diagram-illustration-image147324261>
- [45] TINOCO, Ana, Madalena MARTINS, Artur CAVACO-PAULO a Artur RIBEIRO. Biotechnology of functional proteins and peptides for hair cosmetic formulations. *Trends in Biotechnology* [online]. 2022, **40**(5), 591–605 [vid. 2023-04-19]. ISSN 0167-7799. Dostupné z: doi:10.1016/J.TIBTECH.2021.09.010
- [46] SECCHI, Gianfranco. Role of protein in cosmetics. *Clinics in Dermatology* [online]. 2008, **26**(4), 321–325 [vid. 2023-04-13]. ISSN 0738-081X. Dostupné z: doi:10.1016/J.CLINDERMATOL.2008.04.004
- [47] BASIT, Abdul, Faiza ASGHAR, Saima SADAF a M. Waheed AKHTAR. Health improvement of human hair and their reshaping using recombinant keratin K31. *Biotechnology Reports* [online]. 2018, **20**, e00288 [vid. 2023-04-22]. ISSN 2215017X. Dostupné z: doi:10.1016/J.BTRE.2018.E00288
- [48] ZÁVIŠ HOLZBECHER, Jaroslav Churáček ...a kol. *Analytická chemie*. 1. vyd. B.m.: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1987.
- [49] BHIM PRASAD KAFLE. *Chemical Analysis and Material Characterization by Spectrophotometry*. B.m.: Elsevier, 2019. ISBN 9780128148662.

- [50] PETROVA, Olga E. a Karin SAUER. High-performance liquid chromatography (HPLC)-based detection and quantitation of cellular c-di-GMP. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2017, **1657**, 33 [vid. 2023-04-13]. ISSN 10643745. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-7240-1_4
- [51] C9320 Metody biochemického výzkumu-cvičení Analytická ultracentrifugace [online]. nedatováno [vid. 2023-02-26]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/podzim2017/C9320/um/AUC_teorie_2016.pdf
- [52] WORSFOLD P. (ED.), TOWNSHEND A. (ED.), Poole C. (ed.). Encyclopedia of Analytical Science. In: . 2. vyd. 2005, s. 5277. ISBN 978-0-12-369397-6.
- [53] BALOUIRI, Mounyr, Moulay SADIKI a Saad Koraichi IBNSOUDA. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 2016, **6**(2), 71 [vid. 2023-02-17]. ISSN 20951779. Dostupné z: doi:10.1016/J.JPHA.2015.11.005
- [54] JORGENSEN, James H. a Mary Jane FERRARO. Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2009, **49**(11), 1749–1755 [vid. 2023-02-17]. ISSN 10584838. Dostupné z: doi:10.1086/647952/2/49-11-1749-FIG003.GIF
- [55] BRAZ, Vânia Santos, Karine MELCHIOR a Cristiano Gallina MOREIRA. Escherichia coli as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2020, **10**, 793 [vid. 2023-02-16]. ISSN 22352988. Dostupné z: doi:10.3389/FCIMB.2020.548492/BIBTEX
- [56] *E. coli* [online]. 2018 [vid. 2023-02-16]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
- [57] LEE, Ezra a Fatima ANJUM. Staphylococcus Epidermidis. *StatPearls* [online]. 2022 [vid. 2023-02-18]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563240/>
- [58] MAYSLICH, Constance, Philippe Alain GRANGE a Nicolas DUPIN. Cutibacterium acnes as an Opportunistic Pathogen: An Update of Its Virulence-Associated Factors. *Microorganisms* [online]. 2021, **9**(2), 1–21 [vid. 2023-02-18]. ISSN 20762607. Dostupné z: doi:10.3390/MICROORGANISMS9020303
- [59] KIM, Shukho, Hyesoon SONG, Jong Sook JIN, Weon Ju LEE a Jungmin KIM. Genomic and Phenotypic Characterization of Cutibacterium acnes Bacteriophages Isolated from Acne Patients. *Antibiotics* [online]. 2022, **11**(8), 1041 [vid. 2023-02-18]. ISSN 20796382. Dostupné z: doi:10.3390/ANTIBIOTICS11081041/S1
- [60] KUMAR, Kundan, Fizza ASKARI, Mahima Sagar SAHU a Rupinder KAUR. Candida glabrata: A Lot More Than Meets the Eye. *Microorganisms* [online]. 2019, **7**(2) [vid. 2023-04-21]. ISSN 20762607. Dostupné z: doi:10.3390/MICROORGANISMS7020039

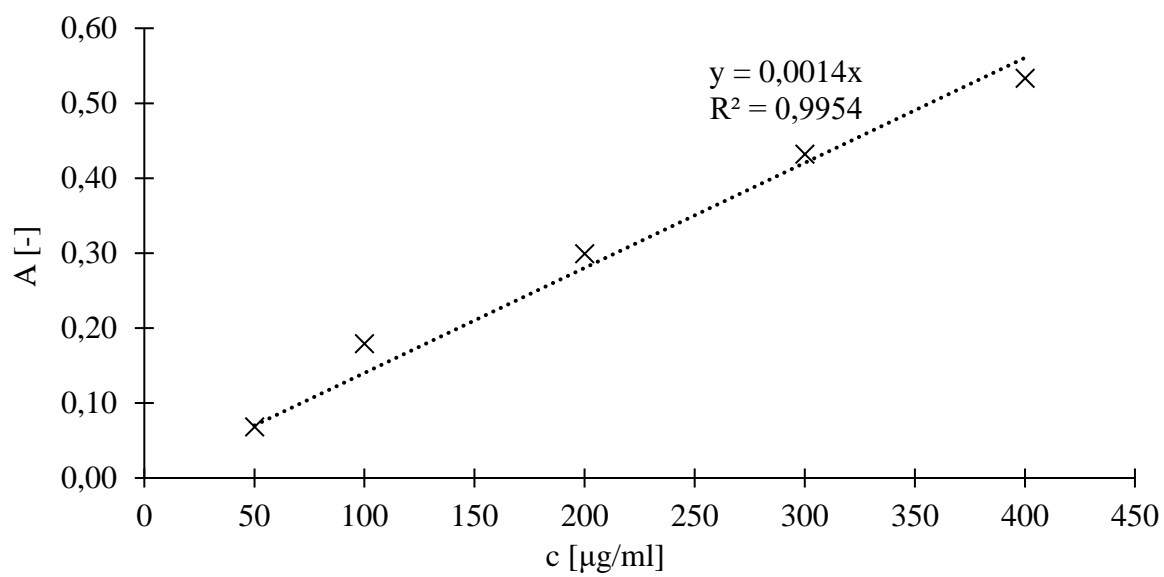
- [61] FIDEL, Paul L., Jose A. VAZQUEZ a Jack D. SOBEL. Candida glabrata: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 1999, **12**(1), 80–96 [vid. 2023-04-21]. ISSN 08938512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.12.1.80/ASSET/D6CBC98A-CDCB-49D8-93AD-9740A057B986/ASSETS/GRAPHIC/CM0190005005.JPEG
- [62] GAJIC, Ina, Jovana KABIC, Dusan KEKIC, Milos JOVICEVIC, Marina MILENKOVIC, Dragana MITIC CULAFIC, Anika TRUDIC, Lazar RANIN a Natasa OPAVSKI. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods. *Antibiotics* [online]. 2022, **11**(4) [vid. 2023-02-17]. ISSN 20796382. Dostupné z: doi:10.3390/ANTIBIOTICS11040427
- [63] ELSHIKH, Mohamed, Syed AHMED, Scott FUNSTON, Paul DUNLOP, Mark MCGAW, Roger MARCHANT a Ibrahim M. BANAT. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology Letters* [online]. 2016, **38**(6), 1015–1019 [vid. 2023-02-17]. ISSN 15736776. Dostupné z: doi:10.1007/S10529-016-2079-2/TABLES/3
- [64] *Test stability - EUROLAB* [online]. [vid. 2023-02-22]. Dostupné z: <https://www.eurolab.com.tr/cs/sektorel-test-ve-analizler/endustriyel-testler/raf-omru-stabilite-testi>
- [65] *Test na antimikrobiální konzervační účinnost* [online]. [vid. 2023-02-22]. Dostupné z: <https://www.eurolab.net/cs/testler/medikal-cihaz-testleri/antimikrobiyal-koruyucu-etkinlik-testi/>
- [66] BENKOVÁ, Sarah. *Možnosti využití extraktů z technického konopí ve vlasové kosmetice* [online]. B.m., 2023. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149195>.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

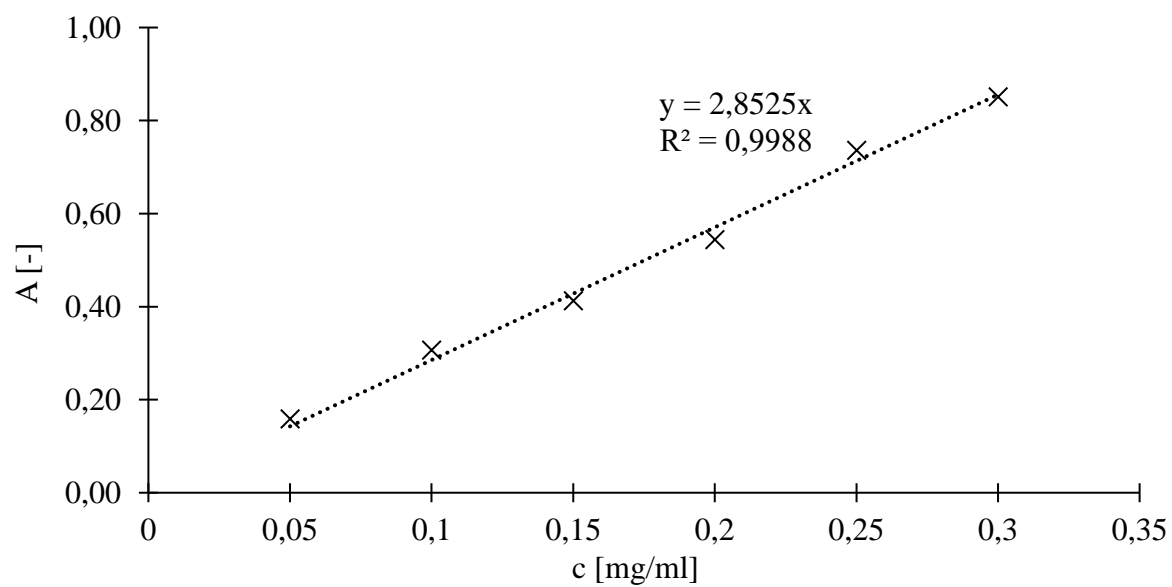
ABTS4	2,2'-azinobis(3-ethyŕbenzothiazolin-6-sulfonov kyselina)
BHI	Brain Heart Infusion
CBC	Kanabichromen
CBD	Kanabidiol
CBG	Kanabigerol
CBN	Kanabinol
CCM	Czech Collection of Microorganisms (esk sbírka mikroorganismŕ)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EtOH	Ethanol
HPLC	Vysokoučinná kapalinov chromatografie
LB	Lysogeny Broth
MBC	Minimln baktericidní koncentrace
MIC	Minimln inhibiční koncentrace
PG	Pentylenglykol
SDB	Sabouraud Dextrose Broth
TFE	Tetrafluorethan
THC	Tetrahydrokanabinol
A	Absorbance
λ	Vlnov délka

9 PŘÍLOHY

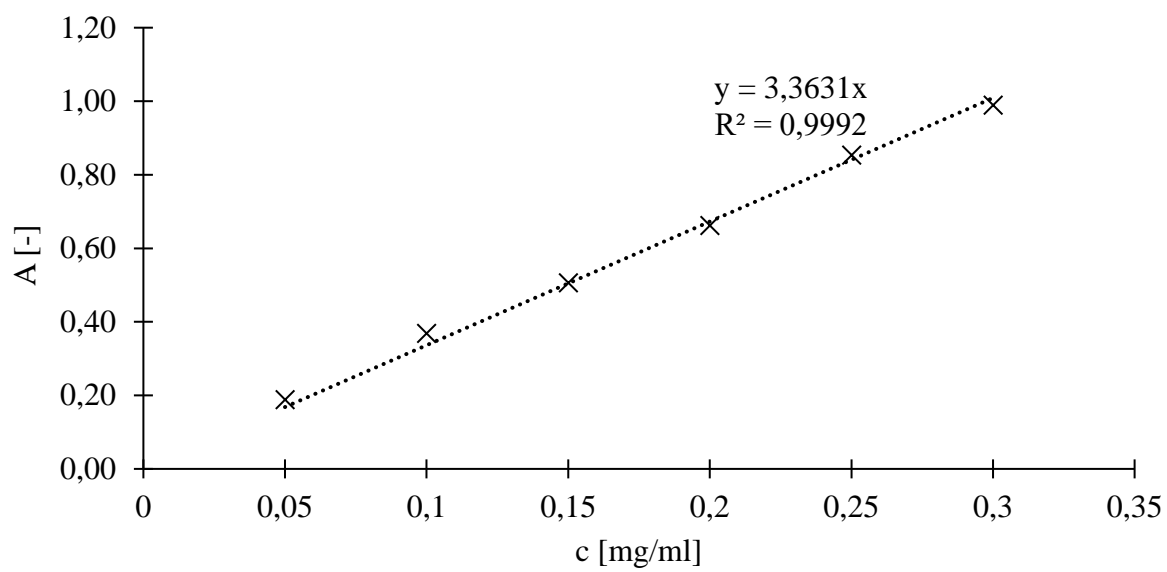
Příloha 1: Kalibrační křivka TROLOXU na stanovení antioxidační aktivity



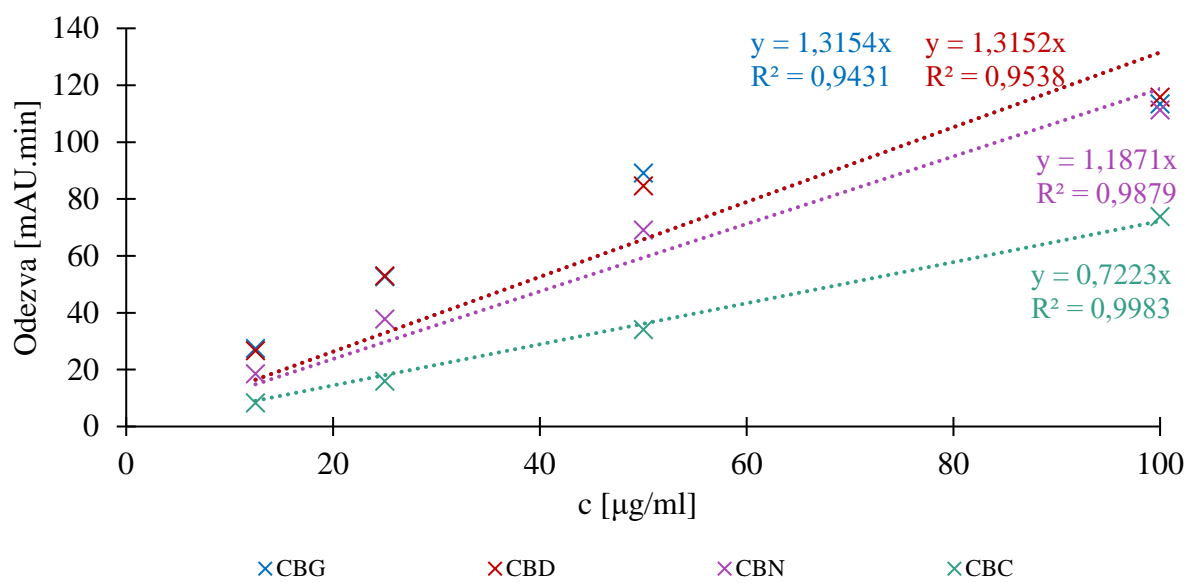
Příloha 2: Kalibrační křivka kyseliny gallové na stanovení fenolických látek



Příloha 3: Kalibrační křivka katechinu na stanovení flavonoidů



Příloha 4: Kalibrační křivky jednotlivých kanabinoidů



Příloha 5: Otázky z dotazníku na senzickou analýzu šamponu na vlasy

Pohlaví

Věk

Délka vlasů

Jak často si obvykle myjete vlasy (s běžným šamponem)

Kolikrát si nanášíte běžný šampon na vlasy během jednoho mytí

Co je pro vás důležité při výběru šamponu

Používáte kondicionér/masku na vlasy

Kolikrát jste si během testování umyli vlasy

Kolikrát jste si během jednoho mytí při testování nanášeli šampon

Jak vám vyhovovala konzistence šamponu

Jak vám vyhovovala barva šamponu

Jak vám vyhovovala vůně šamponu

Používali jste během testování i jiné produkty na vlasy

Pěnil šampon na vlasech dostatečně

Jak rychle se vám mastily vlasy

Objevily se během testování nějaké problémy

Jaký jste měli pocit na vlasech po 14ti dnech zkoušení šamponu? Připadaly vám v něčem jiné?

Je něco, co byste na šamponu vylepšili?

Měli byste zájem používat šampon i nadále