

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2019

Bc. Daniela Balonková



**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

**VYBRANÉ ALKOHOLOVÉ EXTRAKTY BEZU ČERNÉHO  
PRO VYUŽITÍ V KOSMETOLOGII**

SELECTED ALCOHOL EXTRACTS OF SAMBUCUS NIGRA FOR USE IN COSMETOLOGY

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Daniela Balonková**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Jana Zemanová, Ph.D.**

**BRNO 2019**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1287/2018 Akademický rok: 2018/19  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Daniela Balonková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **Ing. Jana Zemanová, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Vybrané alkoholové extrakty bezu černého pro využití v kosmetologii

### Zadání diplomové práce:

- Zpracujte literární rešerši k zadané problematice:
  - základní charakteristika rostliny bez černý (*Sambucus nigra*, L.)
  - účinné látky s ohledem na jednotlivé části rostliny
  - jejich význam a možnosti využití v potravinářství, farmacii a kosmetice
  - metody zpracování jednotlivých částí rostliny pro dané účely a přehled metod vhodných pro jejich hodnocení
- Vyberte vhodná rozpouštědla na bázi alkoholu a nastavte různé systémy pro maceraci/extrakci rostlinného materiálu (zejména složení rozpouštědla, navážka, teplota, čas). Vybrané extrakty ocharakterizujte s ohledem na hlavní účinné látky a základní fyzikálně–chemické charakteristiky.
- Vybraný extrakt zpracujte do kosmetického přípravku.
- Aplikované postupy odiskutujte.

### Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019:

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

-----  
Bc. Daniela Balonková  
student(ka)

-----  
Ing. Jana Zemanová, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan



## ABSTRAKT

Tato práce se zaměřuje na přípravu vybraných alkoholových extraktů bezu černého a jejich využití v kosmetologii.

V teoretické části jsou popsány botanické vlastnosti rostliny bezu černého (*Sambucus nigra*). Jsou zde představeny a charakterizovány jak bioaktivní látky, tak toxické látky obsažené ve všech vegetativních částech rostliny. Větší pozornost se zaměřuje na látky s antioxidačními vlastnostmi. Teoretická část také obsahuje popis základních analytických metod, které jsou v praktické části použity k charakterizaci látek obsažených v bezových květech.

Praktická část se zaměřuje na optimalizaci přípravy alkoholových extraktů se záměrem připravit extrakt s co největším obsahem polyfenolů s ohledem na ekonomiku a provozní náklady na výrobu. Jsou zkoumány faktory jako výběr vhodného rozpouštědla, poměr rozpouštědla ku rostlinnému materiálu, teplota rozpouštědla a doba extrakce. Na základě celkové koncentrace polyfenolů měřených spektrofotometricky Folin-Ciocalteuovou metodou je vyhodnoceno nejvhodnější rozpouštědlo 60% ethanol, poměr rostlinného materiálu ku rozpouštědlu 1:8, laboratorní teplota rozpouštědla a doba extrakce 24 hodin. Za těchto podmínek je připraven ethanolový extrakt, který je dále analyzován a jsou stanoveny jeho vybrané vlastnosti, jako pH, index lomu a hustota.

Pomocí HPLC s DAD detektorem jsou identifikovány látky rutin, kyselina chlorogenová, kávová a ferulová. Hodnota pH bezového extraktu je  $5,743 \pm 0,006$ , index lomu  $1,365 \pm 0,02$  při teplotě  $22,7 \text{ }^\circ\text{C}$  a hustota  $0,9288 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Pomocí kapalinové chromatografie jsou vyhodnoceny koncentrace kyseliny chlorogenové jako  $0,104 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , kyseliny kávové jako  $0,086 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  a kyseliny ferulové jako  $0,060 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Extrakt je zpracován do kosmetických výrobků, které nacházejí využití v lázeňství. Připravenými výrobky jsou toaletní mýdlo a koupelová sůl.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Bez černý, květy, polyfenoly, alkoholový extrakt, Folin-Ciocalteu, HPLC, kosmetika

## **ABSTRACT**

This thesis focuses on the preparation of selected alcohol extracts of elderberry and their use in cosmetology.

In the theoretical part are described the botanical properties of the elderberry (*Sambucus nigra*). There are introduced and characterized bioactive compounds and toxic compounds contained in all vegetative parts of the plant. Attention is mostly focused on compounds with antioxidant properties. The theoretical part also contains a description of basic analytical methods, which are used in the practical part to characterize compounds contained in elder flowers.

The practical part focuses on the optimization of the preparation of alcohol extracts with the aim to prepare the extract with the greatest possible content of polyphenols with respect to economy and production costs. Factors such as selection of the appropriate solvent, solvent to plant material ratio, solvent temperature, and extraction time are examined. Based on the total polyphenol concentration measured spectrophotometrically by the Folin-Ciocalteu method, the most suitable solvent is 60% ethanol, the ratio of plant material to solvent is 1:8, the laboratory temperature of solvent and the extraction time of 24 hours. Under these conditions, an ethanol extract is prepared, analyzed and determined selected properties, such as refractive index and density.

Rutin, chlorogenic, caffeic and ferulic acids are identified by HPLC with a DAD detector. The pH value of alcohol extract is  $5.743 \pm 0.006$ , the refractive index is  $1.365 \pm 0.02$  at  $22.7^\circ \text{C}$  and the density is  $0.9288 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . By liquid chromatography the concentration of chlorogenic acids is quantified as  $0.104 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , caffeic acid as  $0.086 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  and ferulic acid as  $0.060 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . The extract is incorporated into cosmetic products, that are used in balneology. Prepared products are toilet soap and bath salt.

## **KEYWORDS**

Elderberry, flowers, polyphenols, alcohol extract, Folin-Ciocalteu, HPLC, cosmetics

BALONKOVÁ, Daniela. *Vybrané alkoholové extrakty bezu černého pro využití v kosmetologii*. Brno, 2019. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí diplomové práce Ing. Jana Zemanová, Ph.D.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěla bych poděkovat Ing. Janě Zemanové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce a cenné rady, které mi pomohly tuto práci zkompletovat. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Mileně Vespalcové, Ph.D. za pomoc při měření a vyhodnocení výsledků.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	9
2.1	Bez černý.....	9
2.2	Účinné látky bezu černého .....	10
2.2.1	Glykosidy.....	10
2.2.2	Silice .....	11
2.2.3	Polyfenoly.....	11
2.2.4	Antimikrobiální peptidy .....	13
2.2.5	Třísloviny.....	15
2.2.6	Anthokyany .....	15
2.2.7	Vitamíny a stopové prvky.....	15
2.3	Škodlivé látky v bezu černém .....	18
2.3.1	Kyanogenní glykosidy .....	18
2.3.2	Lektiny.....	19
2.4	Využití jednotlivých částí rostlin .....	20
2.5	Použité metody a techniky .....	20
2.5.1	Extrakce a macerace .....	20
2.5.2	Rozpouštědla použitá při extrakci .....	22
2.5.2.1	<i>Ethanol</i> .....	22
2.5.2.2	<i>Glycerol</i> .....	22
2.5.2.3	<i>Propylenglykol</i> .....	23
2.5.3	Spektrofotometrické stanovení polyfenolů.....	23
2.5.3.1	<i>Test Folin-Ciocalteu</i> .....	24
2.5.3.2	<i>Test Folin-Denis</i> .....	25
2.5.4	HPLC .....	25
2.6	Využití bezových extraktů v kosmetologii.....	27
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	28
3.1	Použité chemikálie .....	28
3.2	Použité přístroje, vybavení a ostatní materiály .....	28
3.3	Pracovní postupy .....	29
3.3.1	Optimalizace navážky rostlinného materiálu .....	29
3.3.2	Optimalizace doby extrakce .....	29
3.3.3	Optimalizace teploty.....	30
3.3.4	Výběr vhodného rozpouštědla .....	30

3.3.5	Stanovení polyfenolů spektrofotometricky .....	30
3.3.6	Stanovení vybraných vlastností extraktu .....	32
3.3.6.1	<i>Stanovení indexu lomu</i> .....	32
3.3.6.2	<i>Stanovení pH</i> .....	32
3.3.6.3	<i>Stanovení hustoty</i> .....	32
3.3.7	Analýza extraktu pomocí HPLC .....	32
3.3.7.1	<i>Příprava mobilní fáze</i> .....	32
3.3.7.2	<i>Příprava standardů fenolických kyselin a rutinu</i> .....	32
3.3.7.3	<i>Podmínky HPLC analýzy</i> .....	33
3.3.7.4	<i>HPLC analýza bezového extraktu</i> .....	33
3.3.8	Zpracování bezového extraktu do kosmetického výrobku .....	34
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	35
4.1	Optimalizace navážky rostlinného materiálu .....	35
4.2	Optimalizace doby extrakce .....	36
4.3	Optimalizace teploty .....	38
4.4	Výběr vhodného rozpouštědla .....	40
4.5	Stanovení vybraných vlastností extraktu .....	41
4.5.1	Stanovení indexu lomu .....	42
4.5.2	Stanovení pH .....	42
4.5.3	Stanovení hustoty .....	42
4.6	Analýza extraktu pomocí HPLC .....	42
4.6.1	Optimalizace mobilní fáze .....	42
4.6.2	Analýza roztoků standardů .....	42
4.6.3	Analýza extraktu bezu černého .....	45
4.7	Zpracování bezového extraktu do kosmetického výrobku .....	47
5	ZÁVĚR .....	50
6	REFERENCE .....	51
7	PŘÍLOHY .....	59
7.1	Příloha 1: Bezpečnostní list .....	59

# 1 ÚVOD

Bez černý *Sambucus nigra* je tradiční rostlina, jejíž květy a plody se v mnohých domácnostech využívají k přípravě sirupů a čajů. Tato rostlina je využívána nejen v domácnostech, ale i ve farmaceutickém, potravinářském a kosmetickém průmyslu. Popularita této rostliny se v posledních letech zvyšuje díky obsahu bioaktivních látek s léčivými účinky. Bezu černému jsou připisovány aseptické, antioxidační a antivirotické vlastnosti. Bioaktivní látky s antioxidačním účinkem především zpomalují proces stárnutí a působí preventivně proti různým onemocněním. Významnými bioaktivními látkami bezu černého jsou například polyfenoly, anthokyany, glykosidy nebo vitamíny.

Stále se hledá nové využití této zázračné rostliny v kosmetickém průmyslu díky blahodárným čistícím a zklidňujícím účinkům na pleť. Dalším důvodem zvýšení zájmu o černý bez je návrat k přírodním zdrojům. Lidé stále více opouštějí od výrobků plných syntetických chemických látek a vrací se zpět k bylinkám. Z těchto důvodů je třeba zabývat se zdokonalováním procesu extrakce a zhodnotit efektivitu a ekonomičnost extrakčních metod, aby byla rostlina co nejlépe využita a obsah bioaktivních látek v extraktu byl co největší.

Cílem diplomové práce je optimalizovat proces extrakce bezových květů a připravit extrakt s co největším obsahem polyfenolů s ohledem na ekonomickou stránku výroby a přístrojové vybavení. Dalším cílem je zpracovat získaný extrakt do vhodného kosmetického výrobku.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Bez černý

Bez černý *Sambucus nigra* je všudypřítomná rostlina, která byla vysazována u venkovských sídel kvůli jejím léčivým vlastnostem. Semena jsou roznášena ptáky, proto se vyskytuje hojně u plotů, zdí, na skládkách, neudržovaných zahradách ale i na loukách a v parcích. Je to keř nebo menší strom s šedohnědou kůrou dorůstající výšky 3-5 m. Letorosty jsou dužnaté a sytě zelené a mladé větve mají houbovitou dřev bělavé barvy. Listy raší v dubnu a jsou lichozpeřené, svrchu tmavozelené barvy, vespod světlejší, na okraji nepravidelně pilovité a zašpičatělé. Rozkvétá na konci května nepříjemně vonícími žlutobílými květy, které jsou uspořádány do vrcholičnatých květenství. Červenofialové až tmavě černé zralé plody s červenofialovou stopkou nazývané bezinky se sklízí na konci podzimu s příchodem prvních mrazíků. Jsou to peckovičky se třemi semínky s průměrem asi 3 mm [1, 2].

Bez černý je často zaměňován s bezem chedbí (*Sambucus ebulus*), který má rovné tyčinky, na rozdíl od bezu černého, který má tyčinky poléhavé. Plody bezu chedbí nejsou požitelné, naopak jsou lehce jedovaté a vyvolávají průjem či zvracení. Dalším druhem je bez červený (*Sambucus racemosa*), který je oblíbený zvláště při přípravě marmelád nebo sirupů. Plody mají po zpracování hořkou až kyselou chuť. Bez kanadský (*Sambucus canadensis*) se vyskytuje i v Evropě ovšem spíše jako okrasná rostlina bez kulinářského využití [1, 2].



Obr.1. Květenství bezu černého [3].

Následující *Tabulka 1* obsahuje taxonomické zařazení rostliny bezu černého *Sambucus nigra* v českém i latinském jazyce.

*Tabulka 1. Taxonomické zařazení bezu černého [3].*

Doména	Eukaryota	<i>Eukaryota</i>
Říše	Rostliny	<i>Plantae</i>
Kmen	Semenné	<i>Spermatophyta</i>
Podkmen	Krytosemenné	<i>Angiospermae</i>
Třída	Vyšší dvouděložné rostliny	<i>Rosopsida</i>
Řád	Štětkovité	<i>Dipsacales</i>
Čeleď	Zimolezovité	<i>Caprifoliaceae</i>
Rod	Bez	<i>Sambucus</i>
Druh	Bez černý	<i>Sambucus nigra</i>

## 2.2 Účinné látky bezu černého

V posledních letech se potravinářský průmysl zaměřil na produkci inteligentních potravin obsahující bioaktivní látky, u kterých byl prokázán pozitivní účinek na lidské zdraví. Poptávka po těchto potravinách se v posledních letech výrazně zvýšila. Bioaktivními látkami bezu černého jsou především polyfenoly, antimikrobiální peptidy, silice, glykosidy, aminokyseliny, enzymy, vitamíny, minerály atd. Bez černý je rostlina, která dříve nebyla pro spotřebitele příliš oblíbená kvůli obsahu alkaloidů. To lze však snadno neutralizovat tepelným zpracováním. Zájem o tuto rostlinu se v poslední době významně zvyšuje díky bohatému obsahu bioaktivních látek, které především zpomalují proces stárnutí, působí preventivně proti různým onemocněním jako jsou kardiovaskulární choroby, rakovina, plicní onemocnění, Parkinsonova a Alzheimerova choroba. Látky, které jsou zodpovědné za ochranný účinek proti těmto chorobám, se vyznačují antioxidační aktivitou, která se projevuje schopností vychytávat reaktivní formy kyslíku (ROS), jako jsou hydroxylové skupiny, peroxidové radikály a radikály jiných reaktivních forem kyslíku [4, 5].

Nejvíce bioaktivních látek obsahují květy a plody bezu černého. Mezi nejvýznamnější látky obsažené ve květech a plodech patří například glykosidy, silice, polyfenoly, antimikrobiální peptidy, organické kyseliny, sacharidy, třísloviny, vitamíny atd. Látky v listech a kůře jsou málo probádané a vykazují spíše toxické vlastnosti (*kap.2.3*). V kosmetice a potravinářství nachází využití pouze antimikrobiální peptidy (*kap. 2.2.4*) [2, 6].

### 2.2.1 Glykosidy

Glykosidy jsou deriváty sacharidů, jejichž poloketalová nebo poloacetalová skupina je nahrazena nesacharidovým radikálem, který se nazývá aglykon. Ten charakterizuje daný glykosid. Vznikají při reakci sacharidů s fenoly, alkoholy nebo aminy. Jsou to bezbarvé látky rozpustné v alkoholu a ve vodě a tvoří energetickou složku rostliny, která využívá uvolněný sacharid po zrušení glykosidické vazby. Již velice malé množství vykazuje pozitivní účinky na lidský organismus. Jsou součástí kardiotonik, což jsou kardiostimulační léčiva podporující srdeční činnost. Nejvýznamnějším zástupcem glykosidů je sambunigrin (*kap.2.3.1*) [2, 7].

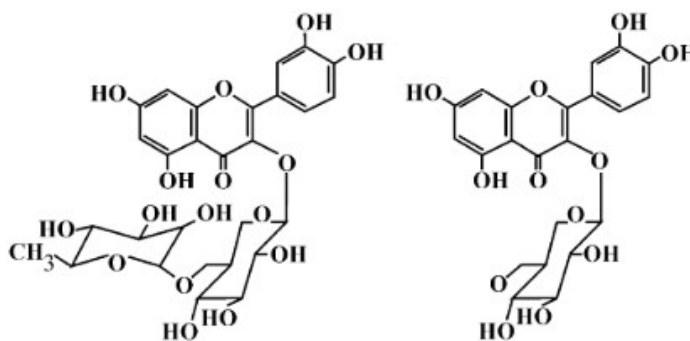
### 2.2.2 Silice

Silice jsou hlavní složkou esenciálních olejů, což je směs vonných látek nejčastěji terpenové povahy. Jsou to látky těkavé, lipofilní, ve vodě těžce rozpustné. Mají vysoký index lomu a různé účinky na nervovou soustavu zprostředkovávané především různými smyslovými vjemy jako jsou chuť a vůně. Lidská sliznice vstřebává esenciální oleje velice rychle a bez potíží, podporují sekreci a chuť k jídlu, odvodňují a příjemně dráždí pokožku. Dále mají dezinfekční, protizánětlivý a zklidňující účinek, rozpouštějí hleny a regulují činnost jater a žlučníku. Esenciální oleje v bezu černém jsou schopny zastavit rozmnožování bakterií. Jsou velice citlivé na okolní prostředí, při pokojové teplotě se mohou vypařovat, proto je vhodné sušené květy uchovávat v tmavé sklenici na chladném místě [2, 7].

### 2.2.3 Polyfenoly

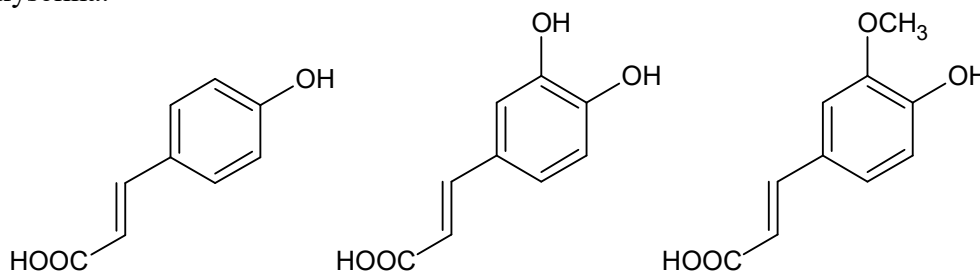
Polyfenoly jsou přirozeně se vyskytující mikroživiny, které mohou chránit rostlinu před přírodními vlivy a jsou také prospěšné pro lidský organismus. Nejčastějším problémem pro potravinářský průmysl je stabilita polyfenolů během zpracování. Jsou citlivé na světlo, pH, vysokou teplotu a degradaci během skladování. Je to skupina chemických látek, která zahrnuje flavonoidy a fenolové kyseliny, což jsou látky, které disponují řadou biologických účinků na lidský organismus. Mají schopnost zvyšovat pružnost krevních cév, snižují lomivost kapilár, snižují cholesterol a mají schopnost bránit šíření toxinů tkáněmi. Fenolové sloučeniny mají také účinky protizánětlivé, antivirové, antialergické, vazoprotektivní a antikarcinogenní [5, 8].

Nejvýznamnějším zástupcem flavonoidů obsažených v bezových květech je rutin (kvercetin-3-rutinosid). Rutin se konzumuje v každodenní stravě, je obsažen v mnoha potravinách, zelenině a nápojích. Název rutin je odvozen od rostliny routy vonné, ze které byl poprvé izolován. Je také známý pod názvem vitamín P. Působí proti alergiím a využívá se při léčbě infekčních onemocnění. Při nadměrné dávce vyvolává slinění a zduření jazyka. Dalšími významnými flavonoidními látkami, jež byly identifikovány v bezu černém, jsou isokvercetin (kvercetin-3-glukosid), kaempferol-3-rutinosid, isorhamnetin-3-rutinosid, isorhamnetin-3-glukosid a kvercetin-3,6-acetylglykosid. Až 90 % z celkové obsahu flavonoidních látek v bezu černém tvoří rutin, kaempferol-3-rutinosid a isorhamnetin-3-rutinosid [9, 10, 11].



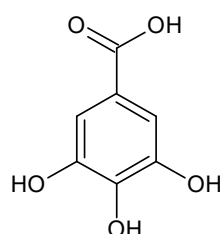
Obr.2. Chemické vzorce rutinu (vlevo) a isokvercetinu (vpravo) [11].

Mezi fenolovými kyselinami byly stanoveny deriváty kyseliny p-kumarové, kávové, ferulové. Fenolové kyseliny představují skupinu sekundárních metabolitů s antioxidačními, chelatačními a redoxními vlastnostmi, které působí jako redukční činidla, donory vodíku nebo zhášedla singletového kyslíku [12]. Tyto fenolové kyseliny také disponují fyziologickými vlastnostmi, jako jsou protizánětlivé, antimikrobiální, protinádorové a antidiabetické účinky. Používají se ve farmaceutickém, potravinářském a kosmetickém průmyslu hlavně kvůli dobrým antioxidačním vlastnostem. Kyselina ferulová má také ochrannou funkci pro keratinocyty, fibroblasty, kolagen a elastin. Snáze se vstřebává do těla a zůstává v krvi déle než jakákoli jiná fenolová kyselina.



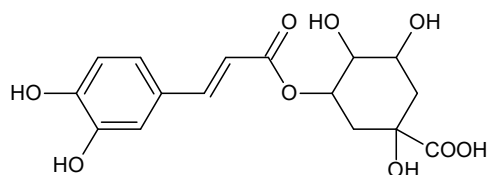
Obr. 3. Chemický vzorec kyseliny p-kumarové (vlevo), kávové (uprostřed) a ferulové (vpravo) [13].

Kyselina gallová se často využívá jako standard při stanovení celkové koncentrace polyfenolů. Jedná se o bezbarvou nebo slabě žlutou krystalickou sloučeninu s rozsáhlým využitím v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Průmyslově se vyrábí hydrolytickým rozkladem taninu za přítomnosti glykoproteinové esterázy. Kyselina gallová může inhibovat oxidaci a žluknutí tuků a olejů díky antioxidační povaze. Může být využita v potravinářském průmyslu jako aditivum, ochucovadlo a konzervační látka. Mimo jiné se používá ve farmaceutickém průmyslu díky antioxidačním, antimikrobiálním, protizánětlivým, protinádorovým, kardio, gastro a neuroprotektivním účinkům [14].

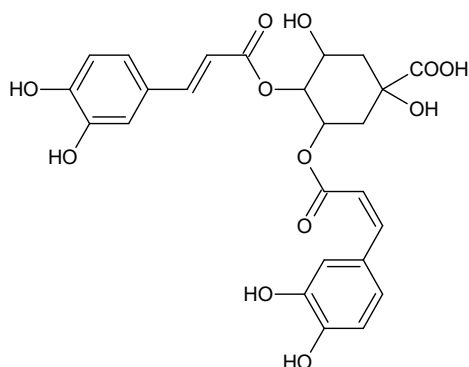


Obr.4. Chemický vzorec kyseliny gallové [15].

Hlavními fenolickými kyselinami u květů bezu černého jsou kyseliny chlorogenová (5-kaffeoylchinová) a isochlorogenová (1,5-dikaffeoylchinová). Představují až 70 % celkového obsahu fenolických kyselin. Kyselina chlorogenová je esterem kyseliny kávové a chinonové. Podle výzkumu květy bezu černého obsahují daleko více flavonoidů a fenolických kyselin než plody [9, 11]. Studie z roku 2009 prokázala antioxidační, hepatoprotektivní a hypoglykemické účinky kyseliny chlorogenové pro lidský organismus [16].



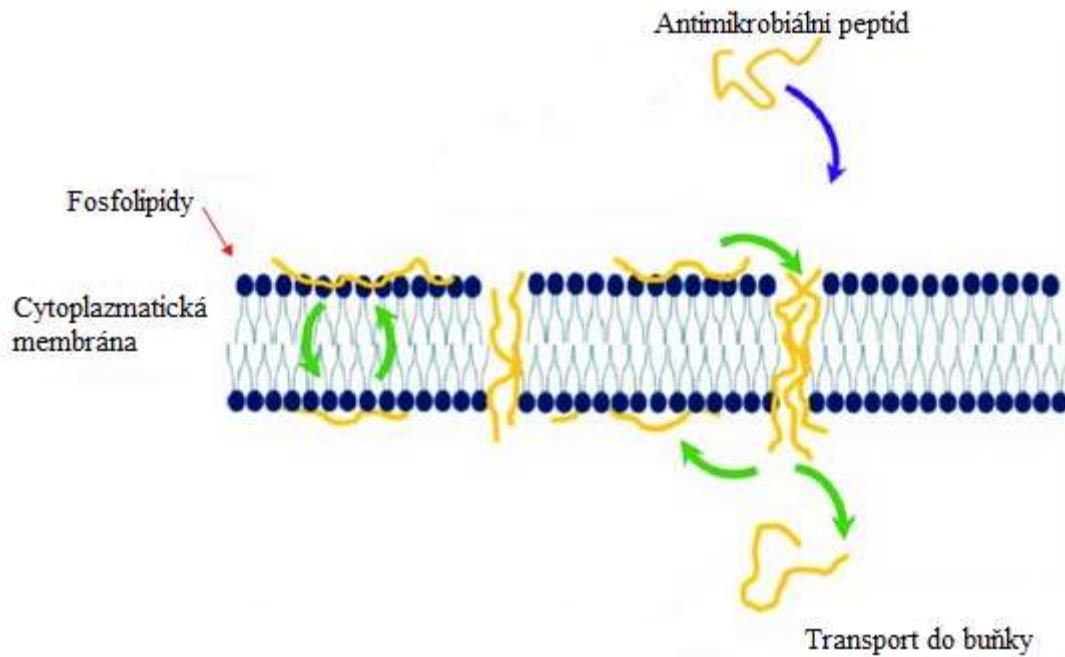
Obr.5. Chemický vzorec kyseliny chlorogenové [15].



Obr.6. Chemický vzorec kyseliny isochlorogenové [15].

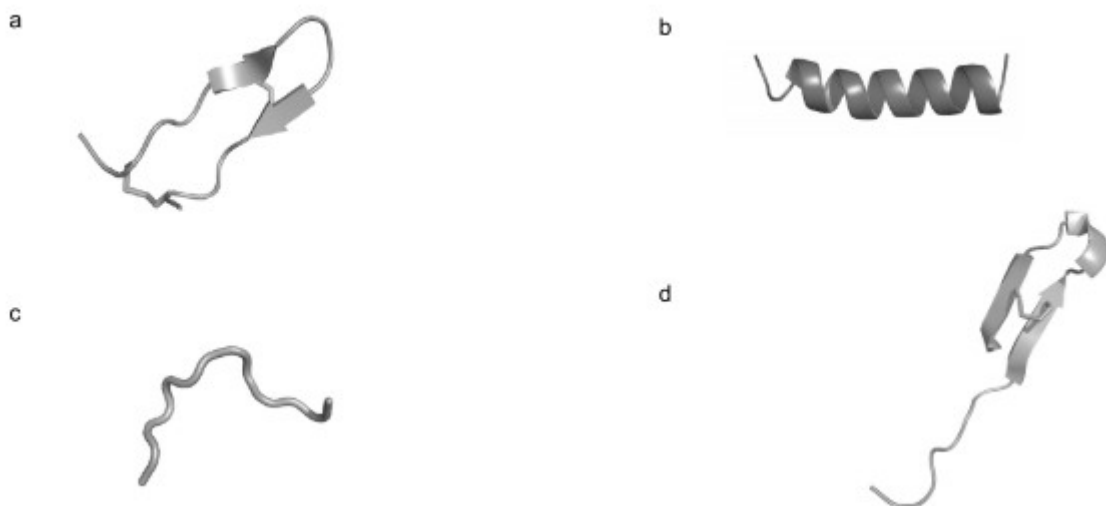
#### 2.2.4 Antimikrobiální peptidy

Ve květech bezu černého byly nalezeny antimikrobiální peptidy bohaté na cystein, které chrání proti rostlinným, ale i lidským patogenům. Byly nalezeny mimo jiné i v kořenech, listech nebo semenech. Mají schopnost působit na patogenní mikroorganismy a zároveň neškodit buňkám v lidském těle. Ovlivňují imunitní odpověď, posilují vrozenou imunitu a potlačují zánětlivé procesy. Anionické antimikrobiální peptidy se záporným nábojem, který jim poskytuje přítomnost aspartátové skupiny, potřebují zinek jako kofaktor pro baktericidní aktivitu. Mechanismus účinku nebyl zcela prokázán, ale předpokládá se, že anionický peptid vstupuje do buňky společně se zinkem, prochází skrz membránu dovnitř buňky a blokuje některé metabolické procesy. Kationické antimikrobiální peptidy mají záporný náboj kvůli velkému obsahu lysinových, argininových zbytků a hydrofobních reziduí. Fosfolipidy v bakteriálních membránách propůjčují bakteriální buňce obecně záporný náboj. Kationické peptidy se integrují do bakteriální membrány, zanořují do ní svou hydrofobní část a narušují její integritu. Tím z buňky unikají životně důležité látky a buňka zaniká [6, 17].



Obr. 7. Mechanismus účinku kationického antimikrobiálního peptidu prostupující cytoplazmatickou membránou do buňky [18].

Na základě složení bakteriální membrány rozlišují antimikrobiální peptidy savčí buňky od buněk mikrobiálních. Bakteriální membrána totiž postrádá cholesterol a obsahuje záporně nabitě fosfolipidy. Peptidy mají antimikrobiální aktivitu proti G-pozitivním, G-negativním bakteriím, houbám a protozoím. Peptidy mohou mít strukturu  $\alpha$ -helixu,  $\beta$ -listu, rozvolněnou strukturu nebo strukturu smyčky (Obr. 8) [6, 17].



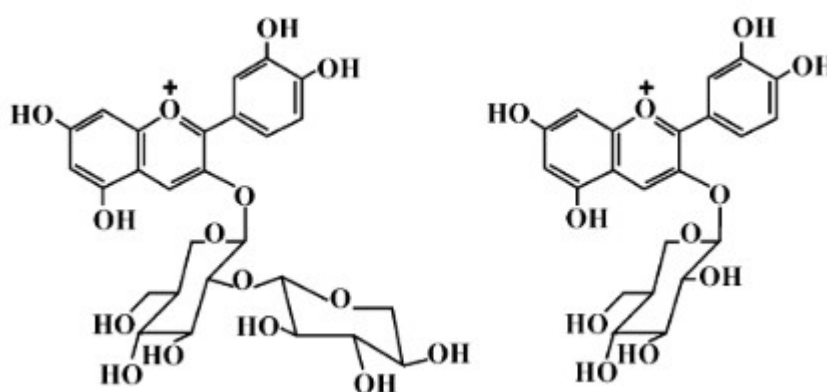
Obr. 8. Struktura antimikrobiálních peptidů: (a)  $\beta$  skládaný list, (b)  $\alpha$ -helix, (c) rozvolněná struktura, (d) smyčka [17].

## 2.2.5 Třísloviny

Třísloviny jsou látky rozpustné ve vodě odpovědné za svíravou chuť. Mají protizánětlivé, antimikrobiální, sekreolytické a proti průjemové účinky. Jelikož působí proti krvácení, v medicíně se využívají při hojení ran. Dále se používají při léčbě hemoroidů a jako detoxikační prostředek při vylučování těžkých kovů ven z organismu. Jsou to přírodní antibiotika, ale jsou náchylné na oxidaci, a tím ztrácejí účinek. Za zástupce tříslovin v bezu černém se považují kyseliny ferulová a kávová popsané v kapitole 2.2.3 [2, 7].

## 2.2.6 Anthokyany

Anthokyany zaujímají zvláštní místo ve skupině polyfenolů, je to velká skupina ve vodě rozpustných modrých pigmentů s antioxidačními vlastnostmi. Anthokyany se liší podle počtu hydroxylových skupin v molekule. Mohou pomáhat chránit proti virovým infekcím a některé anthokyany dokonce snižují infekčnost chřipkového viru. Disponují mnoha pozitivními účinky na prevenci kardiovaskulárních onemocnění, diabetu, rakoviny plic, tlustého střeva, prsu a kůže. Bylo zjištěno, že stimulují regeneraci rhodopsinu, a tím pomáhají zlepšit ostrost zraku. V potravinářství se anthokyany využívají jako barvivo pod označením E163 [4, 19, 20]. Anthokyany v bezu černém se nachází výhradně v plodech. Jsou reprezentovány především dvěma sloučeninami, a sice kyanidin-3-sambubiosidem a kyanidin-3-glukosidem. Celkový obsah anthokyanů v bezu černém se pohybuje okolo 500 mg ve 100 g alkoholového extraktu [11].



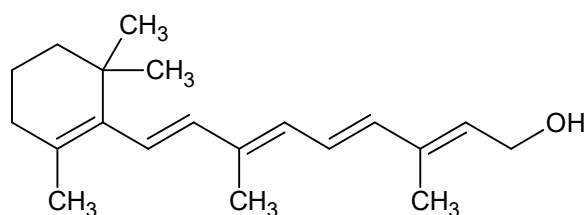
Obr.9. Chemické vzorce kyanidin-3-sambubiosidu (vlevo) a kyanidin-3-glukosidu (vpravo) [11].

## 2.2.7 Vitamíny a stopové prvky

Vitamíny a stopové prvky patří mezi základní stavební kameny našeho zdraví, a proto si zaslouží zvláštní pozornost. Bez černý je bohatý na vitamíny A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, C a stopové prvky sodík, draslík, vápník a další [2].

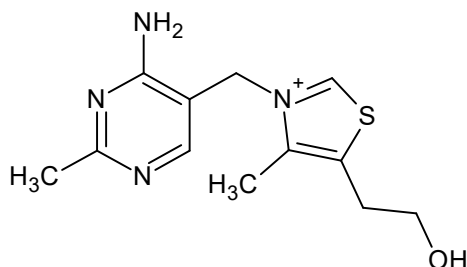
Vitamin A neboli retinol je nezbytnou mikroživinou pro lidský organismus. Je spojen s buněčným dělením, udržováním integrity epitelu, tvorbou červených krvinek, růstem a vývojem, imunitním a reprodukčním systémem. Účastní se udržování sliznic dýchacího, zažívacího a močového traktu. Nedostatek vitamínu A způsobuje suchost sliznice a zvyšuje riziko infekce. Je životně důležitý pro náš zrak, jelikož se podílí na přeměně světla v elektrické signály a má za následek šeroslepost. Jeho trvalý nedostatek může proto vést ke zhoršení zraku

až slepotě v krajních případech. Je také velice důležitý pro vývoj plodu, proto těhotné ženy a děti potřebují vyšší dávku než průměrný dospělý jedinec. Naše tělo ho nedokáže syntetizovat, tudíž je nutný adekvátní denní příjem, aby se zabránilo jeho nedostatku. Nachází se v mléčných výrobcích, vejcích, játrech a v potravě rostlinného původu, kde se vyskytuje jako betakaroten, který se vyznačuje typickou oranžovou barvou. Hraje důležitou roli jako antioxidační činidlo. Vitamin A je degradován účinkem nitrátů nebo tepla například při fritování. Doporučená denní dávka retinolu je 0,8 až 1 mg. Obsah vitamínu A v bezu černém nebyl doposud kvantifikován [2, 21].



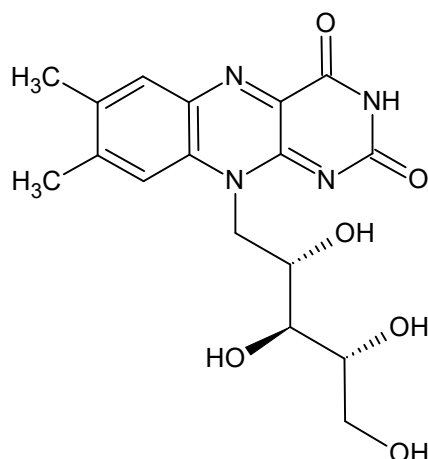
Obr.10. Chemický vzorec retinolu [22].

Vitamin B<sub>1</sub> neboli thiamin je důležitý pro metabolismus sacharidů, tuků a alkoholů. Je přínosný také pro nervový systém, jelikož pomáhá zabránit tvorbě vedlejších toxických produktů, které by na něj měly negativní účinky. Hraje rozhodující roli v energetickém metabolismu, v růstu, vývoji a funkci buněk. Důležitým zdrojem jsou obilniny, luštěniny, játra, ryby, brambory a maso. Je rozpustný ve vodě a více než polovina je degradována při vaření. Velké množství thiaminu obsahují slupky rýže. Nedostatek thiaminu v těle pocítují alkoholici nebo lidé žijící na stravě založené na loupáné rýži. Jeho nedostatek ve vyspělých zemích není obvyklý, jeho nedostatkem trpí ale starší lidé. Doporučená denní dávka thiaminu je 1 mg. Obsah vitamínu B<sub>1</sub> v bezu černém nebyl doposud kvantifikován [2, 23].



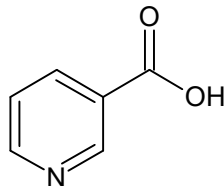
Obr.11. Chemický vzorec thiaminu [22].

Vitamin B<sub>2</sub> neboli riboflavin je základní složkou dvou koenzymů, které hrají hlavní roli při výrobě energie, buněčné funkci, růstu a vývoji a metabolismu tuků, léků a steroidů. Jeho zdrojem jsou běžně konzumované potraviny jako mléko, chléb a pečivo. Tudíž je nedostatek riboflavinu v rozvinutých zemích spíše vzácností i přes to, že schopnost organismu zajistit jeho ukládání je omezená. Ohrožení jsou adolescenti z důvodu notoricky špatných stravovacích návyků. Deficient riboflavinu může být proto indikátorem špatného stravování. Potřeba riboflavinu se řídí rychlostí spalování organismu. Přítomnost riboflavinu ovlivňuje správnou funkci niacinu a vitamínu B<sub>6</sub>. Doporučená denní dávka je 1,5 až 1,7 mg riboflavinu a 100 g plodů bezu černého obsahuje asi 0,78 mg riboflavinu [2, 23].



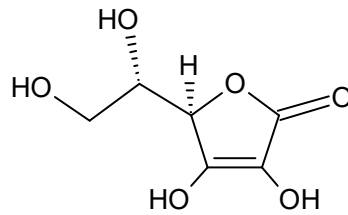
Obr.12. Chemický vzorec riboflavinu [22].

Vitamín B<sub>3</sub> neboli niacin je prekurzorem nikotinamidových nukleotidových koenzymů NAD a NADP, které se podílí na tvorbě energie v buňkách. Dále je potřebný k tvorbě neurotransmiterů a udržuje zdravou pokožku a zažívací systém. Niacin může v těle vznikat přeměnou aminokyseliny tryptofanu, která je přítomná v mnoha bílkovinách. Niacin, který vzniká touto přeměnou, je velice rychle dostupný pro tělo. Velké množství niacinu se nachází například v játrech, luštěninách, drubeži, ořechách nebo obilninách. Pokud potraviny obsahují málo niacinu, mohou vynahrazovat jeho nedostatek tryptofanem, jako je to například u sýru, mléka a vajec. Jeho nedostatek může způsobit depresi a kožní vyrážku. Doporučená denní dávka niacinu je 10 až 20 mg a jeho obsah v 1 litru bezové šťávy je asi 40 mg [2, 23].



Obr.13. Chemický vzorec niacinu [22].

Vitamín C neboli kyselina askorbová má mnoho pozitivních účinků na lidský organismus. Je životně důležitý pro tvorbu kolagenu, který je podmínkou pro zdravou kůži, kosti, chrupavky, zuby a dásně. Hraje roli při hojení ran a spálenin a účastní se tvorby noradrenalinu, který reguluje tok krve a serotoninu, který ovlivňuje náladu. Vitamín C také chrání buňky před oxidativním stresem tak, že reagují s ROS a s oxidovanou formou vitamínu E. Tím zabezpečují ochranu vitamínu E a lipidů membrán před oxidací. Zelené rostliny, které si zajišťují přísun energie prostřednictvím fotosyntézy, syntetizují vitamín C, který jim slouží k regulaci množství aktivních forem kyslíku a uplatňuje se při růstu a diferenciaci buněk. Lidské tělo si vitamín C neumí samo syntetizovat, proto je důležité ho přijímat v potravě. Podléhá oxidaci a degraduje působením světla a vysoké teploty, je to nejméně stabilní vitamín. Nedostatek vitamínu C se projevuje únavou, nechutí k jídlu, onemocněním dásní, špatnému hojení ran, oslabením kostí a celkovou slabostí [2, 24, 22]. Obsah vitamínu C ve šťávě z plodů bezu černého se pohybuje okolo 15 mg ve 100 g šťávy [25].



Obr.14. Chemický vzorec kyseliny askorbové [22].

Aby byly zajištěny základní biologické funkce, musí lidský organismus přijímat určité množství minerálních látek prostřednictvím potravy. V bezu černém byly nalezeny tyto látky a seřazeny sestupně podle obsaženého množství v 1 litru bezové šťávy: sodík, draslík, vápník a hořčík. Dále byly nalezeny stopové prvky jako chrom, kobalt, mangan, měď, zinek, železo, nikl a vanad [22, 25].

V lidském těle se vyskytuje převážně extracelulárně 70 až 100 g sodíku. Doporučená denní dávka je 500 mg. Obsah sodíku v 1 litru bezové šťávy nepřesahuje  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , tudíž konzumace tohoto množství bezové šťávy nepokryje denní doporučený příjem sodíku. Draslíku se v lidském těle vyskytuje intracelulárně a jeho obsah činí 140 až 180 g. Doporučená denní dávka je přibližně 2 g. V některých odrůdách bezu je přes  $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  draslíku, tudíž litr bezové šťávy bohatě pokryje denní příjem draslíku. Vápník je v lidském těle z 99 % obsažen v kostech a zubech. V těle je ho asi 1500 g a doporučená denní dávka je 800 až 1200 mg. Obsah vápníku v 1 litru bezové šťávy je zcela zanedbatelný v porovnání s doporučenou denní dávkou. Obsah hořčíku v těle činí 25 až 40 g a jeho doporučená denní dávka je 300 až 375 mg. V 1 litru bezové šťávy může být u některých odrůd bezu černého obsaženo až  $300 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , tudíž denní dávka může být téměř plně pokryta [22, 25].

## 2.3 Škodlivé látky v bezu černém

Toxické látky bezu černého byly nalezeny převážně v listech, kůře a nezralých plodech. Požívání těchto částí rostlin může vyvolávat zvracení nebo průjem, nicméně jejich aroma může odradit škůdce a hlodavce, proto je bez černý hojně vysazován v blízkosti obydlí. Škodlivé látky v bezu černém nejsou vhodné pro zpracování v potravinářském nebo kosmetickém průmyslu. Nejvýznamnějšími látkami nacházející se v bezu černém jsou kyanogenní glykosidy (kap. 2.3.1) a lektiny (kap.2.3.2) [26].

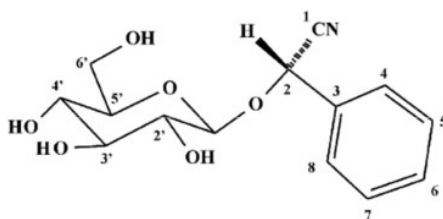
### 2.3.1 Kyanogenní glykosidy

Mezi nejvýznamnější potenciálně škodlivé látky obsažené v bezu černém patří kyanogenní glykosidy, což jsou významné alelochemické látky. To znamená, že látka vytvořená jedním organismem je toxická pro jiný organismus. Hydrolyzou kyanogenních sloučenin vzniká kyanovodík, benzaldehydy a hydroxybenzaldehydy, které jsou navíc oxidovány na kyselinu benzoovou. Přítomnost těchto kyanogenních sloučenin s největší pravděpodobností způsobuje hořkou chuť, charakteristické aroma a toxicitu rostliny. Díky této vlastnosti rostlina odpuzuje predátory. Není vhodné požívat části rostliny, které jsou bohaté na kyanogenní glykosidy, jelikož mohou způsobit zvracení a průjem. Tyto látky se vyskytují v převážně v nezralých plodech a listech bezu černého a lze je degradovat během tepelného zpracování [2, 7].

Koncentrace kyanogenních glykosidů v rostlině je ovlivněna několika faktory. Nejvíce kyanogenních glykosidů bylo nalezeno ve starších listech, menší množství se nachází

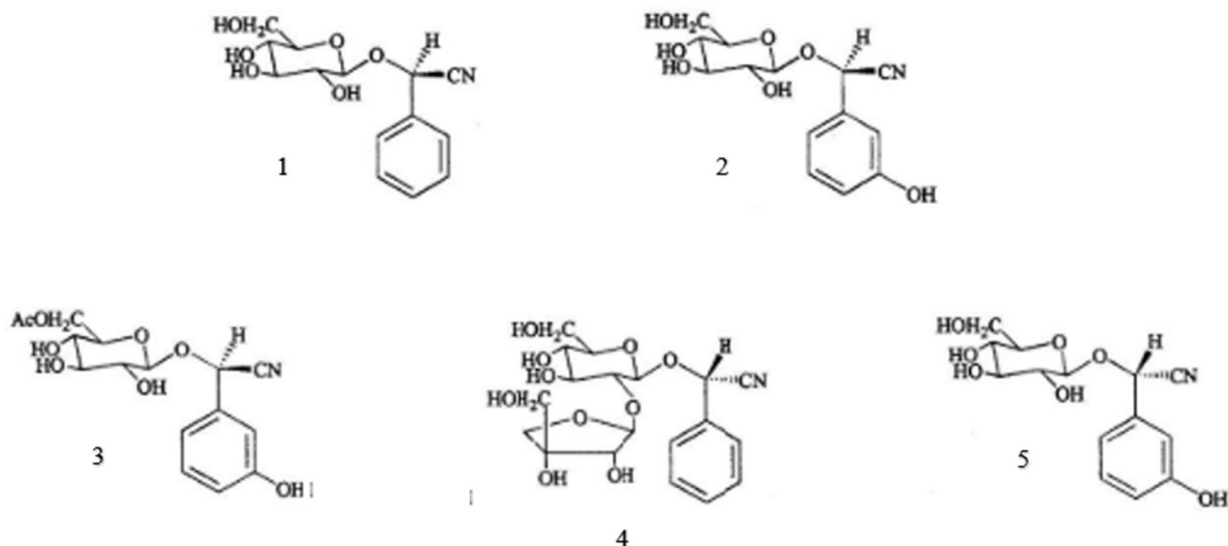
ve květech, zatímco plody obsahují nejmenší množství těchto sloučenin. Kritickým faktorem ovlivňující koncentraci kyanogenních glykosidů v bezu černém je také teplota a prostředí. Během období nízkých teplot a pomalého vegetativního růstu se rostliny brání proti predátorům prudkým nárůstem kyanogenních glykosidů. Naopak pokud se zlepší podmínky pro opětovný růst rostliny a bez černý nemusí bránit sám sebe proti predátorům, koncentrace kyanogenních glykosidů se snižuje. Rovněž bylo zjištěno, že obsah těchto látek se zvyšuje v závislosti na rostoucí nadmořské výšce [27].

Nejvýznamnějším zástupcem kyanogenních glykosidů v nezralých plodech bezu černém je sambunigrin. Aglykon je tvořen kyanhydrinem a glykonem je glukosa. Smrtná dávka kyanovodíku pro člověka je 0,5 až 3,5 mg·kg<sup>-1</sup>. Testy prokázaly, že 1 litr bezové šťávy obsahuje jen 0,0001 % kyseliny kyanovodíkové [2].



Obr.15. Chemický vzorec sambunigrinu [15].

V listech a nezralých plodech bezu černého byly dále nalezeny následující deriváty sambunigrinu (Obr.16): prunasin, holocalin, acetylholocalin, mandelonitril a zierin (Obr.16) [26].



Obr.16. Chemické vzorce 1-prunasinu, 2-holocalinu, 3-acetylholocalinu, 4-mandelonitrilu a 5-zierinu [26].

### 2.3.2 Lektiny

Lektiny se řadí mezi proteiny inaktivující ribozomy (RIP). Jsou to toxiny, poskytující rostlinám ochranu před predátory, a jsou rozděleny do dvou skupin. RIP typu 1 se skládají z jednoho polypeptidového řetězce, který svou vysoce specifickou rRNA N-glykosidázovou aktivitou

enzymaticky poškozují ribozomy. Jsou rozšířené v rostlinné říši a představují velkou skupinu evolučních proteinů. RIP typu 2 jsou složeny ze dvou řetězců A a B, které jsou spojeny disulfidovými můstky. Řetězec A vykazuje rRNA N-glykosidázovou aktivitu a sekvenční podobnost s RIP 1. Druhý řetězec B postrádá N-glykosidázovou aktivitu, ale vykazuje schopnost vázat se na polysacharidy receptorů přítomných na povrchu buňky. Řetězec B umožňuje RIP typu 2 vstoupit do buňky, a tím poskytnout řetězci A přístup k ribozomům a spustit jejich inaktivaci. Doposud popsané známé RIP typu 1 vykazují daleko menší toxicitu než RIP typu 2. Tato skutečnost se připisuje přítomnosti řetězce B, který usnadňuje vstup molekuly do buňky. Kromě známých toxinů ricinu a abrinu bylo popsáno jen málo RIP typu 2 [28, 29, 30]

RIP typu 1 vykazuje depurinační aktivitu na úrovni ribozomů. Bylo zjištěno, že RIP také podporují depurinaci nukleových kyselin, které nejsou ribozomální, jako jsou genomová virová RNA a dokonce DNA. Tato depurinace činí polyfosfátovou kostru nukleové kyseliny citlivější na kyselý anilin [29, 30].

Kůra bezu černého obsahuje směs RIP typu 2 jako jsou nigrin b (SNA-V), bazický nigrin b, SNA-I (sambucus nigra agglutinin I) a SNA-II (sambucus nigra agglutinin II). Z plodů bezu černého byly dále izolovány nigrin s a nigrin f [29, 30].

## 2.4 Využití jednotlivých částí rostlin

Téměř každá část rostliny má nějaké kulinářské využití. Zralé plody nebo šťávy mohou být použity při zpracování džemů nebo želé. Ve vinařství se z plodů vyrábí víno a květy mohou být využity k jeho aromatizaci. Bezinky mohou být využity také při přípravě sirupů, punčů a likérů. Květy jsou často přidávány do těsta při pečení různých moučníků. Bez černý si našel své místo i v lidovém léčitelství. Květy se využívají při přípravě čaje nebo posilujících nápojů. Na rozdíl od bobulí a květů jsou starší listy a stonky považovány za škodlivé (*kap.2.3*). Naopak mladé výhonky po povaření mají chuť podobnou chřestu a mohou se konzumovat [2, 8].

## 2.5 Použité metody a techniky

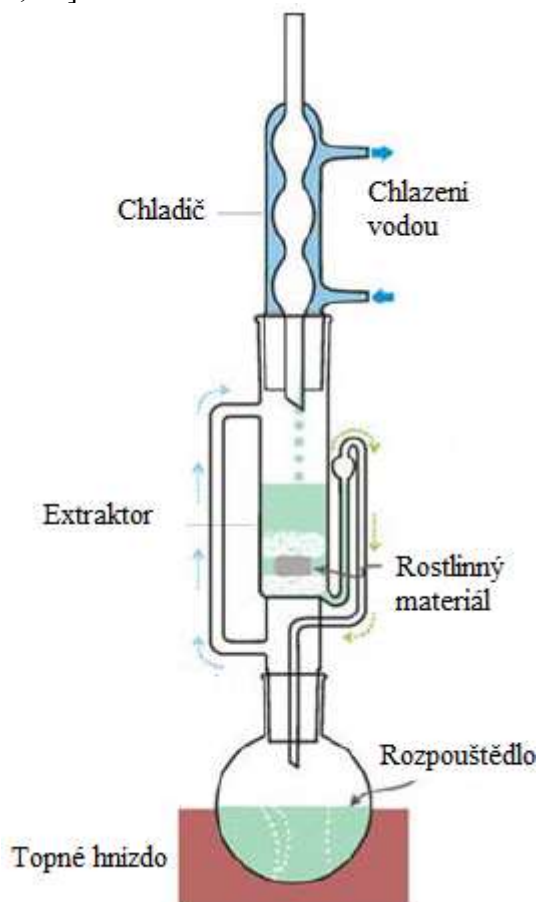
### 2.5.1 Extrakce a macerace

Extrakce je obecně separační metoda, při které dochází k přechodu jedné složky ze směsi v kapalnou nebo pevnou fázi do jiné kapalnou fáze (rozpouštědla). Složka se s původní směsí nemísí nebo se s ní mísí pouze omezeně. Proto je pro ni vhodný přechod do fáze, se kterou je mísitelná. Velkou výhodou tohoto procesu je, že dochází k izolaci tepelně nestálých látek. Využívá se k získání žádaného produktu v situacích, kdy je nevhodné použít destilaci, rektifikaci aj. Je obecným pravidlem, že extrakce je účinnější, když se provádí několikrát menšími dávkami rozpouštědla než jednou celým množstvím rozpouštědla [31, 32].

Extrakce se primárně dělí do dvou skupin, extrakce z kapaliny do kapaliny a extrakce z pevné fáze do kapaliny. Extrakce kapalina-kapalina patří mezi základní separační metody v chemické technologii. Cílem této metody je do rozpouštědla převést požadovaný analyt v co největším množství. Proto volíme rozpouštědlo, ve kterém je složka daleko více rozpustná než v původním rozpouštědle, ze kterého se extrahuje. Jedním rozpouštědlem je většinou voda nebo vodná fáze a druhé rozpouštědlo je organické, které je nemísitelné s vodou. Této metody se využívá, když je potřeba jako produkt získat tepelně labilní látky nebo složky malé relativní

těkavosti. Je třeba zvolit extrakční činidlo tak, aby bylo omezeně mísitelné s extrahovanou směsí, aby se extrahovaná složka dobře rozpouštěla, aby byla hustota rozpouštědla a směsi rozdílná, aby bylo rozpouštědlo dostatečně těkavé, snadno dostupné a nejedovaté. Podle způsobu provedení se extrakce z kapaliny do kapaliny rozděluje na vytřepávání a perforaci. Vytřepávání se provádí v dělicích nálevkách. Perforace je časově náročnější, ale účinnější kontinuální extrakce, která se provádí v perforátorech [31, 32, 33, 34].

Extrakce tuhá fáze-kapalina je metoda, při které se daná složka uvolňuje z pevné fáze do kapalného rozpouštědla. Hojně se využívá například v cukrovarnictví, parfumářském a farmaceutickém průmyslu při získávání silic, olejů a drog. Tato metoda je často nazývána vyluhování nebo loužení a je velice oblíbená při získávání léčivých látek z rostlinných materiálů. Při extrakci tuhá fáze-kapalina je nutné zajistit kontakt tuhé fáze a rozpouštědla za účelem přenosu dané složky, separaci výsledného roztoku od zbytkové tuhé fáze a případné oddestilování rozpouštědla. Dalším příkladem extrakce z pevné látky do kapaliny jsou macerace, digesce a perkolace. Macerace je extrakce pevné látky studeným rozpouštědlem. Tato metoda se hojně využívá při výrobě likérů, vín a vermutů. Jako rozpouštědlo se zde používá ethanol za studena pro extrakci sušených bylin, koření a ovoce. Oproti tomu digesce je extrakce horkým rozpouštědlem. Díky vyšší teplotě se zkrátí doba extrakce. Jednoduchým příkladem digesce je vaření čaje. Perkolace je opakovaná jednoduchá extrakce probíhající v Soxhletově extraktoru, který se skládá z varné baňky, extrakčního nástavce a zpětného chladiče (*Obr.17*) [31, 32, 33, 34].



*Obr.17. Soxhletův extraktor [35].*

Při extrakci a maceraci je mnoho faktorů, které mohou ovlivnit výsledný extrakt. Těmito faktory jsou například způsob extrakce, doba extrakce, teplota, druh rozpouštědla, poměr rozpouštědla a rostlinného materiálu atd. Výsledný extrakt také závisí na části rostliny, která je extrahována [31, 32]. V minulosti bylo provedeno již mnoho způsobů extrakce v souvislosti s bezem černým. Byla provedena extrakce větví bezu černého horkou vodou pod tlakem při 15 MPa [36], mikro extrakce tuhou fází sorpcí z plynné fáze nad vzorkem (HS-SPME) [37] a plody bezu černého byly extrahovány pomocí urychlené extrakce rozpouštědlem (ASE) [38]. Vzhledem k tomu, že se z bezu černého vyrábí velká spousta běžných každodenně využívaných výrobků, výrobci mají snahu provádět jednoduché vyluhování rozpouštědlem za laboratorní teploty bez potřeby drahého technického vybavení. Byla provedena spousta různých extrakcí na tento způsob lišící se druhem rozpouštědla, jeho teplotou a dobou extrakce [39, 40, 41].

## **2.5.2 Rozpouštědla použitá při extrakci**

### **2.5.2.1 *Ethanol***

Ethanol je rozpouštědlo běžně využívané v kosmetickém a potravinářském průmyslu. Je to čirá kapalina, která se používá k rozpouštění nebo extrakci jiných látek. V kosmetice se využívá denaturovaná forma ethanolu. Proces denaturace dává ethanolu vlastnost nepříjemné chuti, která znemožní jeho využití pro účely konzumace. Jeho antimikrobiální účinky zamezují růstu a množení mikroorganismů. Používá se nejčastěji v koncentraci až do 60 obj. %. Má adstringentní vlastnosti, což znamená, že stahuje póry pokožky a osvěžuje ji, ovšem ve vyšších koncentracích může pokožku vysušovat. Proto se využívá v pleťových přípravcích, kolínských vodách, vodách po holení, parfémeh atd. Při styku s kůží se rychle odpařuje, zanechává chladivý účinek, může mít vliv na hojení ran a může zvýšit absorpci jiných látek do kůže. Snižuje tendenci hotových výrobků k vytváření pěny při otřesech. Může sloužit jako maskování původního zápachu. Pro kosmetické účely je vhodnější než voda z desinfekčních a antimikrobiálních důvodů. Využívá se jako konzervant. V literatuře lze nalézt protichůdné důkazy o bezpečnosti aplikací ethanolu. Ethanol, jež je konzumován ve formě alkoholických nápojů, má prokazatelně karcinogenní účinky na lidský organismus. Dosud ale neexistuje dostatek důkazů o karcinogenním účinku ethanolu v kosmetických výrobcích a jeho spojitost se zvýšeným rizikem rakoviny kůže. Používání kosmetických přípravků s obsahem ethanolu ale může způsobit akutní dermatitidu, zvláště u lidí s nedostatkem aldehyddehydrogenázy. U dětí může ethanol vyvolat kožní toxicitu zejména skrze poraněnou kůži [42, 43].

### **2.5.2.2 *Glycerol***

Glycerol je bezbarvá viskózní kapalina bez zápachu. Je to jedna z nejvyužívanějších látek v kosmetickém průmyslu, která se přirozeně vyskytuje v kůži a je součástí živočišných i rostlinných tuků. Jedná se o trojsytný alkohol, který má nasládlou chuť a je rozpustný ve vodě. Vzniká jako vedlejší produkt při ethanolovém kvašení s využitím kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Jako substrát je použita glukóza a jejím kvašením za přítomnosti většího množství sířičitanů (nad 10 %) se částečně blokuje redukce acetaldehydu na ethanol, a tím je podpořena produkce glycerolu. Kvasinky se musí adaptovat na dané prostředí několik měsíců až rok postupným zvyšováním koncentrace sířičitanů v médiu. V současné době se vyrábí spíše jako vedlejší produkt při hydrolýze tuků nebo je syntetizován z propylenu [44, 45].

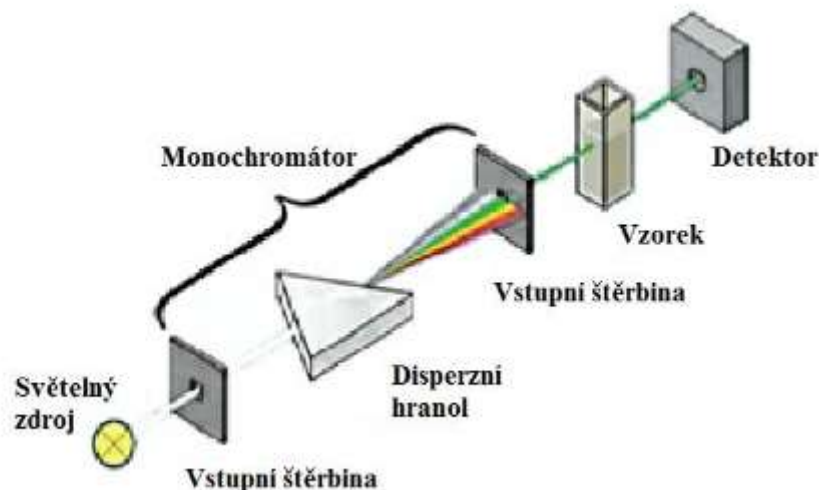
Hlavní předností glycerolu v kosmetických produktech je, že vykazuje dobré hygroskopické vlastnosti a je prakticky netoxický, s výjimkou velmi vysokých koncentrací, kdy lze pozorovat dehydratační účinky na kůži. Glycerol je dobrým dispergačním činidlem pro pigmenty, proto se používá v make-upech. Používá se při výrobě přípravků na vlasy, protože zabraňuje lámání vlasů, pomáhá je chránit před horkým vzduchem a podporuje růst. Přidává se do hydratačních krémů a mýdel, aby glycerol pomáhal kožním buňkám dozrávat. Jeho nevýhodou je, že může způsobovat lepkavost v krémech nebo pleťových vodách. To lze eliminovat použitím vhodného poměru glycerolu a vody nebo část nahradit jiným zvlhčovadlem, jako je sorbitol. Je trend nahrazovat glycerol sorbitolem i z ekonomických důvodů. Běžně se vyskytuje v zubních pastách a ústních vodách, kterým dává sladkou chuť, aniž by přispíval ke vzniku zubního kazu. Má antiseptický účinek a stejně jako ethanol podporuje absorpci jiných látek do kůže [45, 46, 47]. Glycerol je náchylný na kontaminaci mikroorganismy, a proto se do kosmetických přípravků přidává konzervant sorban draselný, a to 0,005 až 5 hm. % [48].

### **2.5.2.3 Propylenglykol**

Propylenglykol je druhé nejpoužívanější zvlhčovadlo používané v kosmetice. Je to bezbarvá viskózní kapalina, mísitelná s vodou, bez chuti a zápachu. Bezpečnost propylenglykolu je dobře známa a požití je neškodné, protože jeho oxidace v těle má za následek vznik metabolicky využitelných kyselin pyrohroznové a octové. Získává se z propylenu krakováním propanu. Propylen je přeměněn na chlorhydrin, který je následně přeměněn na glykol působením roztoku uhličitánu sodného. Propylenglykol může být také získán zahříváním glycerolu za přítomnosti roztoku hydroxidu sodného. Výhodou propylenglykolu je to, že je levnější než glycerol a zanechává lepší pocit na pokožce, pokud je použit do krémů a pleťových vod. Má antimikrobiální a hygroskopické vlastnosti, snižuje viskozitu, je to antioxidant a stabilizátor emulzí. Nevýhodou tohoto rozpouštědla je, že není přírodní, ale vyrábí se synteticky. Propylenglykol je bezpečný pro použití v kosmetických prostředcích při různých koncentracích v závislosti na typu výrobku [49]. Je používán ve velkém množství schválených léčivých přípravků jako neaktivní složka při koncentracích až do 98,09 % u lokálních léčiv a 92 % u perorálních léčiv [44, 47].

### **2.5.3 Spektrofotometrické stanovení polyfenolů**

UV-VIS spektrofotometrie je fyzikálně-chemická optická metoda, při které dochází k absorpci elektromagnetického záření při průchodu vzorkem o vlnových délkách 200-800 nm. Elektromagnetické záření se skládá ze složky elektrické a magnetické, které kmitají se stejnou fází a jsou na sebe kolmé. Platí zde Lambert-Beerův zákon, který říká že absorpce monochromatického světla procházejícího roztokem je úměrná koncentraci a dráze, kterou světlo roztokem prochází. Spektrofotometr měří intenzitu světla procházejícího roztokem vzorku v kyvetě a porovnává ji s intenzitou světla procházejícího slepým vzorkem. Mezi základní komponenty přístroje patří světelný zdroj, monochromátor s disperzním zařízením pro oddělení různých vlnových délek světla, držák vzorku s kyvetou a detektor (*Obr. 18*) [50].



Obr.18. Instrumentace UV-VIS spektrofotometru [51].

Výstupní bezrozměrnou veličinu představuje absorbance, což je pohlcené množství světla vzorkem a nabývá hodnot od 0 do nekonečna. Jednodušší spektrofotometry měří pouze při jedné vlnové délce a složitější přístroje dokáží měřit celé spektrum vzorku. Metoda se používá pro stanovení koncentrace neznámého vzorku. Připraví se sada kalibračních roztoků o známé koncentraci, proměří se jejich absorbance a sestrojí se kalibrační přímka. Podle rovnice kalibrační přímky se vypočítá koncentrace neznámého vzorku se známou absorbancí [50].

Spektrofotometricky je možné stanovit celkový obsah polyfenolů v extraktu bezu černého, a to několika různými způsoby. Je zde možnost spektrofotometrické zkoušky pomocí Folin-Ciocalteu nebo Folin-Denisova činidla (*kap.2.5.2.4 a kap.2.5.2.5*).

### 2.5.3.1 Test Folin-Ciocalteu

K určení celkového obsahu polyfenolů v potravinách se často používá Folin-Ciocalteuovo činidlo, které není specifické a detekuje všechny fenolové skupiny nacházející se v extraktu. Nevýhodou testu je zásah redukčních látek jako je kyselina askorbová. Nejznámější a velice oblíbenou metodou stanovení polyfenolických látek je postup Singleton & Rossi publikován v roce 1965 [52]. 0,5 ml extraktu reaguje s 2,5 ml 0,2 mol·l<sup>-1</sup> Folin-Ciocalteuovým činidlem po 4 minuty. Dále se přidají 2 ml bezvodého uhličitanu sodného o koncentraci 75 g·l<sup>-1</sup> a po inkubaci 2 hodin se měří spektrofotometricky při 760 nm.

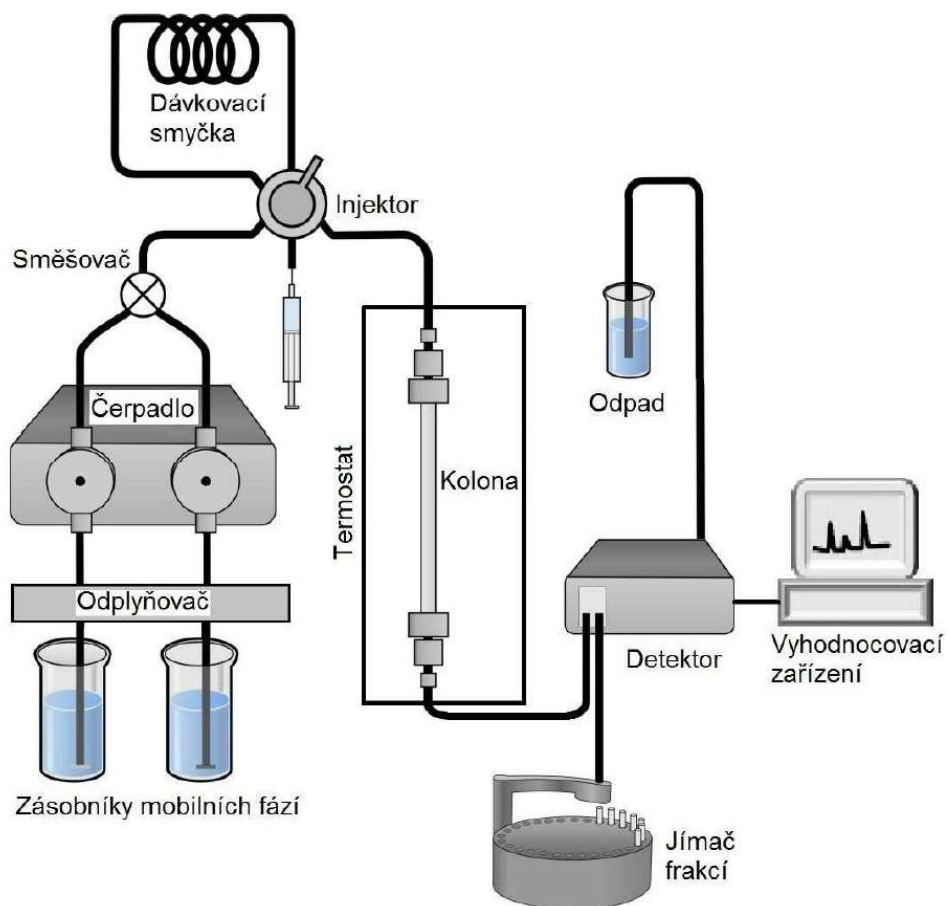
Provedení této metody se může lišit v závislosti na stanovované látce. V souvislosti s bezem černým bylo publikováno několik prací, které popisují postup celkového stanovení polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteuovy metody. Prvním postupem je smíchání 1 ml extraktu, Folin-Ciocalteuovo činidlo a voda v poměru 1:1:20. Následně se nechá roztok 8 minut stát, přidá se 10 ml 7% uhličitanu sodného, nechá se další 2 hodiny odstát a poté se měří absorbance spektrofotometricky při 750 nm [53]. Další postup říká, že se smíchá 0,5-1 ml extraktu s deionizovanou vodou a 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla. Nechá se 8 minut odstát, přidá se 10 ml uhličitanu sodného, nechá se další 2 hodiny odstát a poté se měří spektrofotometricky při 765 nm [54]. Ve všech případech byly výsledky porovnány se standardem kyseliny gallové. Přesný postup stanovení celkové koncentrace polyfenolů Folin-Ciocalteuovou metodou ve mnou připraveném extraktu bezu černého je popsán v experimentální části (*kap.3.3.5*).

### 2.5.3.2 Test Folin-Denis

Stanovení pomocí Folin-Denisova činidla se využívá při stanovení celkové koncentrace polyfenolů v rostlinách nebo nápojích. Redukcí Folin-Denisova činidla uhlíčitánem sodným dochází k modrému zbarvení roztoků. Folin-Denisovo činidlo obsahuje wolframan sodný, fosfomolybdenovou a fosforečnou kyselinu. Byla publikována modifikovaná Folin-Denisova metoda. Ke 0,5 ml vzorku se přidá 2,5 ml Folin-Denisova činidla a nechá se 5 minut stát. Poté se přidají 2 ml 14% uhlíčitánu sodného a nechá se 2 hodiny stát. Absorbance se měří spektrofotometricky při vlnové délce 760 nm [54, 55]. V souvislosti se stanovením celkové koncentrace polyfenolů v bezu černém se využívá především metoda Folin-Ciocalteua.

### 2.5.4 HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je analytická separační metoda, při které dochází k separaci složek vzorku za účelem stanovení jejich přítomnosti i koncentrace. Dochází k distribuci látek mezi nepohyblivou stacionární fází a pohyblivou mobilní fází. Vzorek se umístí na začátek stacionární fáze a pohybem mobilní fáze je unášen přes stacionární fází. Složky vzorku jsou stacionární fází zadržovány a postupně se od sebe oddělují. Na konec stacionární fáze se dostanou nejdříve složky, které jsou nejméně zadržovány v koloně. Mobilní fáze postupuje kolonou naplněnou sorbentem určitou rychlostí. Vzorek je unášen kolonou pomaleji než mobilní fáze. Při průchodu vzorku kolonou přejde každá molekula vzorku mnohokrát z proudu mobilní fáze na povrch sorbentu a zpět. V každém okamžiku musí být systém velmi blízko rovnováhy. Počet sorbovaných molekul se přibližně rovná počtu molekul desorbovaných. Doba, kterou průměrná molekula určité složky setrvává na povrchu sorbentu, závisí na velikosti interakce mezi složkou a sorbentem. Tato doba určuje pořadí, v jakém složka vychází z kolony. Kapalinový chromatograf obsahuje zásobníky mobilní fáze, která putuje přes odplyňovač do čerpadla, směšovače a dávkovací smyčky. Dávkovacím ventilem se přidává analyt a společně s mobilní fází putují do kolony naplněné sorbentem. Z kolony přechází do detektoru, kde jsou vyhodnoceny výsledky a zaznamenány grafy (*Obr. 19*) [53, 57, 58].



Obr.19. Schéma instrumentace HPLC [60].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie byla již mnohokrát využita při identifikaci a stanovení koncentrace různých bioaktivních látek. V bezu černém byly pomocí HPLC nalezeny tyto látky, jejichž přehled je shrnut v *Tabulce 2*.

Tabulka 2. Přehled látek nalezených v bezových extraktech pomocí HPLC.

Látka stanovená pomocí HPLC	Zdroje	Kapitola
Kyselina kávová a její deriváty	[61, 62]	2.2.3
Kyselina chlorogenová	[63, 64, 62]	
Rutin	[64, 62, 65]	
Kvercetin	[61, 63, 64]	
Isokvercetin	[64, 63, 65]	
Isorhamnetin-3-glukosid	[63]	
Kvercetin a jeho deriváty	[61, 64, 65]	
Kyanidin-3-sambubiosid	[61, 63, 66]	2.2.6
Kyanidin-3-glukosid	[61, 63, 66]	
Kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid	[61, 63, 66]	
Kyanidin-3,5-diglukosid	[61, 63, 66]	

## 2.6 Využití bezových extraktů v kosmetologii

Bez černý má mnohé využití v domácnostech. Z bezových květů lze jednoduše připravit čaj zalitím květů horkou vodou. Velice oblíbený je bezový sirup, který se připravuje zalitím květů horkou vodou nebo povaření plodů a následné přidání cukru. Na přípravu sirupů existuje mnoho různých receptů. Vlastnoručně vyrobenou šťávu je vhodné spotřebovat co nejdříve, protože čím déle se uchovává, tím více se ztrácejí účinky bioaktivních látek. Dále se z bezových plodů připravuje víno smícháním zralých plodů s cukrem a následným kvašením.

Nejen v domácnostech, ale i ve farmacii nachází bez černý mnohé využití. Z bezu černého se běžně vyrábí destiláty, na které je potřeba složitějších přístrojů, a tak je vhodné si je obstarat z lékárny. Často se vyrábí roztok bezové šťávy s přídavkem kyseliny askorbové.

Květy bezu mají zklidňující účinky na pleť, a proto mohou být využity k přípravě pleťové vody zalitím květů horkou vodou. Po vychladnutí se pleť ošetřuje pleťovou vodou od nečistot i od akné. Z bezu lze také připravit pleťovou masku rozdrcením květů a zalitím horkou vodou, až vznikne kašovitá hmota. Do masky se mohou přidat i jiné bylinky jako jsou heřmánek nebo květ lípy. Masky jemně a důkladně léčí uhřovitou pleť. Další možností využití bezu černého je příprava posilující koupele [2, 67].

Extrakt je možné také přidávat do krémů, tuhých a tekutých mýdel nebo do jakýchkoliv jiných přípravků určených k ošetření problematické pokožky [67].

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Použité chemikálie

- Sušené stonky a květy bezu černého z biosadu Agrofrukt Hustopeče, Česká republika
- Destilovaná voda, FCH VUT, Česká republika
- Demineralizovaná voda pro HPLC, FCH VUT, Česká republika
- Ethanol 96%, Sigma-Aldrich, USA
- Glycerol 85% Ph. Eur., M+H, Míča a Harašta s.r.o., Česká republika
- Sorban draselný, ACE Trade spol. s.r.o., Česká republika
- Folin-Ciocalteuovo činidlo, Sigma-Aldrich, USA
- Uhličitan sodný bezvodý, Lachema, Česká republika
- Propylen glykol 99% Ph. Eur., ACE Trade spol. s.r.o., Česká republika
- Methanol Ph. Eur., Penta, Česká republika
- Kyselina mravenčí 85%, Lach-Ner s.r.o., Česká republika
- Kyselina trans-ferulová  $\geq 99$  %, Sigma-Aldrich, USA
- Kyselina kávová  $\geq 98$  %, Sigma-Aldrich, USA
- Kyselina chlorogenová  $\geq 95$  %, Sigma-Aldrich, USA
- Rutin hydrát  $\geq 94$  %, Sigma-Aldrich, USA
- Glycerinová mýdlová hmota CRYSTAL NS, nerosící, Epifany s.r.o., Trenčín, Slovensko
- Bílá glycerinová mýdlová hmota s bambuckým máslem, Epifany s.r.o., Trenčín, Slovensko
- Mořská sůl, Epifany s.r.o., Trenčín, Slovensko
- Sůl z mrtvého moře, Epifany s.r.o., Trenčín, Slovensko

### 3.2 Použité přístroje, vybavení a ostatní materiály

- Běžné laboratorní vybavení
- Spektrofotometr Helios Gamma & Delta Spectronic Unicam, USA
- Analytické váhy A&D INSTRUMENTS LTD., HR-120-EC, Japan
- Mikropipety Thermo Scientific, USA
- pH metr Hanna instruments HI 221, Kanada
- Refraktometr A. Krüss Optronic GmbH, Německo
- Vodní lázeň Julabo TW 2, Německo
- Kapalinový chromatograf Shimadzu LC-10AD, Japonsko
  - Řídící jednotka Communication bus module CBM-10A, Shimadzu
  - Termostat kolony CT-10A, Shimadzu
  - DAD detektor DAD SPD-M10AVP, Shimadzu
  - Gradientová pumpa GT-104, Shimadzu
  - Odplyňovač FCV-10AL, Shimadzu
  - Dávkovací ventil Rheodyne, Model 7725i, ThermoFisher Scientific, USA
  - Kolona Kinetex Phenomenex Core-Shell Technology, EVO C18, 250 x 4,6 mm, velikost částic 5  $\mu$ l
  - PC se softwarem pro řízení a sběr dat Class-LC10

### 3.3 Pracovní postupy

#### 3.3.1 Optimalizace navážky rostlinného materiálu

Zředěním 96% ethanolu byl připraven zásobní roztok 40% ethanolu. Byly připraveny dvě sady vzorků se dvěma různými rozpouštědly. Do čtyř kádinek bylo postupně naváženo 15, 20, 25 a 30 g sušeného rostlinného materiálu a zalito 200 ml 40% ethanolu. Do dalších čtyř kádinek bylo opět naváženo postupně 15, 20, 25 a 30 g sušeného rostlinného materiálu a zalito 200 ml 85% glycerolu (*Tabulka 3*). Rostlinný materiál se extrahoval za laboratorní teploty po dobu 15 minut. Laboratorní teplota během všech experimentů se pohybovala v rozmezí od 21,5 až 23,5 °C. Rostlinný materiál byl odseparován od roztoku pomocí hrubého sítko. Všechny vzniklé extrakty bylo poté přefiltrováno za sníženého tlaku pomocí Büchnerovy nálevky. Celková koncentrace polyfenolů byla stanovena spektrofotometricky Folin-Ciocalteuovou metodou.

*Tabulka 3. Přehled navážek a objemu rozpouštědla při stanovení optimální navážky.*

Navážka rostlinného materiálu [g]	Druh a objem rozpouštědla	Poměr rostlinného materiálu ku rozpouštědlu
15	200 ml 40% ethanolu	1:13
20		1:10
25		1:8
30		1:7
15	200 ml 85% glycerolu bez konzervace sorbanem draselným	1:13
20		1:10
25		1:8
30		1:7

#### 3.3.2 Optimalizace doby extrakce

Zředěním 96% ethanolu byly připraveny zásobní roztoky 20%, 40% a 60% ethanolu. Pro optimalizaci doby extrakce bylo do čtyř kádinek postupně naváženo 25 g rostlinného materiálu. Do první kádinky bylo přidáno 200 ml 20% ethanolu, do druhé kádinky 200 ml 40% ethanolu, do třetí kádinky 200 ml 60% ethanolu a do čtvrté kádinky bylo přidáno 200 ml 85% glycerolu, který byl konzervován 1 % sorbanu draselného. Z těchto kádinek bylo postupně odebíráno 10 ml v časových intervalech 30 minut, 1 hodina, 3 hodiny, 24 hodin, 4 dny, 10 dní, 20 dní a 30 dní. Odebrané vzorky byly přefiltrovány za sníženého tlaku pomocí Büchnerovy nálevky a celková koncentrace polyfenolů byla stanovena spektrofotometricky Folin-Ciocalteuovou metodou.

Tabulka 4. Přehled navážek, objemu a druhu rozpouštědla při stanovení optimální doby extrakce.

Navážka rostlinného materiálu [g]	Druh a objem rozpouštědla	Poměr rostlinného materiálu ku rozpouštědлу
25	200 ml 20% ethanolu	1:8
	200 ml 40% ethanolu	
	200 ml 60% ethanolu	
	200 ml 85% glycerolu konzervovaného 1 % sorbanem draselným	

### 3.3.3 Optimalizace teploty

Zředěním 96% ethanolu byl připraven zásobní roztok 60% ethanolu. Pro stanovení optimální teploty bylo do dvou kádinek postupně naváženo 25 g rostlinného materiálu. Do obou kádinek bylo přidáno 200 ml 60 % ethanolu. Jedna kádinka byla umístěna do temperovacího zařízení a extrakce probíhala při 35 °C, zatímco ve druhé kádince s 60% ethanolu probíhala extrakce za laboratorní teploty. Byly odebírány vzorky v časových intervalech 30 minut, 1 hodina, 3 hodiny, 16 hodin, 20 hodin a 24 hodin. Odebrané vzorky byly přefiltrovány za sníženého tlaku pomocí Büchnerovy nálevky a celková koncentrace polyfenolů byla stanovena spektrofotometricky Folin-Ciocalteuovou metodou.

### 3.3.4 Výběr vhodného rozpouštědla

Pro stanovení vhodného rozpouštědla byly pro doplnění stávajících experimentů připraveny ještě dva extrakty. Do dvou kádinek bylo naváženo postupně 25 g rostlinného materiálu, který byl zalit v jedné kádince 200 ml vody a ve druhé kádince 200 ml 99% propylenglykolu. Byly odebírány vzorky v časových intervalech 30 minut, 1 hodina, 3 hodiny, 16 hodin, 20 hodin a 24 hodin. Odebrané vzorky byly přefiltrovány za sníženého tlaku pomocí Büchnerovy nálevky a celková koncentrace polyfenolů byla stanovena spektrofotometricky Folin-Ciocalteuovou metodou.

### 3.3.5 Stanovení polyfenolů spektrofotometricky

Folin-Ciocalteuovo činidlo bylo 10x zředěno tak, že do 100 ml odměrné baňky bylo napipetováno 10 ml činidla a doplněno po rysku destilovanou vodou.

Roztok uhličitanu sodného byl připraven navážením 7,5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, převedením do 100 ml odměrné baňky a doplněním destilovanou vodou po rysku.

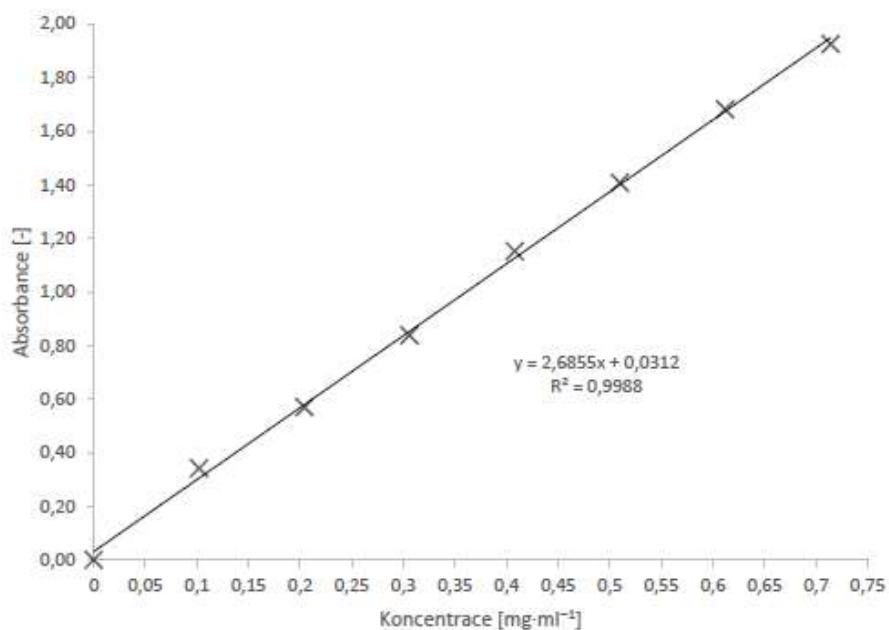
Koncentrace polyfenolů byla proměřena u všech extraktů 3x. Extrakty byly podle potřeby zředěny. Do zkumavek byl napipetován 1 ml zásobního roztoku Folin-Ciocalteuova činidla, 1 ml destilované vody a 0,1 ml vzorku. Roztoky ve zkumavkách byly promíchány a nechány 5 minut stát. Poté byl přidán 1 ml zásobního roztoku uhličitanu sodného, roztoky byly opět promíchány a nechány 15 minut stát. Slepý vzorek byl připraven podobným způsobem, jen místo vzorku bylo přidáno 0,1 ml 20%, 40%, 60% ethanolu, 85% glycerolu, vody nebo 99% propylenglykolu v závislosti na rozpouštědle stanovovaného extraktu. Koncentrace

polyfenolů byla stanovena při vlnové délce 750 nm. Tato metodika byla převzata z jiné práce [62].

Byl použit standard kyseliny gallové pro stanovení celkové koncentrace polyfenolů (kap.2.2.3). Byl připraven zásobní roztok kyseliny gallové o koncentraci  $1,02 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a jeho postupným ředěním byly připraveny roztoky o následujících koncentracích (Tabulka 5) a sestrojena kalibrační přímka (Obr.20)[62].

Tabulka 5. Koncentrace kalibračních roztoků kyseliny gallové a jejich absorbance [62].

Koncentrace kys. gallové [ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Absorbance
0,102	0,342
0,204	0,570
0,306	0,839
0,408	1,152
0,510	1,408
0,612	1,682
0,714	1,926



Obr. 20. Závislost absorbance kyseliny gallové na její koncentraci [62].

Po změření absorbance u jednotlivých připravených extraktů byla celková koncentrace polyfenolů vypočítána pomocí rovnice kalibrační přímky kyseliny gallové (1)[62]:

$$y = 2,6855 \cdot x + 0,0312 \quad (1)$$

### 3.3.6 Stanovení vybraných vlastností extraktu

S ohledem na největší celkovou koncentraci polyfenolů a na ekonomickou stránku výroby byl vyhodnocen nejlepší získaný extrakt luhováním bezových květů. Tento extrakt byl znovu připraven a byly stanoveny jeho vybrané vlastnosti.

#### 3.3.6.1 Stanovení indexu lomu

Připravený extrakt byl změřen pomocí refraktometru. Očištěný a osušený hranol byl pomocí kapátka zcela pokryt kapalným extraktem. Refraktometr byl uzavřen a ukazatel posunut do takové polohy, aby se rozhraní světla a tmy v okuláru nacházelo na středu kříže. Na stupnici byla odečtena hodnota indexu lomu.

#### 3.3.6.2 Stanovení pH

pH metr byl před měřením extraktu kalibrován na rozmezí hodnot 4 až 7. Do větší kádinky s extraktem byla ponořena elektroda a na digitálním displeji byla odečtena hodnota pH.

#### 3.3.6.3 Stanovení hustoty

Prázdný odměrný válec byl zvážen, naplněn 1 ml ethanolového extraktu a poté opět zvážen. Po odečtení hmotnosti prázdného válce od hmotnosti válce naplněného extraktem byla zjištěna hmotnost samotného extraktu. Ze známé hmotnosti a známého objemu byla vypočítána hustota extraktu podle vzorce (2).

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (2)$$

### 3.3.7 Analýza extraktu pomocí HPLC

V extraktu bezových květů jsou zastoupeny fenolické kyseliny, a to především kyselina chlorogenová, kávová a ferulová. Dále je zde rutin jako zástupce flavonoidních glykosidů. Byla využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s DAD detektorem pro stanovení a kvantifikaci těchto látek.

#### 3.3.7.1 Příprava mobilní fáze

Byla připravena mobilní fáze smícháním demineralizované vody pro HPLC, methanolu a kyseliny mravenčí. Bylo nutné optimalizovat poměr těchto látek, aby mohla analýza bez problémů proběhnout. Byly zkoumány dva poměry daných látek, a to 62:33:5 a 65:30:5. Mobilní fázi bylo nutné optimalizovat kvůli obsahu ethanolu v extraktu.

V případě první mobilní fáze bylo odměrným válcem odměřeno a poté smícháno 310 ml demineralizované vody pro HPLC, 165 ml methanolu a 25 ml kyseliny mravenčí.

V případě druhé mobilní fáze bylo odměrným válcem odměřeno a poté smícháno 325 ml demineralizované vody pro HPLC, 150 ml methanolu a 25 ml kyseliny mravenčí.

#### 3.3.7.2 Příprava standardů fenolických kyselin a rutinu

Byl připraven standard kyseliny chlorogenové o koncentraci  $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  navážením 0,1 g kyseliny chlorogenové a převedením do 100 ml odměrné baňky. Kvůli špatné rozpustnosti kyseliny chlorogenové bylo do odměrné baňky přidáno malé množství methanolu. Odměrná baňka byla

doplněna po rysku demineralizovanou vodou pro HPLC. Roztok byl 10x zředěn na výslednou koncentraci  $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Zředěný standard kyseliny chlorogenové byl změřen 3x a výsledná hodnota koncentrace byla vypočítána jako průměr hodnot z jednotlivých měření.

Byl připraven standard kyseliny kávové o koncentraci  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  navážením 0,1 g kyseliny kávové, převedením do 100 ml odměrné baňky a doplněním po rysku vodou pro HPLC. Roztok byl 10x zředěn na výslednou koncentraci  $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Zředěný standard kyseliny kávové byl změřen 3x a výsledná hodnota koncentrace byla vypočítána jako průměr hodnot z jednotlivých měření.

Byl připraven standard kyseliny ferulové o koncentraci  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  navážením 0,1 g kyseliny ferulové, převedením do 100 ml odměrné baňky a doplněním po rysku vodou pro HPLC. Roztok byl 10x zředěn na výslednou koncentraci  $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Zředěný standard kyseliny ferulové byl změřen 3x a výsledná hodnota koncentrace byla vypočítána jako průměr hodnot jednotlivých měření.

Byl připraven standard rutinu o koncentraci  $5,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  navážením 0,55 g rutinu, převedením do 100 ml odměrné baňky a doplněním po rysku vodou pro HPLC. Standard rutinu nebyl samostatně doměřen z časových důvodů. Tento standard byl pouze využit pro identifikaci rutinu v bezovém extraktu, nikoli na pro stanovení jeho koncentrace v bezovém extraktu.

### 3.3.7.3 Podmínky HPLC analýzy

Standardy a extrakt květů bezu černého byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie Shimadzu LC-10AD. Byla použita kolona Kolona Kinetex Phenomenex Core-Shell Technology, EVO C18, 250 x 4,6 mm s velikostí částic  $5 \mu\text{l}$  a detektor Shimadzu DAD SPD-M10AVP. Podmínky analýzy jsou uvedeny v následující *Tabulce 6*.

*Tabulka 6. Podmínky HPLC analýzy.*

Nástřík	5 $\mu\text{l}$
Průtok	$0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$
Teplota kolony	26 °C
Vlnová délka	240 nm
Doba analýzy	15 minut (standardy)
	30 minut (extrakt)

### 3.3.7.4 HPLC analýza bezového extraktu

Připravený bezový extrakt byl měřen pomocí vysokoúčinného kapalinového chromatografu s DAD detektorem. Byl připraven roztok smícháním 2 ml bezového extraktu, 2 ml mobilní fáze a 2 ml ethanolu. Z takto připraveného roztoku bylo do chromatografu nastříknuto 5  $\mu\text{l}$  vzorku a analýza byla provedena 3x.

Pro potvrzení, zda byla správně provedena identifikace píků fenolových kyselin a rutinu, byly provedeny doplňující zkoušky. Pro potvrzení správné identifikace píku kyseliny chlorogenové byl k připravenému roztoku bezu černého (2 ml bezový extrakt, 2 ml mobilní fáze, 2 ml ethanolu) přidán standard kyseliny chlorogenové o koncentraci  $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v poměru 1:1. Pík kyseliny chlorogenové by se měl zvýšit v závislosti na zvýšení její koncentrace

ve stanovovaném roztoku. Podobné experimenty byly provedeny také pro kyselinu kávovou, kyselinu ferulovou a rutin. Místo kyseliny chlorogenové je do připraveného bezového extraktu přidána kyselina kávová o koncentraci  $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , kyselina ferulová o koncentraci  $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  nebo rutin o koncentraci  $5,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , vždy v poměru 1:1.

### **3.3.8 Zapracování bezového extraktu do kosmetického výrobku**

Podle preferencí zadávající firmy Agrofrukt, která dodala rostlinný materiál, byly připraveny dva produkty z bezového extraktu, které najdou využití například v lázeňství. Těmito produkty jsou koupelová sůl a toaletní mýdlo. Proces jejich přípravy byl sensoricky optimalizován z hlediska barvy, vůně a konzistence.

Byly připraveny dvě velké kádinky. Do jedné z nich bylo převedeno 100 g glycerinové mýdlové hmoty a do druhé bylo převedeno 100 g mýdlové hmoty s bambuckým máslem. Mýdlová hmota byla rozpuštěna ve vodní lázni a bylo přidáno 5 ml ethanolového bezového extraktu. Obsah kádinky byl zamíchán a směs byla přelita do formiček a nechala se ztuhnout za laboratorní teploty. Do některých formiček byly přidány sušené květy bezu černého a poté zality rozpuštěnou mýdlovou hmotou.

Do plastové misky bylo naváženo 80 g mořské soli a 20 g soli z mrtvého moře. Bylo přidáno 5 g sušených bezových květů a 10 ml ethanolového bezového extraktu. Obsah misky byl promíchán a uzavřen víčkem.

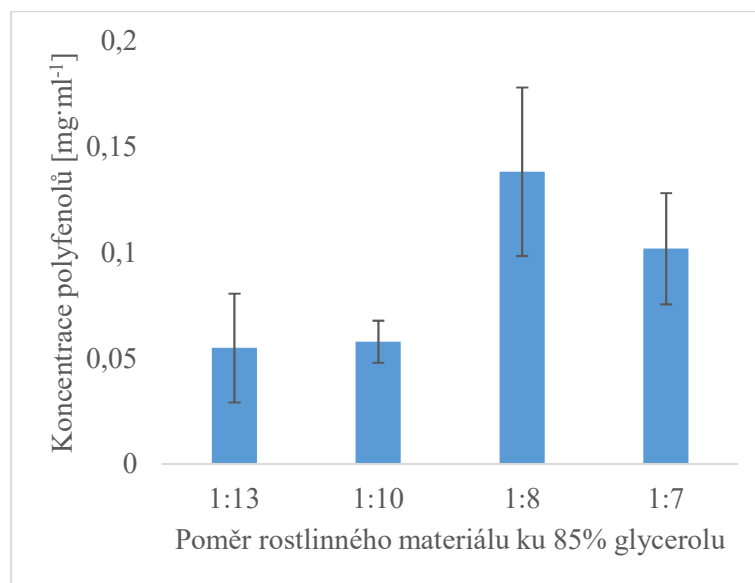
## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Optimalizace navážky rostlinného materiálu

Vhodné množství navážky bylo prověřeno pro dvě různá rozpouštědla, a to 40% ethanol a 85% glycerol bez konzervace. Byly prověřeny navážky sušeného materiálu 15, 20, 25 a 30 g. Následující *Tabulka 7* obsahuje vypočítané koncentrace polyfenolů v jednotlivých glycerolových extraktech.

*Tabulka 7. Výpočet koncentrace polyfenolů glycerolového extraktu bezu černého.*

Navážka [g]	Poměr rostlinného materiálu ku rozpouštědлу	Průměrná absorbance nezředěných roztoků	Celková koncentrace polyfenolů [ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]
15	1:13	0,178	0,055
20	1:10	0,187	0,057
25	1:8	0,402	0,138
30	1:7	0,304	0,102



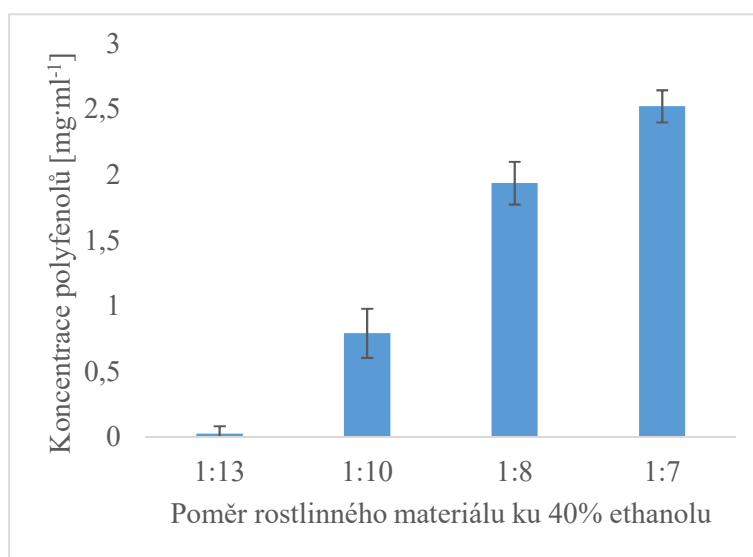
*Graf 1. Závislost koncentrace polyfenolů na poměru rostlinného materiálu ku 85% glycerolu.*

Z *Grafu 1* se zdá, že nejvhodnější navážka pro extrakci glycerolem je 25 g rostlinného materiálu. Pro další experimenty proto byla použita navážka 25 g. Navážka 30 g byla velice neefektivní pro extrakci, protože vysušené květy bezu černého jsou velice lehké a bylo problematické celou navážku plně ponořit do 200 ml rozpouštědla.

Stejným způsobem byla vyhodnocena koncentrace polyfenolů v ethanolových extraktech a výsledky jsou shrnuty v následující *Tabulce 8*.

Tabulka 8. Výpočet koncentrace polyfenolů ethanolového extraktu bezu černého.

Navážka [g]	Poměr rostlinného materiálu ku rozpouštědлу	Průměrná absorbance 10x zředěných roztoků	Celková koncentrace polyfenolů [ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]
15	1:13	0,024	0,027
20	1:10	0,244	0,792
25	1:8	0,551	1,937
30	1:7	0,709	2,523

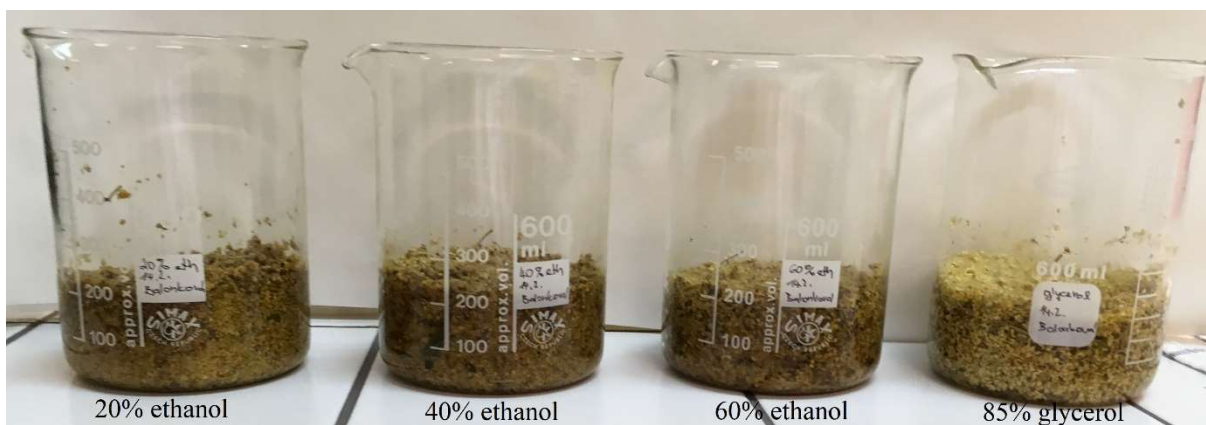


Graf 2. Závislost koncentrace polyfenolů na poměru rostlinného materiálu ku 40% ethanolu.

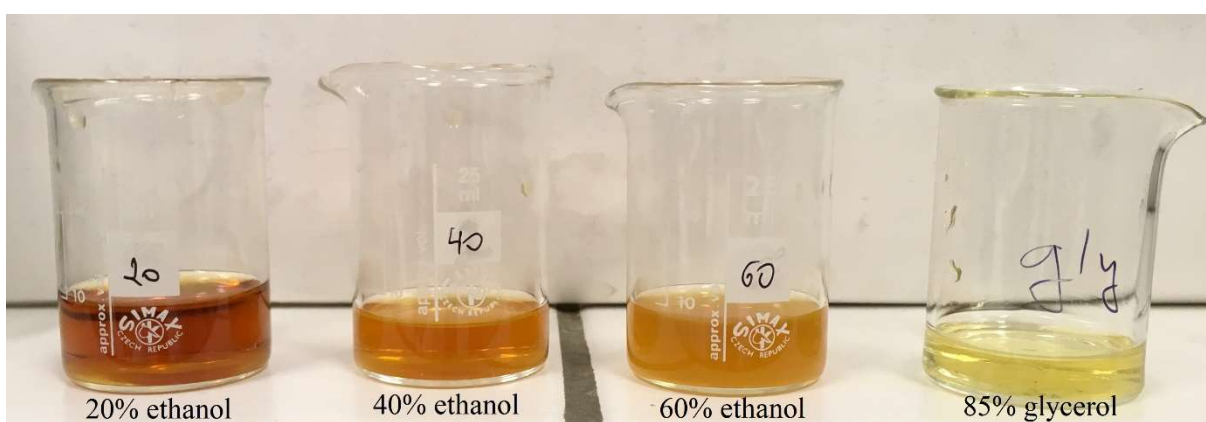
Výsledky z Grafu 2 sice ukazují, že ideální navážka pro extrakci polyfenolů ethanolem je 30 g, nicméně podobně jako u glycerolu byla navážka 30 g z praktického hlediska nevhodná, protože bylo problematické ponořit celý obsah kádinky do rozpouštědla. Proto byla pro další experiment vyhodnocena nejoptimálnější navážka jako 25 g sušeného rostlinného materiálu.

#### 4.2 Optimalizace doby extrakce

Vliv doby extrakce na koncentraci polyfenolů byla zkoumána pro čtyři různá rozpouštědla, a sice 20% ethanol, 40% ethanol, 60% ethanol a 85% glycerol, který byl konzervován 1 % sorbanu draselného (kap.2.5.2.2)[48]. Z teoretické části vyplývá, že ethanol se používá v koncentraci do 60 %. Při vyšších koncentracích může způsobit vysychání kůže (kap.2.5.2.1). S ohledem na finanční náročnost výroby, bylo zkoumáno, jestli méně koncentrovaný ethanol vyextrahuje stejné množství polyfenolů. Rostlinný materiál byl plně ponořen do rozpouštědla a nechal se luhovat. Vzorčky byly odebírány v časových intervalech 30 minut, 1 hodina, 3 hodiny, 24 hodin, 4 dny, 10 dní, 20 dní a 30 dní. V těchto časových intervalech bylo odebíráno vždy 10 ml extraktu. Po filtraci mohlo docházet k mírné ztrátě objemu získaného extraktu.



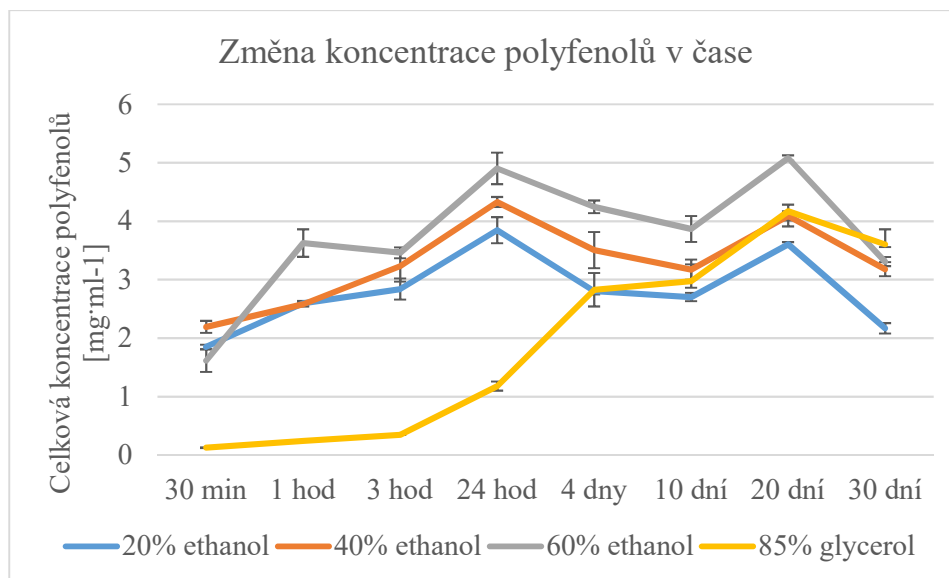
Obr. 21. Naložený rostlinný materiál do 4 různých rozpouštědel: 20% ethanol, 40% ethanol, 60% ethanol a 85% glycerol.



Obr.22. Odběr 10 ml extraktu po filtraci.

Tabulka 9. Celková koncentrace polyfenolů [ $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ] jednotlivých odběrů v různých časových intervalech pro různá rozpouštědla.

Doba extrakce	Poměr rostlinného materiálu ku rozpouštědлу	20 % ethanol	40% ethanol	60% ethanol	85% glycerol
30 minut	1:8	1,850	2,193	1,617	0,126
1 hodina	1:7,6	2,597	2,579	3,627	0,241
3 hodiny	1:7,2	2,840	3,235	3,461	0,349
24 hodin	1:6,8	3,847	4,329	4,903	1,180
4 dny	1:6,4	2,803	3,507	4,247	2,829
10 dní	1:6	2,704	3,172	3,867	2,976
20 dní	1:5,6	3,603	4,094	5,081	4,172
1 měsíc	1:5,2	2,169	3,181	3,310	3,603

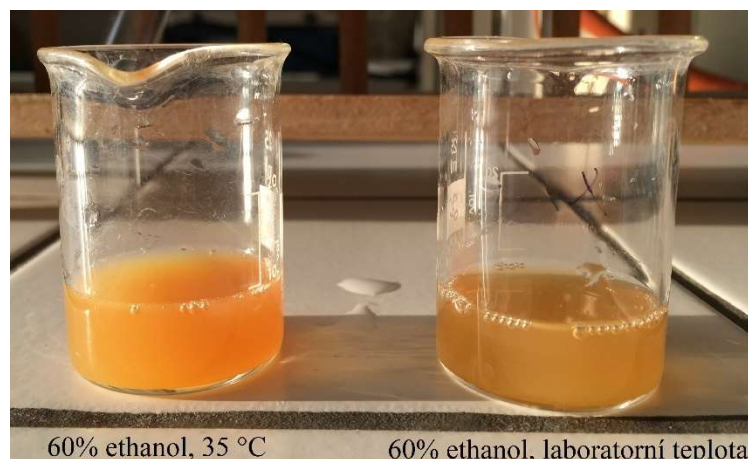


Graf 3. Změna koncentrace polyfenolů v různých časových intervalech.

Z vypočítaných hodnot koncentrací (Tabulka 9) a z Grafu 3 je vidět, že koncentrace polyfenolů v glycerolovém extraktu je v počátku extrakce až 10x nižší než u ethanolových extraktů. S prodlužující se dobou extrakce v glycerolu dochází k výraznému zvýšení celkové koncentrace polyfenolů. Po měsíci se koncentrace polyfenolů v glycerolu vyrovná celkové koncentraci polyfenolů v ethanolu. Glycerol jako rozpouštědlo není vhodný kvůli časové náročnosti extrakce, a tím i z ekonomického hlediska. U ethanolových extraktů koncentrace polyfenolů nejvíce narůstá už po 24 hodinách, poté dochází k poklesu koncentrace polyfenolů. Z grafu se zdá, že po 20 dnech dochází k nečekanému nárůstu koncentrace polyfenolů. Může to být způsobeno uvolněním jiných látek, například tríslovin. Při průmyslové výrobě je potřeba naložit rostlinný materiál do nějakých nádob nebo tanků, které mohou zabírat hodně místa. Z ekonomického hlediska i provozních důvodů byla tedy vyhodnocena vhodná doba extrakce jako 24 hodin.

### 4.3 Optimalizace teploty

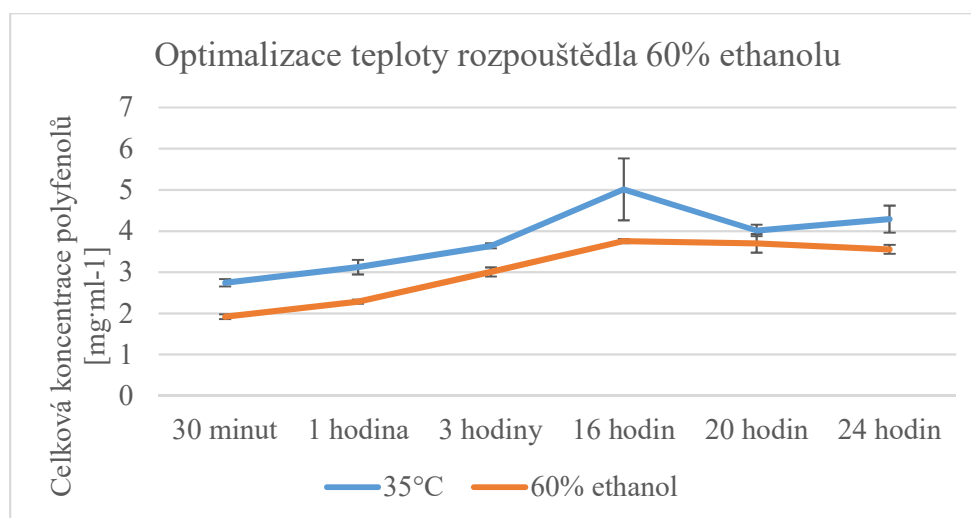
Optimální teplota rozpouštědla byla experimentálně stanovována pro 60% ethanol. Do dvou kádinek bylo naváženo 25 g sušeného rostlinného materiálu a zalito 200 ml 60% ethanolu. Obsah jedné kádinky byl temperován na 35 °C a obsah druhé kádinky byl ponechán při laboratorní teplotě (Obr.23). Teplota temperování 35 °C byla zvolena s ohledem na nízkou teplotní stabilitu antioxidantů v rostlinném materiálu. Vzorke byly odebírány v časových intervalech 30 minut, 1 hodina, 3 hodiny, 16 hodin, 20 hodin a 24 hodin. V těchto časových intervalech bylo odebíráno vždy 10 ml extraktu. Po filtraci mohlo docházet k mírné ztrátě objemu získaného extraktu. Tabulka 10 obsahuje hodnoty celkové koncentrace polyfenolů pro jednotlivé odběry temperovaných a netemperovaných extraktů v různých časových intervalech.



Obr.23. Filtrované extrakty bezu černého získané za laboratorní teploty a temperované na 35 °C.

Tabulka 10. Celková koncentrace polyfenolů [ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ] jednotlivých odběrů v různých časových intervalech pro ethanolový extrakt získaný za laboratorní teploty a ethanolový extrakt temperovaný na 35 °C.

Doba extrakce	Poměr rostlinného materiálu ku rozpouštědлу	Ethanol 35 °C	Ethanol 20 °C
30 minut	1:8	2,744	1,918
1 hodina	1:7,6	3,123	2,284
3 hodiny	1:7,2	3,640	3,007
16 hodin	1:6,8	5,014	3,756
20 hodin	1:6,4	4,015	3,701
24 hodin	1,6	4,290	3,557



Graf 4. Změna koncentrace polyfenolů v různých časových intervalech pro 60% ethanol za laboratorní teploty a temperovaný na 35 °C.

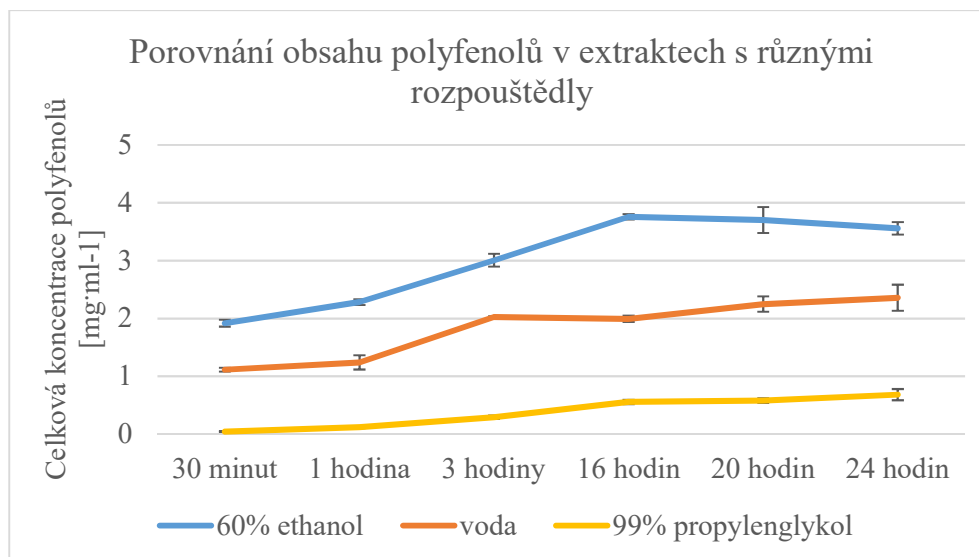
Jako lepší metoda byla vyhodnocena extrakce při teplotě 35 °C, ovšem s ohledem na ekonomickou stránku věci a provozní náklady temperovacího zařízení byla optimální teplota stanovena jako laboratorní teplota. Vyšší výtěžek polyfenolů nepokryje náklady na výrobu. V tomto experimentu se zároveň podrobněji zkoumala optimální doba extrakce. Při extrakci rostlinného materiálu 60% ethanolem za laboratorní teploty byla stanovena nejvyšší koncentrace polyfenolů po 16 hodinách luhování. Následně se koncentrace polyfenolů mírně snižovala. S ohledem na odchylku by se dalo tvrdit, že je koncentrace polyfenolů spíše konstantní, než aby se výrazně snižovala. Při extrakci rostlinného materiálu v 60% ethanolu temperovaného na 35 °C docházelo ke kolísání koncentrace polyfenolů. Z grafu se zdá, že nejvyšší koncentrace polyfenolů byla po 16 hodinách. Vzhledem k velké odchylce je tato hodnota nevěrohodná a nejvyšší koncentrace polyfenolů obsahoval extrakt, který byl luhován 24 hodin.

#### 4.4 Výběr vhodného rozpouštědla

Z předchozích experimentů bylo zjištěno, že z ekonomického hlediska je vhodnější extrakce 60% ethanolem za laboratorní teploty po dobu 24 hodin a s poměrem rostlinného materiálu ku rozpouštědlu 1:8. Pro další optimalizaci rozpouštědla byly přidány ještě dva experimenty, a sice extrakce vodou a 99% propylenglykolem za laboratorní teploty. Následující *Tabulka 11* a *Graf 5* ukazují výsledky experimentu a porovnání těchto dvou rozpouštědel s 60% ethanolem.

*Tabulka 11. Celková koncentrace polyfenolů [mg·ml<sup>-1</sup>] jednotlivých odběrů v různých časových intervalech pro vodu a propylenglykol v porovnání s ethanolem za laboratorní teploty.*

	60 % ethanol	Voda	99% propylenglykol
30 minut	1,918	1,115	0,046
1 hodina	2,284	1,240	0,123
3 hodiny	3,007	2,024	0,296
16 hodin	3,756	1,995	0,559
20 hodin	3,701	2,250	0,580
24 hodin	3,557	2,359	0,684

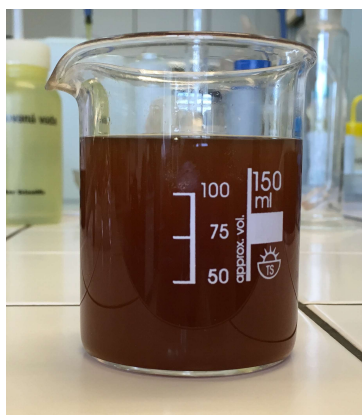


Graf 5. Celková koncentrace polyfenolů [ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ] jednotlivých odběrů v různých časových intervalech pro vodu a propylenglykol v porovnání s ethanolem za laboratorní teploty.

Z grafu je zřejmé, že koncentrace polyfenolů byla nižší při použití rozpouštědel vody a 99% propylenglykolu. Tento experiment potvrdil závěry všech ostatních experimentů. Voda ani 99% propylenglykol není lepším rozpouštědlem než 60% ethanol. Optimální je tedy extrakce 60% ethanolem za laboratorní teploty po dobu 24 hodin s poměrem rostlinného materiálu k ethanolu 1:8.

#### 4.5 Stanovení vybraných vlastností extraktu

S ohledem na největší celkovou koncentraci polyfenolů a na ekonomickou stránku výroby byl vyhodnocen nejlepší získaný extrakt luhováním bezových květů v 60% ethanolu za laboratorní teploty, v poměru rostlinného materiálu ku rozpouštědлу 1:8 po dobu 24 hodin. Tento extrakt (Obr.24) byl znovu připraven navážením 25 g rostlinného materiálu a zalitím 200 ml 60% ethanolu. Po 24 hodinách bych extrakt přefiltrován za sníženého tlaku. Pro další analýzy byl extrakt ještě přefiltrován přes filtrační papír a byly dále stanoveny jeho vybrané vlastnosti.



Obr.24. Extrakt bezu černého získaný luhováním 25 g rostlinného materiálu v 60% ethanolu za laboratorní teploty po dobu 24 hodin.

#### 4.5.1 Stanovení indexu lomu

Připravený extrakt byl změřen 3x pomocí refraktometru. Na stupnici byla odečtena hodnota indexu lomu jako  $1,365 \pm 0,02$  při teplotě  $22,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.5.2 Stanovení pH

Hodnota pH byla odečtena z pH metru. Roztok extraktu bezových květů v 60% ethanolu byl změřen 3x a hodnota pH byla stanovena jako  $5,743 \pm 0,006$ .

#### 4.5.3 Stanovení hustoty

Prázdný odměrný válec byl zvážen, naplněn 1 ml ethanolového extraktu a poté opět zvážen. Po odečtení hmotnosti prázdného válce od hmotnosti válce naplněného extraktem byla zjištěna hmotnost samotného extraktu. Ze známé hmotnosti a známého objemu byla stanovena hustota extraktu podle vzorce (2) jako  $0,9288\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ .

### 4.6 Analýza extraktu pomocí HPLC

V ethanolovém extraktu bezových květů jsou nejvíce zastoupeny fenolické kyseliny, a to především kyselina chlorogenová, kávová a ferulová. Dále je zde rutin jako zástupce flavonoidních glykosidů. Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s DAD detektorem byly tyto látky stanoveny a jejich koncentrace kvantifikována pomocí připravených standardů. Výsledky jsou shrnuty v kapitole 4.6.2.

#### 4.6.1 Optimalizace mobilní fáze

K detekci a ke stanovení koncentrace vybraných látek v bezovém extraktu byly testovány dvě mobilní fáze o různém složení. Obě byly připraveny smícháním demineralizované vody pro HPLC, methanolu a kyseliny mravenčí v různém poměru. Bylo nutné optimalizovat poměr těchto látek, aby mohla analýza bez problémů proběhnout. Volba vhodné mobilní fáze je důležitá k tomu, aby dané látky byly eluovány za adekvátní dobu 20 minut. Pokud je použita nesprávná mobilní fáze, látky mohou být eluovány za delší čas, což je nežádoucí. Při použití nesprávné mobilní fáze může také dojít k tomu, že látky v extraktu bezu černého od sebe nebudou dostatečně odděleny.

Byly zkoumány 2 poměry vody pro HPLC, methanolu a kyseliny mravenčí, a to 62:33:5 a 65:30:5. Mobilní fázi bylo nutné optimalizovat kvůli obsahu ethanolu v extraktu. Mobilní fáze s poměrem látek 62:33:5 nebyla vyhovující, protože dané látky v grafu od sebe nebyly dostatečně odděleny a píky nešly spolehlivě přechít.

Mobilní fáze s poměrem látek 65:30:5 byla vyhovující a byla použita v následujících analýzách jak standardů, tak připraveného bezového extraktu. Kolona byla touto mobilní fází stabilizována přes noc.

#### 4.6.2 Analýza roztoků standardů

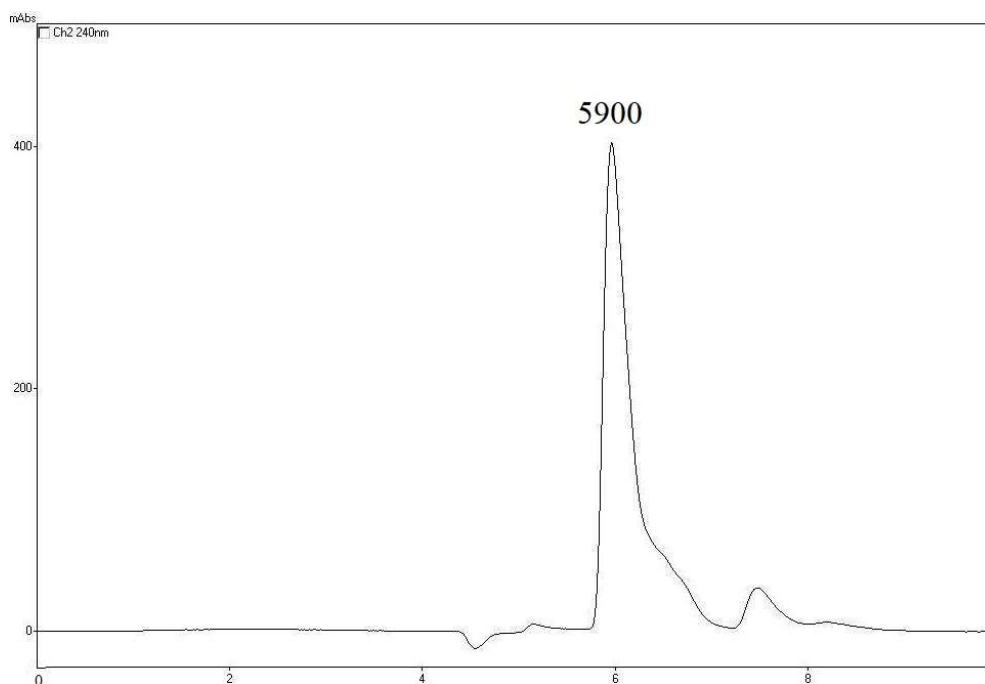
Pomocí kapalinové chromatografie byly nejdříve změřeny vzorky připravených standardů. Měření byla provedena vždy 3x. Ze získaných grafů byl stanoven retenční čas jednotlivých látek, obsah plochy píku a jeho výška. Ze známé koncentrace standardu byla vypočítána

koncentrace rutinu, kyseliny chlorogenové, kávové a ferulové v připraveném bezovém extraktu.

Nejdříve byl změřen standard kyseliny chlorogenové o koncentraci  $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Do kapalinového chromatografu byl nadávkován ve směsi s mobilní fází v poměru 1:1.  $5 \mu\text{l}$  roztoku kyseliny chlorogenové o výsledné koncentraci  $0,05 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  bylo nastříknuto do dávkovacího ventilu. Měření bylo opakováno 3x. Průměrné hodnoty změřených veličin kyseliny chlorogenové jsou shrnuty v *Tabulce 12*.

*Tabulka 12. Průměrné hodnoty retenčního času, plochy píku a výšky píku kyseliny chlorogenové.*

Standard kyseliny chlorogenové	
Retenční čas [s]	5900
Plocha píku [ $\text{mAU}\cdot\text{min}^{-1}$ ]	8851524
Výška píku [mAU]	409091

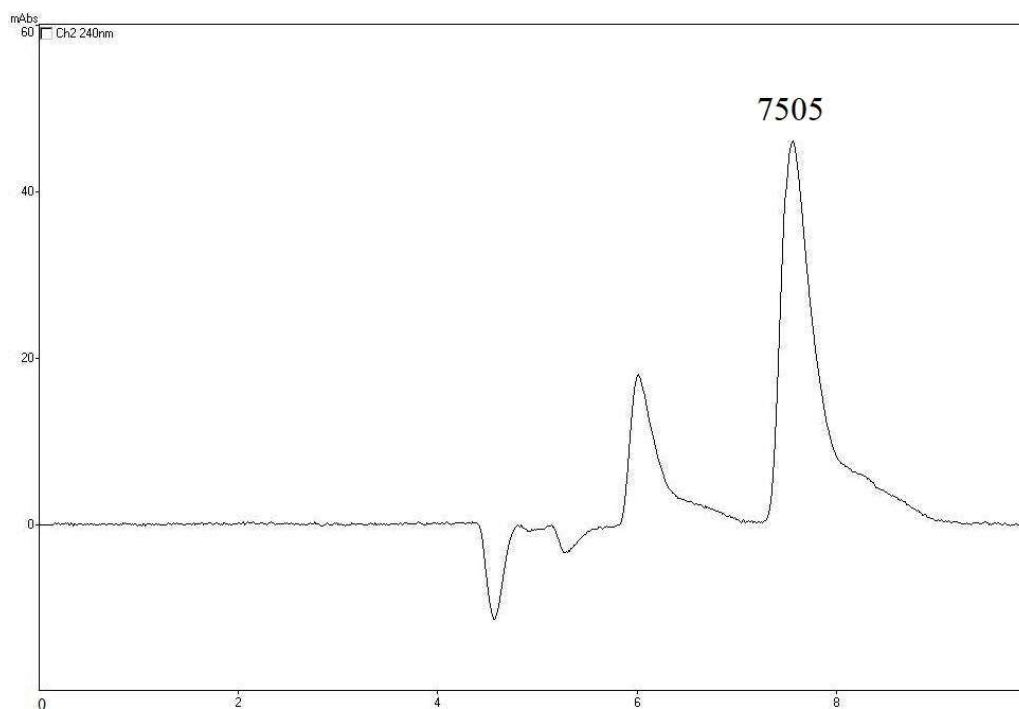


*Graf 6. Křivka standardu kyseliny chlorogenové s retenčním časem 5900 s.*

Dále byl změřen standard kyseliny kávové o koncentraci  $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Byl nadávkován do kapalinového chromatografu ve směsi s mobilní fází v poměru 1:2.  $5 \mu\text{l}$  roztoku kyseliny kávové o výsledné koncentraci  $0,033 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  ve směsi s mobilní fází bylo nastříknuto do dávkovacího ventilu. Měření bylo opakováno 3x. Průměrné hodnoty změřených veličin kyseliny kávové jsou shrnuty v *Tabulce 13*.

Tabulka 13. Průměrné hodnoty retenčního času, plochy píku a výšky píku kyseliny kávové.

Standard kyseliny kávové	
Retenční čas [s]	7505
Plocha píku [mAU·min <sup>-1</sup> ]	1123958
Výška píku [mAU]	46802

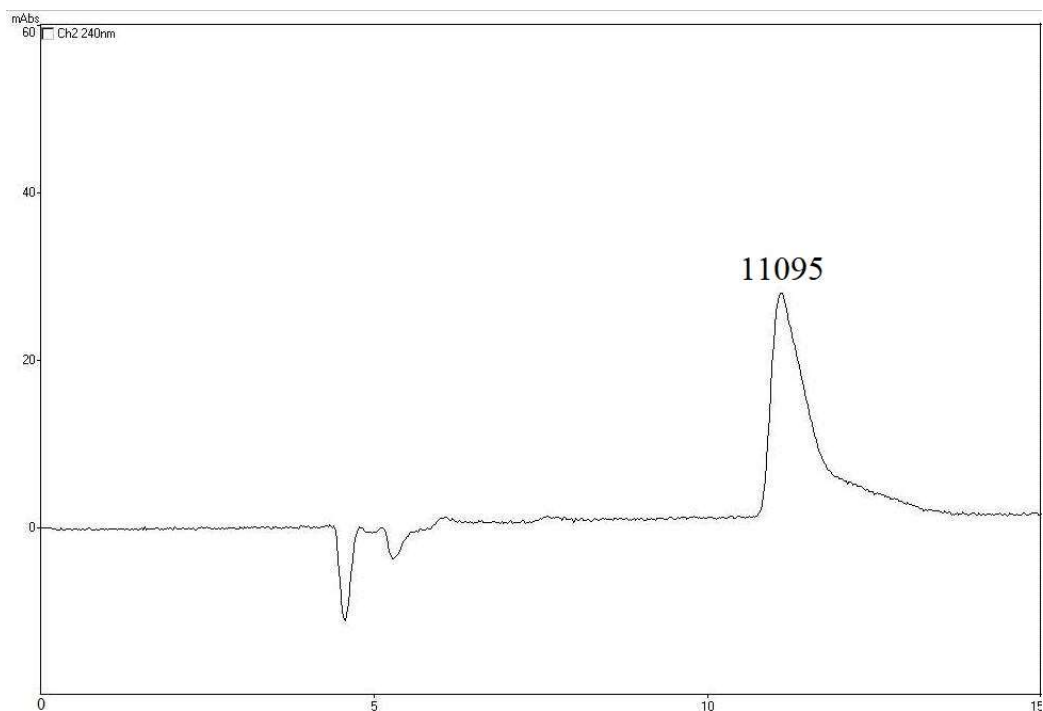


Graf 7. Křivka standardu kyseliny kávové s retenčním časem 7505 s.

Stejným způsobem byl změřen standard kyseliny ferulové o koncentraci 0,1 g·l<sup>-1</sup>. Byl nadávkován do kapalinového chromatografu ve směsi s mobilní fází v poměru 1:2. 5 µl roztoku kyseliny ferulové o výsledné koncentraci 0,033 g·l<sup>-1</sup> ve směsi s mobilní fází bylo nastříknuto do dávkovacího ventilu. Měření bylo opakováno 3x. Průměrné hodnoty změřených veličin kyseliny ferulové jsou shrnuty v Tabulce 14.

Tabulka 14. Průměrné hodnoty retenčního času, plochy píku a výšky píku kyseliny kávové.

Standard kyseliny ferulové	
Retenční čas [s]	11095
Plocha píku [mAU·min <sup>-1</sup> ]	839214
Výška píku [mAU]	25726



Graf 8. Křivka standardu kyseliny ferulové s retenčním časem 11095 s.

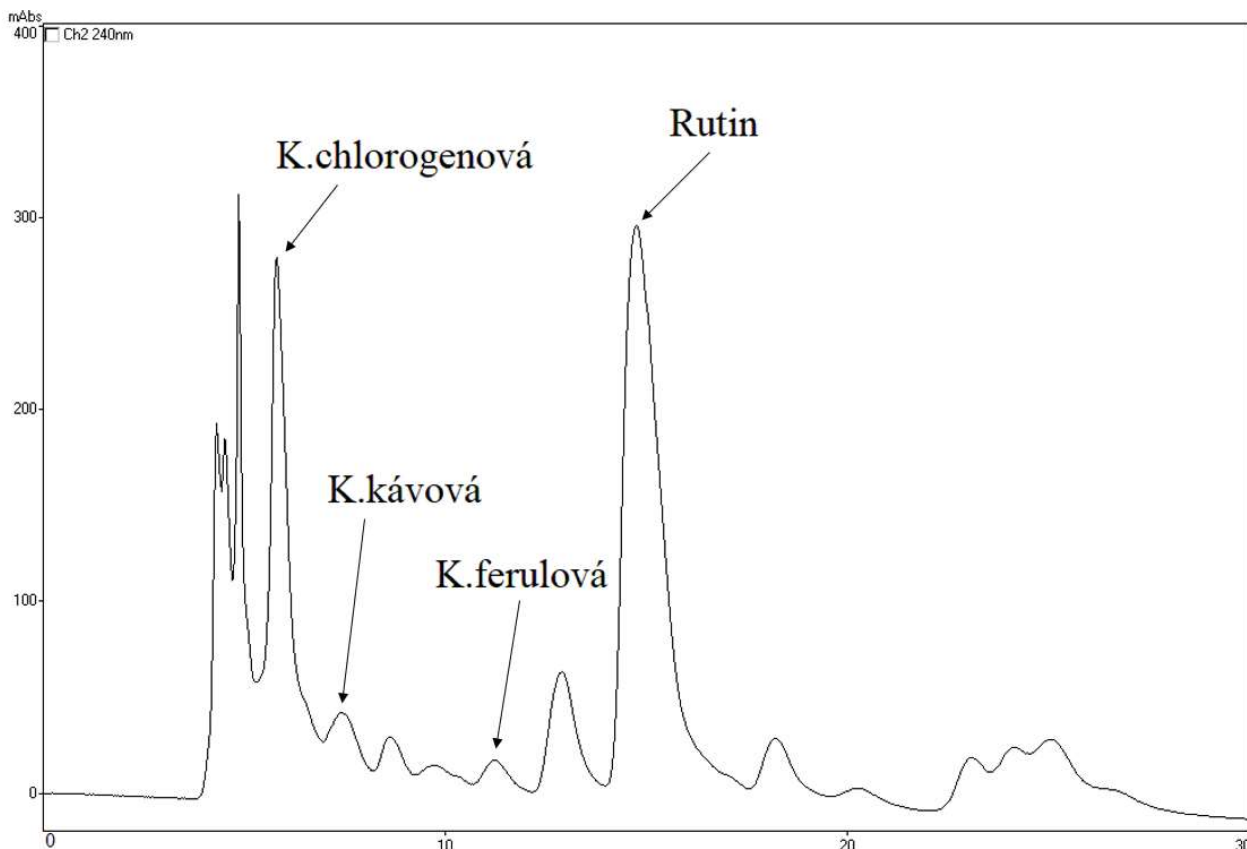
Standard rutinu o koncentraci  $5,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  nebyl z časových důvodů samostatně změřen. Byl využit pouze k doplňkové zkoušce pro potvrzení správné identifikace píku ve spektru bezového extraktu. Rutin byl tedy pouze identifikován, nikoli kvantifikován.

#### 4.6.3 Analýza extraktu bezu černého

Ke 2 ml vzorku bezového extraktu byly přidány 2 ml mobilní fáze a 2 ml ethanolu. Takto připravený vzorek byl dávkován do kapalinového chromatografu. Podle retenčního času byly identifikovány píky rutinu, kyseliny chlorogenové, kávové a ferulové (Graf 9). Měření bylo provedeno 3x a výsledné průměrné hodnoty z těchto měření jsou shrnuty v Tabulce 15.

Tabulka 15. Přehled průměrných hodnot retenčního času, plochy píku a výšky píku látek nalezených v ethanolovém extraktu bezu černého.

	Retenční čas [s]	Plocha píku [ $\text{mAU}\cdot\text{min}^{-1}$ ]	Výška píku [mAU]
Kyselina chlorogenová	5796	10209811	280958
Kyselina kávová	7428	2132757	40112
Kyselina ferulová	11266	656813	15371
Rutin	14824	19089689	294022



Graf 9. Identifikace vybraných látek v ethanolovém extraktu bezu černého.

Obvykle se neznámá koncentrace látek stanovuje ze známé koncentrace standardu a ze známých hodnot plochy píku podle rovnice (3), kde  $c_E$  je neznámá koncentrace dané látky v extraktu,  $c_S$  je koncentrace standardu,  $S_E$  je plocha píku dané látky v extraktu a  $S_S$  je plocha píku standardu.

$$c_E = \frac{S_E}{S_S} \cdot c_S \quad (3)$$

Pro stanovení koncentrace daných látek v ethanolovém extraktu byly použity hodnoty výšky píku místo plochy, a to z důvodu menší odchylky při stanovení průměrné hodnoty ze 3 měření. Pokud by byla použita k výpočtu jednotlivých koncentrací plocha píku, hodnoty by mohly být zkreslené. Vypočítané hodnoty koncentrace vybraných látek v ethanolovém extraktu bezu černého jsou shrnuty v následující Tabulce 16.

Tabulka 16. Vypočítané koncentrace vybraných látek v ethanolovém extraktu bezu černého.

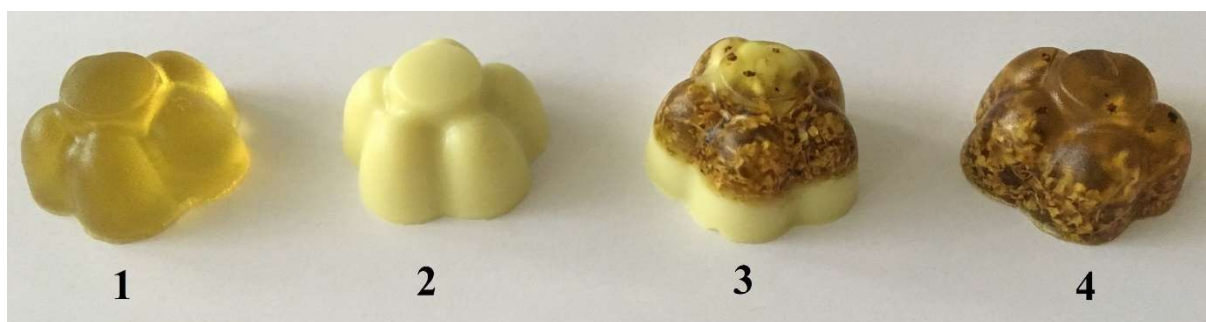
	Koncentrace [g·l <sup>-1</sup> ]
Kyselina chlorogenová	0,104
Kyselina kávová	0,086
Kyselina ferulová	0,060
Rutin	Nebyl kvantifikován

Pro potvrzení správné identifikace daného píku fenolových kyselina a rutinu byly provedeny další 4 experimenty. Připravený standard kyseliny chlorogenové o koncentraci  $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  byl smíchán s roztokem, který obsahoval 2 ml bezového extraktu, 2 ml mobilní fáze a 2 ml ethanolu, a to v poměru 1:1. Po proměření pomocí HPLC se zvýšila výška píku kyseliny chlorogenové, a tím se potvrdilo, že detekovaný pík opravdu patřil této kyselině. Další 3 experimenty probíhaly obdobně, akorát místo standardu kyseliny chlorogenové analyzovaný vzorek obsahoval standardy kyseliny kávové, ferulové nebo rutin.

#### 4.7 Zpracování bezového extraktu do kosmetického výrobku

Připravený ethanolový bezový extrakt byl zapracován do toaletního mýdla a do koupelové soli. Tento extrakt je vhodný pro použití do biokosmetiky. Výhodou je, že sám poskytuje žluté zbarvení, tudíž není potřeba přidávat barviva. Produkty mají charakteristickou bylinnou vůni. V podobě koupelové soli nebo toaletního mýdla by mohl bezový extrakt najít využití například v lázeňství.

V experimentální části je popsána výroba mýdel i soli. Nicméně poměr daných látek není striktně daný. Výrobce si může do jisté míry měnit poměry podle své potřeby. U mýdel je spousta možností výroby, co se týče tvaru a složení mýdla. Byly připraveny různé druhy mýdla smícháním mýdlové hmoty, extraktu a přidáním bezových květů (Obr.25 ,26 ,27).



Obr. 25. Různé druhy mýdla. 1 – čirá mýdlová hmota s bezovým extraktem, 2 – mýdlo s bambuckým máslem s bezovým extraktem, 3 – směs čírého mýdla a mýdla s bambuckým máslem s květy bezu, 4 – peelingové číré mýdlo s bezovými květy.

Mýdlo s bambuckým máslem je vhodnější pro výrobu mýdel s různým plastickým motivem (Obr.26). U čírého mýdla jde vidět, že plasticita motivu tolik nevynikne. Je ale zase vhodnější pro výrobu peelingového mýdla s bezovými květy, které mají i dekorativní funkci (Obr.27).



*Obr.26. Plastické mýdlo s bambuckým máslem a ethanolovým bezovým extraktem.*



*Obr.27. Plastické čiré mýdlo s ethanolovým bezovým extraktem a sušenými bezovými květy.*

Byla připravena koupelová sůl smícháním mořské soli, soli z mrtvého moře, ethanolového bezového extraktu a sušených bezových květů (*Obr.28*). V experimentální části je popsán postup přípravy, nicméně stejně jako u mýdla se poměr látek může do určité míry měnit. Tato sůl je vhodná do koupelí kvůli uklidňujícím a posilujícím účinkům bezu černého.



*Obr.28. Koupelová sůl z mořské soli, soli z mrtvého moře, ethanolového bezového extraktu a sušených bezových květů.*

## 5 ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na přípravu vybraných alkoholových extraktů bezu černého (*Sambucus nigra*, L.) a jejich využití v kosmetologii.

Teoretická část obsahovala charakteristiku bezu černého, který byl vybrán jako předmět práce díky svým bioaktivním vlastnostem. Bez černý si našel místo jak v lidovém léčitelství, tak v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Byly zde popsány účinné látky, jako jsou glykosidy, silice, polyfenoly, antimikrobiální peptidy, třísloviny, anthokyany a vitamíny. Na druhou stranu listy, kůra a nezralé plody obsahují toxické látky, jako jsou kyanogenní glykosidy a lektiny. Pro získání bioaktivních látek byla použita metoda extrakce různými alkoholovými rozpouštědly, jako jsou ethanol, propylenglykol nebo glycerol. Použitá rozpouštědla byla charakterizována. Byly zde popsány metody spektrofotometrie a HPLC, které byly využity k analýze připravených extraktů.

Cílem bylo získat bezový extrakt obsahující co největší množství polyfenolů s ohledem na ekonomickou náročnost výroby. Byla stanovena celková koncentrace polyfenolů spektrofotometricky Folin-Ciocalteuovou metodou. Hlavními faktory, které byly zkoumány v experimentální části při optimalizaci procesu extrakce, byly výběr rozpouštědla, navážka, teplota rozpouštědla a doba extrakce. Extrakt s největší koncentrací polyfenolů byl analyzován pomocí HPLC a byly stanoveny základní fyzikálně-chemické vlastnosti jako pH, index lomu a hustota.

Jako vhodný způsob přípravy bezového extraktu byla vyhodnocena metoda, kdy byl rostlinný materiál zalit 60% ethanolem v poměru rostlinného materiálu ku rozpouštědlu 1:8. Bylo zjištěno, že s ohledem na provozní náklady je optimální doba extrakce 24 hodin za laboratorní teploty. Byla stanovena hodnota pH jako  $5,743 \pm 0,006$ , index lomu jako  $1,365 \pm 0,02$  při teplotě  $22,7 \text{ }^\circ\text{C}$  a hustota jako  $0,9288 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Pomocí HPLC byly identifikovány a kvantifikovány vybrané fenolické kyseliny. Byla vypočítána koncentrace kyseliny chlorogenové jako  $0,104 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , kyseliny kávové jako  $0,086 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  a kyseliny ferulové jako  $0,060 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Dále byl v bezovém extraktu identifikován rutin.

Podle požadavků firmy Agrofrukt, která dodala rostlinný materiál, byl bezový extrakt zapracován do produktů, které najdou využití například v lázeňství. Těmito produkty jsou koupelová sůl a toaletní mýdlo. Proces výroby kosmetických produktů byl optimalizován z hlediska barvy, vůně a konzistence. Bezový extrakt by mohl být zapracován i do dalších kosmetických výrobků, jako jsou například tekuté mýdlo, šampon, pleťová voda, masti atd.

V další práci by bylo vhodné proces extrakce dále optimalizovat například z hlediska doby extrakce. Největší koncentrace polyfenolů byla stanovena po 24 hodinách luhování. Bylo by vhodné změnu koncentrace polyfenolů sledovat od 16 do 24 hodin například v půlhodinových časových intervalech. Další faktor, který by bylo dobré blíže prozkoumat je koncentrace ethanolu jako rozpouštědla. Byly zkoumány koncentrace ethanolu 20, 40 a 60 %. Bylo by vhodné prozkoumat i jiné koncentrace ethanolu, jejich vliv na koncentraci polyfenolů a zároveň posoudit ekonomickou náročnost. Bezový extrakt by mohl být také analyzován například pomocí hmotnostní spektrometrie pro identifikaci dalších obsahových látek a stanoven jejich vliv na pokožku.

## 6 REFERENCE

- [1] JANČA, Jiří a Josef ZENTRICH. *Herbář léčivých rostlin*. 1. vydání. Praha: Nakladatelství EMINENT, 1994. ISBN 80-85876-02-7.
- [2] HEMGESBERG, Hanspeter. *Černý bez a naše zdraví*. Přeložila Anděla KREMLOVÁ. Olomouc: Fontána, 2002. ISBN 80-86179-98-2.
- [3] ŠOLTÉSOVÁ, Jana. *Bez černý - Sambucus nigra* [online]. 2007 [cit. 13. 4. 2019]. Dostupné z: <https://www.priroda.cz/lexikon.php?detail=816>
- [4] SZAJDEK, Agnieszka a E. J. BOROWSKA. Bioactive compounds and health-promoting properties of Berry fruits: A review. *Plant Foods for Human Nutrition* [online]. 2008, **63**(4), 147–153. ISSN 09219668. Dostupné z: doi:10.1007/s11130-008-0097-5
- [5] DIACONEASA, Zorița. Time-Dependent Degradation of Polyphenols from Termally-Processed Berries a Their In Vitro Antiproliferative Effects against Melanoma. *Molecules* [online]. 2018, **23**(2534), 18. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23102534
- [6] ÁLVAREZ, Claudio Andrés, BARRIGA, Andrés, ALBERICIO, Fernando, ROMERO María Soledad and Fanny GUZMÁN. Identification of Peptides in Flowers of Sambucus nigra with Antimicrobial Activity against Aquaculture Pathogens. *Molecules* [online]. 2018, **23**(5). ISSN 14203049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23051033
- [7] MORAVCOVÁ, Jitka. *Biologicky aktivní přírodní látky*. Praha, 2006. Interní studijní pomůcka. Vysoká škola chemicko-technologická, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav chemie přírodních látek.
- [8] ARCEUSZ, Agnieszka a Marek WESOŁOWSKI. Essential metals and phenolic acids in commercial herbs and spices: Multivariate analysis of correlations among them. *Open Chemistry* [online]. 2015, **13**(1), 1196–1208. Dostupné z: doi:10.1515/chem-2015-0135
- [9] SCHMITZER, Valentina, VEBERIC, Robert a Franci STAMPAR. European elderberry (Sambucus Nigra L.) and American Elderberry (Sambucus Canadensis L.): Botanical, chemical and health properties of flowers, berries and their products. *Berries: Properties, Consumption and Nutrition* [online]. 2012, (February), 127–148. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/235635116\\_In\\_Berries\\_Properties\\_Consumption\\_and\\_Nutrition\\_Problems\\_and\\_Methods\\_to\\_Improve\\_the\\_Market-Life\\_of\\_Berry\\_Fruit](https://www.researchgate.net/publication/235635116_In_Berries_Properties_Consumption_and_Nutrition_Problems_and_Methods_to_Improve_the_Market-Life_of_Berry_Fruit)

- [10] GANESHPURKAR, Aditya a Ajay K. SALUJA. The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal* [online]. 2017, **25**(2), 149–164. ISSN 13190164. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsps.2016.04.025
- [11] DAWIDOWICZ, L. Andrzej, WIANOWSKA Dorota a Barbara BARANIAK. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2006, **39**(3), 308–315. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2005.01.005
- [12] BARROS, Lillian, DUEÑAS, Monserrat, DIAS, Maria Inês, SOUSA, Maria João, SANTOS-BUELGA, Celestino a Isabel C.F.R. FERREIRA. Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. *Food Chemistry* [online]. 2013, **136**(1), 1–8. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2012.07.107
- [13] SHAHIDI, Fereidoon a Marian NACZK. *Phenolics in food and nutraceuticals* [online]. CRC PRESS, 2004. ISBN 0-203-50873-4. Dostupné z: doi:1-58716-138-9
- [14] KAHKESHANI, Niloofar, FARZAEI, Fatemeh, FOTOUHI, Maryam, ALAVI, Seyedeh Shaghayegh, BAHRAMSOLTANI, Roodabeh, NASERI, Rozita, MOMTAZ, Saeideh, ABBASABADI, Zahra, RAHIMI, Roja, FARZAEI, Mohammad Hosein a Anupam BISHAYEE. Pharmacological effects of gallic acid in health and disease: A mechanistic review. *Mashhad University of Medical Sciences* [online]. 2019, **22**(3), 225–237. ISSN 2008-3866. Dostupné z: doi:10.22038/IJBMS.2019.32806.7897
- [15] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin II*. 3. vydání. Tábor: Nakladatelství OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [16] MARQUES, Viviane a Adriana FARAH. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chemistry* [online]. 2009, **113**(4), 1370–1376. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2008.08.086
- [17] DOLEŽÍLKOVÁ, Ivana, MACKOVÁ, Martina a Tomáš MACEK. Antimikrobiální peptidy: Vztah mezi jejich strukturou a antibakteriální aktivitou. *Chemické Listy*. 2011, **105**(5), 346–355. ISSN 00092770.
- [18] MOGHADDAM, M. Mehrdad, AGHAMOLLAEI, Hossein, KOOSHKI, Hamid, BARJINI, A. Kamal, MIRNEJAD, Reza a Ali CHOOPANI. The development of antimicrobial peptides as an approach to prevention of antibiotic resistance. *Reviews in*

- Medical Microbiology* [online]. 2015, **26**(3), 98–110. ISSN 14735601. Dostupné z: doi:10.1097/MRM.0000000000000032
- [19] CODY, B. Robert, TAMURA Jun a Kevin M. DOWNARD. Quantitation of anthocyanins in elderberry fruit extracts and nutraceutical formulations with paper spray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2018, **53**(1), 58–64. ISSN 10969888. Dostupné z: doi:10.1002/jms.4033
- [20] DIACONEASA, Zorița, LEOPOLD, Loredana, RUGINĂ, Dumitrița, AYVAZ, Huseyin a Carmen SOCACIU. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin rich extracts from blueberry and blackcurrant juice. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2015, **16**(2), 2352–2365. ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms16022352
- [21] SOARES, Marcela Martins, SILVA, Mariane Alves, GARCIA, Pauliana Pimentel Coelho, SILVA, Luciana Saraiva da, COSTA, Glauce Dias da, ARAÚJO, Raquel Maria Amaral a Rosângela Minardi Mitre COTTA. Effect of vitamin A supplementation: a systematic review. *Ciência & Saúde Coletiva* [online]. 2019, **24**(3), 827–838. ISSN 1413-8123. Dostupné z: doi:10.1590/1413-81232018243.07112017
- [22] JAN VELÍŠEK, Jana Hajšlová. *Chemie potravin I*. 3.vydání. Havlíčkův Brod: Nakladatelství OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15.2.
- [23] MIELGO-AYUSO, Juan, APARICIO-UGARRIZA, Raquel, OLZA, Josune, ARANCETA-BARTRINA, Javier, GIL, Ángel, ORTEGA, M. Rosa, SERRA-MAJEM, Lluís, VARELA-MOREIRAS, Gregorio a Marcela GONZÁLEZ-GROSS. Dietary intake and food sources of niacin, riboflavin, thiamin and vitamin B6 in a representative sample of the spanish population. The anthropometry, intake, and energy balance in Spain (ANIBES) study. *Nutrients* [online]. 2018, **10**(7). ISSN 20726643. Dostupné z: doi:10.3390/nu10070846
- [24] BSOUL, A. Samer a Geza T. TEREZHALMY. Vitamin C in health and disease. *Journal of Contemporary Dental Practice* [online]. 2004, **5**(2), 1–13. Dostupné z: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-4944250308&partnerID=40&md5=b4aa34c7f5e5f4925049f0ca3b7c87be>
- [25] MATĚJČEK, Aleš a kol. *Metodika pěstování kulturních odrůd bezu černého*. Hradec Králové: ASTRAPRINT, 2013. ISBN 978-80-87030-27-1.

- [26] DELLAGRECA, Marina, FIORENTINO, Antonio, MONACO, Pietro, PREVITERA Lucio a Ana M. SIMONET. Cyanogenic glycosides from *Sambucus nigra*. *Natural Product Letters* [online]. 2000, **14**(3), 175–182. ISSN 10575634. Dostupné z: doi:10.1080/10575630008041228
- [27] SENICA, Mateja, STAMPAR, Franci, VEBERIC Robert a Maja MIKULIC-PETKOVSEK. The higher the better? Differences in phenolics and cyanogenic glycosides in *Sambucus nigra* leaves, flowers and berries from different altitudes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2017, **97**(8), 2623–2632. ISSN 10970010. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.8085
- [28] MŁYNARCZYK, Karolina, WALKOWIAK-TOMCZAK Dorota a Grzegorz P. ŁYSIAK. Bioactive properties of *Sambucus nigra* L. As a functional ingredient for food and pharmaceutical industry. *Journal of Functional Foods* [online]. 2018, **40**(November 2017), 377–390. ISSN 17564646. Dostupné z: doi:10.1016/j.jff.2017.11.025
- [29] TEJERO, Jesús, JIMÉNEZ, Pilar, QUINTO, J. Emiliano, CORDOBA-DIAZ, Damián, GARROSA, Manuel, CORDOBA-DIAZ, Manuel, GAYOSO, J. Manuel a Tomás GIRBÉS. Elderberries: A source of ribosome-inactivating proteins with lectin activity. *Molecules* [online]. 2015, **20**(2), 2364–2387. ISSN 14203049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules20022364
- [30] DAMME, J. M. Els, BARRE, Annick, ROUGE, Pierre, LEUVEN Fred a Willy J. PEUMANS. The NeuAc( $\alpha$ -2,6)-Gal/GalNAc-Binding Lectin from Elderberry (*Sambucus Nigra*) Bark, a type-2 Ribosome-Inactivating Protein with an Unusual Specificity and Structure. *European Journal of Biochemistry* [online]. 2004, **235**(1–2), 128–137. ISSN 0014-2956. Dostupné z: doi:10.1111/j.1432-1033.1996.00128.x
- [31] ŠNITA, Dalimil. *Chemické inženýrství I*. 1. vydání. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2005. ISBN 80-7080-589-7.
- [32] SKLENÁK, Ladislav. *Preparativní a separační metody*. Ostrava: Ostravská Univerzita, 2005.
- [33] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-02.
- [34] HANIKA, Jiří. *Speciální separační procesy*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 80-7080-242-1.

- [35] DABBS, M. Daniel, MULDER, Norbert a Ilhan A. AKSAY. Solvothermal removal of the organic template from L 3 („sponge“) templated silica monoliths. *Journal of Nanoparticle Research* [online]. 2006, **8**(5), 603–614. ISSN 13880764. Dostupné z: doi:10.1007/s11051-005-9063-4
- [36] ŠALPLACHTA, Jiří a Barbora HOHNOVÁ. Pressurized hot water extraction of proteins from *Sambucus nigra* L. branches. *Industrial Crops and Products* [online]. 2017, **108**(July), 312–315. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2017.06.053
- [37] OANCEA, Ana-Maria, ONOFREI, Cristina, TURTURICĂ, Mihaela, BAHRIM, Gabriela, RÂPEANU Gabriela a Nicoleta STĂNCIUC. The kinetics of thermal degradation of polyphenolic compounds from elderberry (*Sambucus nigra* L.) extract. *Food Science and Technology International* [online]. 2018, **24**(4), 361–369. ISSN 15321738. Dostupné z: doi:10.1177/1082013218756139
- [38] HO, Giang Thanh Thi, KASE, Eili Tranheim, WANGENSTEEN Helle a Hilde BARSETT. Phenolic Elderberry Extracts, Anthocyanins, Procyanidins, and Metabolites Influence Glucose and Fatty Acid Uptake in Human Skeletal Muscle Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2017, **65**(13), 2677–2685. ISSN 15205118. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.6b05582
- [39] OPRIS, Razvan, TATOMIR, Corina, OLTEANU, Diana, MOLDOVAN, Remus, MOLDOVAN, Bianca, DAVID, Luminita, NAGY, Andras, DECEA, Nicoleta, KISS Mihai Ludovic a Gabriela Adriana FILIP. The effect of *Sambucus nigra* L. extract and phytosynthesized gold nanoparticles on diabetic rats. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2017, **150**, 192–200. ISSN 18734367. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2016.11.033
- [40] PLISZKA, Barbara. Polyphenolic content, antiradical activity, stability and microbiological quality of elderberry (*Sambucus Nigra* L.) extracts. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria* [online]. 2017, **16**(4), 393–401. ISSN 18989594. Dostupné z: doi:10.17306/J.AFS.0523
- [41] CIOCH, Monika, SATORA, Paweł, SKOTNICZNY, Magdalena, SEMIK-SZCZURAK Dorota a Tomasz TARKO. Characterisation of antimicrobial properties of extracts of selected medicinal plants. *Polish Journal of Microbiology* [online]. 2017, **66**(4), 463–472. ISSN 17331331. Dostupné z: doi:10.5604/01.3001.0010.7002

- [42] LACHENMEIER, W. Dirk. Safety evaluation of topical applications of ethanol on the skin and inside the oral cavity. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* [online]. 2008, **3**(1), 1–16. ISSN 17456673. Dostupné z: doi:10.1186/1745-6673-3-26
- [43] ANDERSEN, F. Alan. Final report of the safety assessment of Alcohol Denat., including SD Alcohol 3-A, SD Alcohol 30, SD Alcohol 39, SD Alcohol 39-B, SD Alcohol 39-C, SD Alcohol 40, SD Alcohol 40-B, and SD Alcohol 40-C, and the denaturants, Quassin, Brucine Sulfate/Brucine. *International Journal of Toxicology* [online]. 2008, **27**(SUPPL. 1), 1–43. ISSN 10915818. Dostupné z: doi:10.1080/10915810701876265
- [44] WANG, Zhengxiang, ZHUGE, Jian, FANG Huiying a Bernard A. PRIOR. Glycerol production by microbial fermentation: A review. *Biotechnology Advances* [online]. 2001, **19**(3), 201–223. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/S0734-9750(01)00060-X
- [45] SCHUELLER, Randy a Perry ROMANOWSKI. *Conditioning Agents for Hair and Skin*. Marcel Dekker, Inc. 1999. ISBN 0-8247-1921-2
- [46] IONUȚ, Simion Andrei, GRIGORAȘ, Cristina Gabriela a Lucian GAVRILĂ. Modeling Thermodynamic Properties of Glycerol Involved in Cosmetic and Pharmaceutical Industries [online]. 2016, 7–10. Dostupné z: doi:10.1109/EHB.2015.7391366
- [47] QUISPE, A. G. César, CORONADO, J. R. Christian a João A. CARVALHO. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 2013, **27**, 475–493. ISSN 13640321. Dostupné z: doi:10.1016/j.rser.2013.06.017
- [48] JAGER, Martin. Method for Inhibition of Sobrate-induced Brown Discolorations in Cosmetic Compositions and Foodstuffs. United States Patent. US006592880B1. Datum vydání: 15. 7. 2003.
- [49] THE SOAP AND DETERGENT ASSOCIATION (SDA). *Glycerine: an overview* [online]. 1990. Dostupné z: doi:10.1111/aji.12850
- [50] CARO, A. De Cosimo. UV / VIS Spectrophotometry: Fundamentals and Applications. *ResearchGate* [online]. 2017, (November), 53. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/321017142>
- [51] ČERNÁ, Lucie. *Metody stanovení hyaluronanu*. 2014. VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ.

- [52] SINGLETON, V. L. a Joseph A. ROSSI. Colorometry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* [online]. 1965. ISSN 00029254. Dostupné z: doi:10.12691/ijebb-2-1-5
- [53] OZGEN, Mustafa, SCHEERENS, C. Joseph, REESE, R. Neil a Raymond A. MILLER. Total phenolic, anthocyanin contents and antioxidant capacity of selected elderberry (*Sambucus canadensis* L.) accessions. *Pharmacognosy Magazine* [online]. 2010, **6**(23), 198. ISSN 0973-1296. Dostupné z: doi:10.4103/0973-1296.66936
- [54] GUERRERO, C. Jaime, CIAMPI, P. Luigi, CASTILLA, C. Andrea, MEDEL, S. Fernando, SCHALCHLI, S. Heidi, HORMAZABAL, U. Emilio, BENSCH, T. Emma a Miren L. ALBERDI. Capacidad Antioxidante, Antocianinas y Fenoles Totales de Berries Silvestres y Cultivados en Chile. *Chilean journal of agricultural research* [online]. 2010, **70**(4), 537–544. ISSN 07185820. Dostupné z: <http://www.chileanjar.cl/current.php?V=70&I=4>
- [55] LIANDA, L. P. Regina, ECHEVARRIA, Aurea a Rosane N. CASTRO. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Brazilian Honeys and their extracts. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2012, **23**(4), 618-627.
- [56] STALIKAS, D. Constantine. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* [online]. 2007, **30**(18), 3268–3295. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200700261
- [57] MEYER, R. Veronika. *Practical high-performance liquid chromatography: Fourth edition* [online]. 2006. ISBN 9780470032671. Dostupné z: doi:10.1002/0470032677
- [58] BANSAL, V. R. Malviya, PAL, O. P. a P. K. SHARMA. High Performance Liquid Chromatography: A Short Review. *Journal of Global Pharma Technology* [online]. 2010, **2**(5), 22–26. Dostupné z: <http://www.jgpt.co.in/jgpt/index.php/jgptjournal/article/view/208>
- [59] SALVATO, Fernanda, GALLO DE CARVALHO, Mayra Costa da Cruz a Aline de LIMA LEITE. Strategies for Protein Separation. *Integrative Proteomics* [online]. 2012, (July 2015). Dostupné z: doi:10.5772/29363
- [60] ONDRUŠOVÁ, Pavlína. *Možnosti využití vylisků z bezinek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 59 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

- [61] PLISZKA, Barbara. Polyphenolic content, antiradical activity, stability and microbiological quality of elderberry (*Sambucus Nigra* L.) extracts. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria* [online]. 2017, **16**(4), 393–401. ISSN 18989594. Dostupné z: doi:10.17306/J.AFS.0523
- [62] KRŮZOVÁ, Sabina. *Extrakce antioxidantů z bezových květů a úchova extraktu pro další možné využití*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 71 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
- [63] SILVA, Pedro, FERREIRA, Sandrine a Fernando M. NUNES. Elderberry (*Sambucus nigra* L.) by-products a source of anthocyanins and antioxidant polyphenols. *Industrial Crops and Products* [online]. 2017, **95**, 227–234. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2016.10.018
- [64] MUDGE, Elizabeth, APPLEQUIST, L. Wendy, FINLEY, Jamie, LISTER, Patience, TOWNESMITH, K. Andrew, WALKER, M. Karen a Paula N. BROWN. Variation of select flavonols and chlorogenic acid content of elderberry collected throughout the Eastern United States. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2016, **47**, 52–59. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2015.12.003
- [65] DAWIDOWICZ, L. Andrzej, WIANOWSKA, Dorota, GAWDZIK, Jan a Danuta H. SMOLARZ. Optimization of ASE conditions for the HPLC determination of rutin and isoquercitrin in *Sambucus nigra* L. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* [online]. 2003, **26**(14), 2381–2397. ISSN 10826076. Dostupné z: doi:10.1081/JLC-120023253
- [66] WATANABE, Toshiro, YAMAMOTO, Akira, NAGAI, Shiro a Shigeru TERABE. Analysis of Elderberry Pigments in Commercial Food Samples by Micellar Electrokinetic Chromatography. *The Japan Society for Analytical Chemistry* [online]. 1998, 839-844(1). ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(98)00684-0
- [67] VEIT, Miriam. *Léčivá kosmetika z přírody*. 1.vydání. Praha: Grada Publishing, 2014. ISBN 978-80-247-4586-2.

## **7 PŘÍLOHY**

### **7.1 Příloha 1: Bezpečnostní list**

## BEZPEČNOSTNÍ LIST

Podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č.1907/2006, ve znění nařízení 830/2015/EU

### ETHANOLOVÝ EXTRAKT BEZOVÝCH KVĚTŮ

Datum vydání: 10.5.2019

Datum revize: -

Verze A

## 1. IDENTIFIKACE LÁTKY NEBO PŘÍPRAVKU A SPOLEČNOSTI NEBO PODNIKU

### 1.1. Identifikace látky nebo přípravku

Název látky nebo přípravku: ETHANOLOVÝ EXTRAKT BEZOVÝCH KVĚTŮ

Další názvy látky nebo přípravku: INCI název: Sambucus Nigra Flower Ethanol Extract

### 1.2. Použití látky nebo přípravku

Extrakt pro kosmetické účely.

### 1.3. Identifikace společnosti nebo podniku

#### Následný uživatel

Jméno nebo obchodní jméno: FCH VUT

Místo podnikání nebo sídlo: Purkyňova 464/18, Brno 612 00

Identifikační číslo: 00216305

Telefon: +420 541 149 301

Email: info@fch.vut.cz

### 1.4. Telefonní číslo pro mimořádné situace

Toxikologické informační středisko, Na Bojišti 1, 128 28 Praha 2

Telefon (24 hod/den): +420 224 919 293, +420 224 915 402

---

## 2. IDENTIFIKACE RIZIK

### 2.1. Klasifikace látky nebo přípravku

Klasifikace v souladu s nařízením (ES) č. 1272/2008

Výstražné symboly nebezpečnosti: GHS02, GHS07.

H225 Vysoce hořlavá kapalina a páry.

H319 Způsobuje vážné podráždění očí.

### 2.2. Nebezpečné účinky na zdraví a životní prostředí

Způsobuje podráždění očí.

### 2.3. Další možná rizika

Informace nejsou k dispozici.

### 2.4. Informace uvedené na obalu

Viz bod 15.

---

## BEZPEČNOSTNÍ LIST

Podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č.1907/2006, ve znění nařízení 830/2015/EU

### ETHANOLOVÝ EXTRAKT BEZOVÝCH KVĚTŮ

Datum vydání: 10.5.2019

Datum revize: -

Verze A

## 3. SLOŽENÍ NEBO IDENTIFIKACE O SLOŽKÁCH

### 3.1. Chemická charakteristika

Ethanolový extrakt bezových květů

Číslo CAS: 84603-58-7

Číslo EINECS: 283-259-4

### 3.2. Přípravek obsahuje tyto nebezpečné látky a látky se stanovenými nejvyššími přípustnými koncentracemi v pracovním ovzduší

60 % Ethyl Alkohol

CAS: 64-17-5

EINECS: 200-578-6

---

## 4. POKYNY K PRVNÍ POMOCI

### 4.1. Všeobecné pokyny

Neprodleně odstranit části oděvů znečištěné produktem.

### 4.2. Při nadýchání

Prívod čerstvého vzduchu, při obtížích vyhledat lékaře.

### 4.3. Při styku s kůží

Ihned omýt vodou.

### 4.4. Při zasažení očí

Oči s otevřenými víčky vyplachovat po více minut proudem tekoucí vody. Při přetrvávajících potížích se poradit s lékařem.

### 4.5. Při požití

Vypláchnout ústa a bohatě zapíjet vodou.

---

## 5. OPATŘENÍ PRO HASEBNÍ ZÁSAH

### 5.1. Vhodná hasiva

CO<sub>2</sub>, hasící prášek nebo rozstříkované vodní paprsky. Větší ohně zdolat rozstříkovanými vodními paprsky nebo pěnou odolnou vůči alkoholu.

### 5.2. Zvláštní nebezpečí

Zabraňte inhalaci dýmu.

### 5.3. Speciální ochranné prostředky pro hasiče

Nejsou nutná žádná zvláštní opatření.

## BEZPEČNOSTNÍ LIST

Podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č.1907/2006, ve znění nařízení 830/2015/EU

### ETHANOLOVÝ EXTRAKT BEZOVÝCH KVĚTŮ

Datum vydání: 10.5.2019

Datum revize: -

Verze A

## 6. OPATŘENÍ V PŘÍPADĚ NÁHODNÉHO ÚNIKU

### 6.1. Preventivní opatření pro ochranu osob

Používat ochranné prostředky. Obvyklá opatření při zacházení s chemikáliemi.

### 6.2. Preventivní opatření pro ochranu životního prostředí

Zředit velkým množstvím vody. Zabránit úniku do podzemních, povrchových a odpadních vod, půd a kanalizací.

### 6.3. Doporučené metody čištění a znehodnocení

Kontaminovaný materiál odstranit jako odpad podle bodu 13.

Zajistit dostatečné větrání.

Navázat na absorpční prostředek a přenést do vhodného náhradního obalu.

---

## 7. ZACHÁZENÍ A SKLADOVÁNÍ

### 7.1. Zacházení

#### 7.1.1. Preventivní opatření pro bezpečné zacházení s látkou nebo přípravkem

Používejte osobní ochranné prostředky (viz bod 8). Dodržujte pravidla pro práci s chemikáliemi. Při práci nejíst, nepít, nekouřit. Po práci a před jídlem umyjte ruce mýdlem a vodou a ošetřete reparačním krémem.

#### 7.1.2. Preventivní opatření na ochranu životního prostředí

Nepřibližovat se se zápalnými zdroji. Zajistit proti elektrostatickému náboji.

#### 7.1.3. Specifické požadavky nebo pravidla

Informace nejsou k dispozici.

### 7.2. Skladování

#### 7.2.1. Podmínky pro bezpečné skladování

Skladovat na v dobře uzavřených nádobách v chladu a suchu.

#### 7.2.2. Množstevní limity pro dané skladovací podmínky

Informace nejsou k dispozici.

#### 7.2.3. Specifická použití

Informace nejsou k dispozici.

---

## BEZPEČNOSTNÍ LIST

Podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č.1907/2006, ve znění nařízení 830/2015/EU

### ETHANOLOVÝ EXTRAKT BEZOVÝCH KVĚTŮ

Datum vydání: 10.5.2019

Datum revize: -

Verze A

## 8. OMEZOVÁNÍ EXPOZICE / OSOBNÍ OCHRANNÉ PROSTŘEDKY

### 8.1. Expoziční limity

Informace nejsou k dispozici.

### 8.2. Omezování expozice

#### 8.2.1. Omezování expozice pracovníků

Uchovávejte odděleně od potravin, nápojů a krmiv. Oděv kontaminovaný přípravkem ihned svlékněte. Dodržujte pravidla pro práci s chemikáliemi.

##### 8.2.1.1. *Ochrana dýchacích cest*

Maska s čerstvým vzduchem.

##### 8.2.1.2. *Ochrana rukou*

Zamezit styku s pokožkou používáním rukavic.

##### 8.2.1.3. *Ochrana očí*

Zamezit styku s očima používáním uzavřených ochranných brýlí.

##### 8.2.1.4. *Ochrana kůže*

Zamezit styku s pokožkou.

#### 8.2.2. Omezování expozice životního prostředí

Informace nejsou k dispozici.

---

## 9. CHEMICKÉ A FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI

### 9.1. Obecné informace

Skupenství	kapalné
Barva	žlutohnědá
Aroma	Charakteristické, bylinné

<b>BEZPEČNOSTNÍ LIST</b>		
Podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č.1907/2006, ve znění nařízení 830/2015/EU		
<b>ETHANOLOVÝ EXTRAKT BEZOVÝCH KVĚTŮ</b>		
Datum vydání: 10.5.2019	Datum revize: -	Verze A

## 9.2. Důležité informace z hlediska ochrany zdraví, bezpečnosti a životního prostředí

Veličina	Hodnota	Jednotka
Hodnota pH	5,743±0,006	-
Bod varu (rozmezí bodu varu) (1013 hPa)	78	°C
Bod tání (rozmezí bodu tání)	Informace nejsou k dispozici	°C
Bod vzplanutí	13	°C
Teplota vznícení	363	°C
Třída plynu	Informace nejsou k dispozici	°C
Hořlavost	Hořlavý	-
Samozápalnost	Není samozápalný	-
Výbušné vlastnosti	Produktu nehrozí nebezpečí exploze, ale je možné nebezpečí v směsi par se vzduchem	-
Meze výbušnosti – horní mez	2,5	Obj. %
Meze výbušnosti – dolní mez	13,5	Obj. %
Oxidační vlastnosti	Informace nejsou k dispozici	-
Rozpustnost – ve vodě (20°C)	Informace nejsou k dispozici	g·dm <sup>-3</sup>
Rozpustnost – v tucích (včetně specifikace oleje)	Informace nejsou k dispozici	-
Rozdělovací koeficient n-oktanol/voda	Informace nejsou k dispozici	-
Mísitelnost	Neomezeně mísitelný	-
Hustota (20 °C)	0,9288	g·cm <sup>-3</sup>
Viskozita (20 °C)	Informace nejsou k dispozici	mPa·s
Vodivost	Informace nejsou k dispozici	S·cm <sup>-1</sup>
Tenze par (50 °C)	57,3	hPa
Hustota par	Informace nejsou k dispozici	-
Rychlost odpařování	Informace nejsou k dispozici	dm <sup>3</sup> ·h <sup>-1</sup>
Index lomu (22,7 °C)	1,365±0,02	-

## 9.3. Další informace

Neuvedeno.

## BEZPEČNOSTNÍ LIST

Podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č.1907/2006, ve znění nařízení 830/2015/EU

### ETHANOLOVÝ EXTRAKT BEZOVÝCH KVĚTŮ

Datum vydání: 10.5.2019

Datum revize: -

Verze A

## 10. STÁLOST A REAKTIVITA

### 10.1. Podmínky, kterým je třeba zamezit

Stabilní při normálních podmínkách.

### 10.2. Materiály, které nelze použít

Nejsou známy žádné nebezpečné reakce.

### 10.3. Nebezpečné produkty rozkladu

Informace nejsou k dispozici.

---

## 11. TOXIKOLOGICKÉ INFORMACE

### 11.1. Nepříznivé účinky na zdraví způsobené expozicí látky nebo přípravku

Způsobuje vážné podráždění očí.

### 11.2. Nebezpečné účinky pro zdraví

- **Akutní toxicita**

- LD<sub>50</sub> orálně, potkan (mg·kg<sup>-1</sup>):

informace nejsou k dispozici

- LD<sub>50</sub> dermálně, potkan nebo králík (mg·kg<sup>-1</sup>):

informace nejsou k dispozici

- LC<sub>50</sub> inhalačně, potkan, pro aerosoly nebo částice (mg·dm<sup>-3</sup>)

informace nejsou k dispozici

- LC<sub>50</sub> inhalačně, potkan, pro plyny a páry (mg·dm<sup>-3</sup>)

informace nejsou k dispozici

- **Subchronická – chronická toxicita**

Informace nejsou k dispozici.

- **Senzibilizace**

Informace nejsou k dispozici.

- **Narkotické účinky**

Informace nejsou k dispozici.

- **Karcinogenita**

Informace nejsou k dispozici.

- **Mutagenita**

Informace nejsou k dispozici.

- **Toxicita pro reprodukci**

Informace nejsou k dispozici.

- **Provedení zkoušek na zvířatech**

Informace nejsou k dispozici.

---

## BEZPEČNOSTNÍ LIST

Podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č.1907/2006, ve znění nařízení 830/2015/EU

### ETHANOLOVÝ EXTRAKT BEZOVÝCH KVĚTŮ

Datum vydání: 10.5.2019

Datum revize: -

Verze A

## 12. EKOTOXIKOLOGICKÉ INFORMACE

### 12.1. Ekotoxicita – akutní toxicita pro vodní organismy a ostatní prostředí

- LD<sub>50</sub>, 96 hod., ryby (mg·dm<sup>-3</sup>): informace nejsou k dispozici
- EC<sub>50</sub>, 48 hod., dafnie (mg·dm<sup>-3</sup>): informace nejsou k dispozici
- EC<sub>50</sub>, 48 hod., (mg·dm<sup>-3</sup>): informace nejsou k dispozici
- EC<sub>50</sub>, 72 hod., řasy (mg·dm<sup>-3</sup>): informace nejsou k dispozici

### 12.2. Mobilita

Informace nejsou k dispozici.

### 12.3. Persistence a rozložitelnost

Informace nejsou k dispozici.

### 12.4. Bioakumulační potenciál

Informace nejsou k dispozici.

### 12.5. Výsledky posouzení PBT

Informace nejsou k dispozici.

### 12.6. Další nepříznivé účinky

Třída ohrožení vody 3: Nesmí proniknout do spodní vody, povodí nebo do kanalizace, ani v malých množstvích. Ohrožuje pitnou vodu už při proniknutí nepatrného množství do zeminy.

---

## 13. POKYNY K LIKVIDACI

### 13.1. Informace o bezpečném zacházení při odstraňování látky nebo přípravku

Nesmí se odstraňovat společně s odpady z domácnosti. Nepřipustit únik do kanalizace.

### 13.2. Metody odstraňování látky nebo přípravku a znečištěných obalů

Označený odpad předat k odstranění včetně identifikačního listu odpadu specializované firmě s oprávněním k této činnosti.

### 13.3. Právní předpisy o odpadech

Zákon č. 185/2001 Sb. o odpadech v platném znění. Jestliže se tento přípravek a jeho obal stanou odpadem, musí konečný uživatel přidělit odpovídající kód odpadu podle vyhlášky č. 93/2016 Sb. v platném znění. Zákon č. 477/2001 Sb. o obalech v platném znění.

---

## 14. INFORMACE PRO PŘEPRAVU LÁTKY NEBO PŘÍPRAVKU

### 14.1. Speciální preventivní opatření

Podléhá předpisům pro přepravu nebezpečných látek třídy 3 - Hořlavé kapaliny.

## BEZPEČNOSTNÍ LIST

Podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č.1907/2006, ve znění nařízení 830/2015/EU

### ETHANOLOVÝ EXTRAKT BEZOVÝCH KVĚTŮ

Datum vydání: 10.5.2019

Datum revize: -

Verze A

#### 14.2. Klasifikace přepravy

Podléhá předpisům pro přepravu nebezpečných látek třídy 3 - Hořlavé kapaliny.

---

## 15. INFORMACE O PŘEDPÍSECH

### 15.1. Informace uvedené na obalu

Na označení látky / přípravku se nevztahují ustanovení ze zákona č. 350/2011 Sb.

### 15.2. Specifická ustanovení týkající se ochrany osob nebo životního prostředí na úrovni Evropských společenství

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006, ve znění nařízení 830/2015/EU. Evropská dohoda o mezinárodním silniční přepravě nebezpečných věcí (ADR) 17/2011 Sb.m.s.

### 15.3. Právní předpisy obsahující specifická ustanovení týkající se ochrany osob nebo životního prostředí

- Zákon č. 350/2011 Sb. o chemických látkách v platném znění.
- Zákon č. 297/2008 Sb. o podmínkách uvádění biocidních přípravků na trh.
- Vyhláška č. 409/2005 Sb. o hygienických požadavcích na výrobky přicházející do přímého styku s vodou a na úpravu vody.
- Zákon č.185/2001 Sb. o odpadech.
- Vyhláška č. 93/2016 Sb. katalog odpadů.
- Vyhláška č. 383/2001 Sb. o podrobnostech nakládání s odpady.
- Zákon č. 477/2001 Sb. o obalech v platném znění.
- Zákon č. 258/2000 Sb. o ochraně veřejného zdraví.

---

## 16. DALŠÍ INFORMACE

### 16.1. Seznam H-vět použitých v bodu 2 a 3

H225 Vysoce hořlavá kapalina a páry.

H319 Způsobuje vážné podráždění očí.

### 16.2. Pokyny pro školení

- Viz § 101 a další Zákoníku práce.
- Seznámit pracovníky s doporučeným způsobem použití, povinnými ochrannými prostředky, první pomoci a zakázanými manipulacemi s látkou / přípravkem.

<b>BEZPEČNOSTNÍ LIST</b>		
Podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č.1907/2006, ve znění nařízení 830/2015/EU		
<b>ETHANOLOVÝ EXTRAKT BEZOVÝCH KVĚTŮ</b>		
Datum vydání: 10.5.2019	Datum revize: -	Verze A

### **16.3. Doporučená omezení použití**

Látka / přípravek by neměly být použity pro žádný jiný účel než pro ten, pro který jsou určeny (viz bod 1.2.). Protože specifické podmínky použití látky / přípravku se nacházejí mimo kontrolu dodavatele, je odpovědností uživatele, aby přizpůsobil předepsaná upozornění místním zákonům a nařízením. Bezpečnostní informace popisují výrobek z hlediska bezpečnostního a nemohou být považovány za technické informace o výrobku.

### **16.4. Zdroje údajů použitých pro sestavování bezpečnostního listu**

Bezpečnostní list 60% ethanolu, Fagron, Česká republika.

### **16.5. Změny při revizi bezpečnostního listu**

Verze A – 10.5.2019

- Toto vydání bezpečnostního listu ruší všechny předchozí verze bezpečnostního listu.