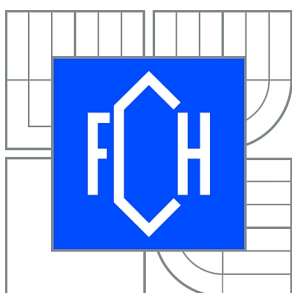


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ ERGOSTEROLU V PIVOVARSKÝCH SUROVINÁCH

DETERMINATION OF ERGOSTEROL CONTENT IN BREWING MATERIALS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

MARTIN MATYÁŠ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. KAROLÍNA BENEŠOVÁ, Ph.D.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0445/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Martin Matyáš	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí práce	Ing. Karolína Benešová, Ph.D.	
Konzultanti:	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	

Název bakalářské práce:

Stanovení ergosterolu v pivovarských surovinách

Zadání bakalářské práce:

- Zpracování literární rešerše zaměřené na:
 - Ergosterol v ječmeni a sladu
 - Možnosti stanovení obsahu ergosterolu v ječmeni a sladu
- Optimalizace extrakce ergosterolu z ječmene a sladu
- Stanovení ergosterolu v ječmeni a sladu pomocí HPLC

Termín odevzdání bakalářské práce: 28.5.2010

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Martin Matyáš
Student(ka)

Ing. Karolína Benešová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Předložená bakalářská práce je zaměřena na stanovení obsahu ergosterolu v ječmeni a ve sladu. V teoretické části je zpracován výskyt ergosterolu v ječmeni a sladu, cíle jeho stanovení, podrobný přehled dříve použitých způsobů extrakce ze vzorků ječmene a sladu i jiných biologických materiálů a metody stanovení. Praktická část je věnovaná optimalizaci extrakce a stanovení ergosterolu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s použitím detekce diodovým polem (HPLC – DAD).

ABSTRACT

Presented bachelor's thesis is focused on determination of ergosterol content in barley and malt. In theoretical part the presence of ergosterol in barley and malt has been elaborated, the purposes of its determination, detailed overview of previously applied methods of extraction from samples of barley and malt as well as other biological materials and methods of quantification. Practical part is focused on optimizing of extraction and determination of ergosterol by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC – DAD).

KLÍČOVÁ SLOVA

ergosterol, extrakce, HPLC, ječmen, slad

KEY WORDS

ergosterol, extraction, HPLC, barley, malt

MATYÁŠ, M. *Stanovení ergosterolu v pivovarských surovinách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 44 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Karolína Benešová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za zprostředkování této práce a zejména Ing. Karolíně Benešové, Ph.D. za pomoc při vzniku této práce, cenné rady a trpělivost.

OBSAH

1	Úvod	7
2	Teoretická část	8
2.1.	Vlastnosti ergosterolu	8
2.1.1.	Výskyt ergosterolu	8
2.2.	Výskyt ergosterolu v ječmeni a sladu	9
2.3.	Obsah ergosterolu a gushing	10
2.4.	Extrakce	11
2.4.1.	Klasická metoda podle Seitze a kol.	11
2.4.2.	Modifikace klasické metody podle Vargové a kol.	12
2.4.3.	Další modifikace klasické extrakce podle Jambunathana a kol.	13
2.4.4.	Extrakce na tuhé fázi	14
2.4.5.	Mikrovlákná extrakce	14
2.4.6.	Superkritická fluidní extrakce	15
2.5.	Metody stanovení ergosterolu	16
2.5.1.	Stanovení pomocí plynové chromatografie (GC)	16
2.5.2.	TLC	17
2.5.3.	HPLC	19
2.6.	Kvantifikace a stanovení výtěžnosti extrakce	21
2.6.1.	Metoda kalibrační křivky	21
2.6.2.	Metoda standardního přídávku	21
3	Experimentální část	23
3.1.	Použité přístroje	23
3.2.	Software	23
3.3.	Chemikálie	23
3.4.	Standard	23
3.5.	Použité vzorky	23
3.5.1.	Odrůda Bojos	24
3.5.2.	Odrůda Jersey	24
3.5.3.	Odrůda Radegast	24
3.5.4.	Odrůda Sebastian	24
3.5.5.	Odrůda Tolar	25
3.6.	Postupy extrakce	25
3.6.1.	Příprava vzorku	25
3.6.2.	Postup extrakce	25
3.7.	Identifikace a kvantifikace analytu	26
3.7.1.	Příprava vzorku pro stanovení na HPLC	26
3.7.2.	Příprava roztoků pro kalibraci	26
3.7.3.	Metoda standardního přídávku	26

3.7.4.	Chromatografické podmínky.....	26
4	Výsledky a diskuse	27
4.1.	Nehomogenita vzorku	27
4.2.	Optimalizace extrakce	27
4.2.1.	Použití třepačky.....	28
4.2.2.	Snížení počtu extrakcí do hexanu.....	28
4.2.3.	Změna postupu extrakce – vytřepání do hexanu bez zahřívání	28
4.2.4.	Extrakce do diethyletheru.....	30
4.3.	Stanovení ergosterolu ve sladu.....	31
4.4.	Stanovení ergosterolu na HPLC	31
4.4.1.	Kalibrace	31
4.4.2.	Výpočet koncentrace ergosterolu ve vzorku	33
4.4.3.	Optimalizace metody.....	33
4.4.4.	Použití kolony s pevným jádrem.....	35
5	Závěr.....	39
6	Použitá literatura.....	40
7	Seznam použitých zkratk.....	44

1 ÚVOD

Ergosterol představuje specifický membránový lipid vyšších a nižších hub a jako takový je významným indikátorem přítomnosti těchto organismů v různých biologických materiálech. Pokud se jedná o plodiny mající uplatnění v potravinářském průmyslu, může mít zkoumání přítomnosti ergosterolu a stanovování jeho množství velký význam při zjišťování kontaminace těchto materiálů některými druhy nežádoucích hub, které mohou mít vliv na lidské zdraví, technologii zpracování v potravinářském průmyslu, způsoby skladování nebo například při hodnocení náchylnosti používané rostlinné odrůdy k napadení nežádoucími mikroorganismy. Přímý vliv na lidské zdraví mohou mít toxické látky produkované některými druhy těchto hub zvané mykotoxiny. Je tedy nezbytné omezit kontaminaci potravin houbami, které produkují mykotoxiny, na minimum. Pokud jde o pivovarský průmysl, zkoumá se možný vliv napadení těmito organismy v souvislosti s tzv. gushingem, což je nežádoucí jev označovaný jako spontánní přepěňování piva při otevření lahve. I zde by tedy stanovení ergosterolu jako indikátoru napadení těmito organismy mohlo najít své praktické využití. Tato problematika je však poměrně složitá a třebaže se má za to, že jednou z možných příčin gushingu je přítomnost mykotoxinů, konkrétní látky způsobující tento jev zatím nebyly nalezeny.

Extrakce ergosterolu z různých druhů zkoumaného biologického materiálu je poměrně složitý proces a v různých studiích zabývajících se tímto tématem je možné nalézt široký výběr metod, od těch méně náročných, využívajících zejména laboratorní vybavení, až po velmi sofistikované metody. Ve své práci jsem se pokusil přinést ucelený pohled na metody, které byly použity pro extrakci ergosterolu z ječmene a sladu i ty metody, které by bylo možné pro tyto plodiny použít.

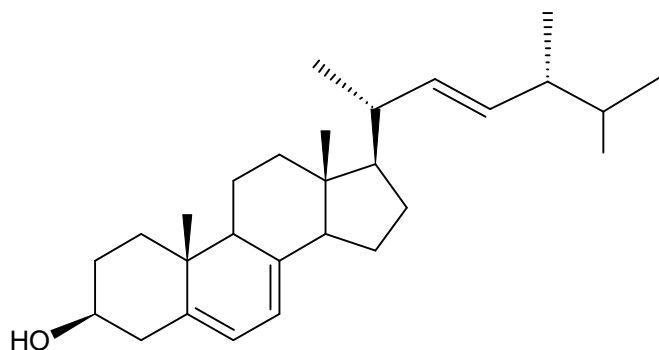
Stanovení a kvantifikace ergosterolu se v současnosti provádí použitím některých chromatografických metod: chromatografie na tenké vrstvě, plynové a kapalinové chromatografie s detekcí hmotnostním spektrometrem a kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Vlastnosti ergosterolu

Identifikace:

- Systematický název: (22E)-Ergosta-5,7,22-trien-3beta-ol
- Strukturní vzorec:




Obr. č. 1: Strukturní vzorec ergosterolu

- Molekulový vzorec: $C_{28}H_{44}O$
- Molekulová hmotnost: 396.65
- Registrační číslo CAS: 57-87-4

Fyzikálněchemické vlastnosti:

- Bod tání: 156-158 °C
- Bod varu: 250 °C
- Rozpustnost ve vodě: PRAKTICKY NEROZPUSTNÝ

Bezpečnostní informace:

- Hazard Symbol:  T+
- R věty: R28
- S věty: S28,S36/37,S45

Ergostrol ((22E)-ergosta-5,7, 22-trien-3 β -ol) je bílá krystalická látka, za normálních podmínek stabilní, patří do skupiny fytosterolů. Je biologickým prekursorem (provitamínem) vitamínu D₂. Působením ultrafialového záření se mění na viosterol, který je dále přeměněn na ergokalciferol, který se dále v játrech mění na aktivní vitamín D. Vitamín D má vliv na metabolismus vápníku a ve velkých dávkách je toxický. Naopak nedostatek vitamínu D zapříčiňuje poruchy v metabolismu vápníku a fosforu, což má za následek měknutí a křivení kostí – křivici [1].

2.1.1. Výskyt ergosterolu

Ergosterol je hlavním steroidem produkovaným mnoha druhy nižších i vyšších hub a jedná se o specifický membránový lipid těchto hub. Jde například o rody *Fusarium*, *Alternaria*,

Cladosporium, *Mucor*, *Penicilium*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium* a *Paecilomyces*. Mnoho z těchto hub může být izolováno ze zrn nebo jiných částí obilnin. Zatímco některé houby tvoří přirozenou mikroflóru zrn, jiné mohou způsobit plesnivění a kontaminaci zrn toxiny. Toto je spojeno s produkcí mykotoxinů během růstu a skladování sklizně a s škodlivými účinky u lidí i zvířat. Koncentrace těchto toxinů často velmi výrazně korespondují s obsahem ergosterolu v kontaminovaném obilí [2]. Výskyt ergosterolu v jiných organismech je velmi omezený, pouze v některých bakteriích a kvasinkách byly nalezeny zanedbatelné koncentrace ergosterolu v sušině. Díky tomuto specifickému výskytu je ergosterol často používán jako indikátor zaplísnění zkoumaného vzorku, ať už se jedná například o obilné zrno nebo jiný rostlinný materiál [3, 4].

2.2. Výskyt ergosterolu v ječmeni a sladu

Existuje poměrně mnoho studií, které se zabývají stanovením ergosterolu v různých typech biologického materiálu i přímo v ječmeni a ve sladu. Hlavním cílem u většiny těchto prací je posouzení vztahu mezi obsahem ergosterolu ve vzorku daného biologického materiálu a kontaminací tohoto materiálu plísněmi, případně mykotoxiny produkovanými těmito plísněmi, a tedy snaha o vytvoření poměrně jednoduché metody, jak získat informace o zaplísnění daného materiálu způsobem, který je méně časově náročný, než klasický mikrobiologický způsob kultivace mikroorganismů. Tyto informace mohou být velice cenné z hlediska posouzení kvality produktů rostlinné výroby i z hlediska technologie například při uskladňování těchto produktů.

Gawrysiak-Witulska a kol. (2008) [3], zjišťovali vztah mezi obsahem ergosterolu a kontaminací plísněmi u sladovnického ječmene uskladněného v silu. Míra zaplísnění byla stanovována mikrobiologickou analýzou a ergosterol byl izolován mikrovláknou extrakcí a stanovován na kapalinovém chromatografu. Z výsledků těchto měření bylo zjištěno, že obsah ergosterolu pozitivně koreluje s mírou zaplísnění – korelační faktor činil 0,92. Touto studií bylo také dokázáno, že analyzovaný typ sladovnického ječmene byl lépe chráněn vůči tzv. skladovým plísním (např. rody *Aspergillus* a *Penicillium*) a mykotoxiny, které mohou těmito plísněmi produkovány (zejména ochratoxiny). Ze studie však zároveň vyplývá, že je třeba jisté opatrnosti při interpretaci výsledků obsahu ergosterolu v souvislosti s mírou kontaminace plísněmi a není možné brát obsah ergosterolu jako absolutní míru zaplísnění, protože obsah ergosterolu závisí také na mezidruhových rozdílech, stáří kultury, stupni vývoje (růstová fáze, tvorbě hyf nebo sporulace) a podmínkách růstu.

Další studií Olssona a kol. (2000) [5], zabývající se vztahem mezi kontaminací plísněmi různých druhů, obsahem mykotoxinů produkovaných těmito druhy, obsahem vody ve vzorcích a obsahem ergosterolu v ječmeni, byla zjištěna silná korelace mezi obsahem ergosterolu ve vzorcích, hodnotami množství Ochratoxinu A (OTA), celkovým počtem plísní i počty jednotlivých druhů plísní, stejně tak jako s obsahem vody ve vzorcích. Bylo zjištěno, že zatímco obsahy ergosterolu a OTA spolu vzájemně korelují, obsahy ergosterolu a deoxynivalenolu (DON, mykotoxin produkovaný plísněmi rodu *Fusarium*) nikoliv. Některé starší studie sice ukazují souvislost mezi obsahem ergosterolu, DON a stupněm kontaminace plísněmi rodu *Fusarium*, avšak v těchto případech byly analyzované vzorky uměle naočkovány (Perkowski a kol. (1995) [6], Boley and Müller (1986) [7]). Výsledky této studie tedy ukazují na to, že co se týče přirozeně kontaminovaného materiálu, je nalezená korelace mezi obsahem ergosterolu a OTA a naopak nízká korelace mezi obsahem ergosterolu a DON

způsobena faktem, že plísně produkující OTA více přispívají k obsahu ergosterolu, než plísně produkující DON [5].

K podobnému závěru, co se týče obsahu ergosterolu a jeho vztahu k DON, se přiklání i studie Ježkové a kol. (2009) [8], zabývající se změnami obsahu ergosterolu a DON v ječmeni a sladu v průběhu procesu sladování. Analyzováno bylo dvacet vzorků ječmene a z něj připraveného sladu. Obsah ergosterolu po sladování ječmene vzrostl u 95 % vzorků. Výsledky byly statisticky analyzovány a bylo zjištěno, že proces sladování má výrazný efekt na koncentraci ergosterolu. Oproti tomu efekt na obsah deoxynivalenolu nebylo možné po statistické analýze výsledků potvrdit. Stejně tak nebyl zjištěn přímý vztah mezi obsahem ergosterolu a deoxynivalenolu. Koeficienty lineární korelace byly velmi nízké (ječmen 0,02 a slad 0,01). V přirozeně zaplísňených vzorcích tedy nemůže být obsah ergosterolu považován za indikátor kontaminace deoxynivalenolem [9].

2.3. Obsah ergosterolu a gushing

Jednou z možností aplikace metod stanovení ergosterolu, a to konkrétně v pivovarském průmyslu, je uplatnění ve sledování takzvaného gushingu, neboli samovolného přepěňování piva. Je to poměrně komplexní problém, který může souviset s látkami obsaženými v pivovarských surovinách i s technologickým postupem výroby piva. Obecně je ale gushing dáván do souvislosti s mykotoxiny, přímý vliv konkrétní látky nebo skupiny látek však nebyl zatím zjištěn.

Studie Jedličkové a kol. (2008) [10] zkoumala přímou souvislost mezi gushingem a obsahem ergosterolu v ječmeni ze sklizně 2004 a z něj vyrobeném sladu a došla k závěru, že obsah ergosterolu a gushing spolu přímo nesouvisí.

Nejčastějším druhem plísní, který napadá ječmen a slad, jsou plísně rodu *Fusarium*, tedy plísně produkujících DON. Proto byla snaha o zjištění případné souvislosti právě mezi gushingem a kontaminací plísněmi rodu *Fusarium* a obsahem DON. Ve studii Schwarze a kol. z roku 1995 [11], zabývající se právě vztahem mezi zamořením ječmene a sladu plísněmi rodu *Fusarium* a potenciálem ke gushingu a zároveň obsahem ergosterolu, bylo zjištěno, že kontaminace metabolity plísní, ergosterolem nebo DON, je možné považovat za dobrý indikátor gushingu, protože hodnoty DON v ječmeni a sladu a hodnoty obsahu ergosterolu v ječmeni výrazně korelovaly s hodnotami pozorovaného gushingu. Co se naopak neprokázalo, byl vztah mezi gushingem a stupněm zaplísňení. Tím pádem by se dalo předpokládat, že kontrola mykotoxinů a ergosterolu v ječmeni a sladu může sloužit k vyloučení mnoha vzorků, u kterých může v praxi docházet s problémy s gushingem. Některé jiné studie však přímou souvislost mezi DON a gushingem neprokázaly. Takto tomu bylo například v případě studie Sarlinové a kol. (2005) [12], která zabývala souvislostí mezi gushingem a přítomností plísněných hydrofobinů, malých proteinů produkovaných těmito mikroorganismy, a zároveň zkoumala i obsah DON. Co se naopak prokázalo, byla souvislost mezi přítomností plísní a gushingem.

Jak je patrné, tento problém je velmi složitý a jedině, co lze s jistotou prokázat, je souvislost mezi gushingem a samotnou kontaminací plísněmi. Dále může záležet mimo jiné na samotném experimentu, například co se týče použití přirozeně kontaminovaných vzorků a vzorků naočkovaných příslušnou plísní, ale také na samotné interpretaci výsledků. Co se týče sledování obsahu ergosterolu v souvislosti s gushingem, je třeba být v interpretaci výsledků stejně opatrný, jako při posuzování stupně zaplísňení zkoumaného materiálu a brát v úvahu,

že obsah ergosterolu v kontaminovaných plodinách závisí také na mezidruhových rozdílech kontaminujících plísní, jejich stáří a dalších faktorech. Pokud tedy neexistuje přímá úměra mezi množstvím ergosterolu a množstvím DON a předpokládáme-li, že samotný ergosterol přímou souvislost s gushingem nemá, není možné nalézt souvislost mezi obsahem ergosterolu a gushingem a je nutné brát obsah ergosterolu pouze jako důkaz zaplísnění daného materiálu a tedy předpoklad vzniku gushingu u piva vyrobeného z takovéto suroviny.

2.4. Extrakce

Nejpoužívanější metody na izolaci ergosterolu z různých biologických matric vycházejí z metody popsané ve studii Seitze a kol. (1977) [13]. Zahrnuje extrakci methanolem, alkalickou saponifikaci a extrakci organickým rozpouštědlem nemísitelným s vodou (např. pentanem, hexanem nebo petroletherem). Další možností extrakce ergosterolu je například extrakce na tuhou fázi, mikrovlnná extrakce, extrakce urychleným tokem (PLE, pressurised liquid extraction), případně různé modifikace a kombinace těchto metod. Metody popsané níže jsou vhodné zejména pro následné stanovení pomocí kapalinové chromatografie. Postupy extrakce při následném stanovení plynovou chromatografií nebo chromatografií na tenké vrstvě vycházejí také z těchto metod, ale dochází zde k určitým změnám, které jsou popsány přímo u jednotlivých kvantifikačních technik.

2.4.1. Klasická metoda podle Seitze a kol.

Modifikace postupu Seitze a kol. [13] se nejčastěji objevují ve starších experimentech, ale s úspěchem se používají dodnes. Výhodou je menší ekonomická náročnost i poměrně snadný postup. Na druhou stranu je ale tato metoda velmi časově náročná. Metoda byla původně vyvinuta pro izolaci ergosterolu ze zrn čiroku, ale s drobnými úpravami je možné ji použít k analýze poměrně široký výběr biologického materiálu, včetně ječmene a sladu.

2.4.1.1. Příprava materiálu

Tato metoda, i její další podoby, je vhodná pro izolaci ergosterolu z různých typů biologického materiálu, ať už se jedná o analýzu půd, rozkládajícího se rostlinného materiálu, rostlinných pletiv, krmiva, ovocných šťáv, rýže, luštěnin, chmelu a samozřejmě i různých druhů obilí. Co se týče právě obilí a konkrétně ječmene a ječmenného sladu, je v zásadě možné použít dvě varianty. Buď pracovat přímo se zrny nebo s rozemletým ječmenem, popřípadě sladem.

2.4.1.2. Extrakce ergosterolu ze vzorku

Extrakce ergosterolu ze vzorku methanolem, jak je popsána ve starších studiích, může probíhat různými způsoby: rozmixování zrn s methanolem v mixéru a následné odstředění na centrifuze a oddělení vrchní vrstvy [13, 14], přímá extrakce v methanolu [15] (zde se jedná o extrakci ergosterolu z chmelových pelet rozetřených ve třecí misce), extrakce v methanolu v ultrazvukové lázni [16] (jedná se o analýzu půd, ale je možné použít i pro rozemletá obilná

zrna a podobně upravené vzorky), případně extrakce během zahřívání pod zpětným chladičem.

2.4.1.3. *Alkalická saponifikace*

Saponifikace, tedy alkalická hydrolýza, je efektivní procedura k uvolnění neutrálních lipidů, zejména triglyceridů, z biologické matrice. Dochází k hydrolýze esterových vazeb a uvolnění mastných kyselin z glycerolu nebo glyceridů a fosfolipidů a z esterifikovaných sterolů a karotenoidů [15].

Extrakt je zfiltrován a po přidání hydroxidu draselného [17] nebo směsi hydroxidu draselného s ethanolem [13, 14, 16] zahříván pod zpětným chladičem. Další možností je „studená“ saponifikace methanolického extraktu s přísadkou hydroxidu draselného, probíhající přes noc (nebo cca. 12 hodin) [15].

2.4.1.4. *Extrakce rozpouštědlem*

Po saponifikaci následuje extrakce organickým rozpouštědlem, nemísitelným s vodou. Před extrakcí je možné ještě do směsi přidat destilovanou vodu, je to proto, aby se dvě nemísitelné fáze od sebe snadněji oddělily. Pro samotnou extrakci se jako vhodná rozpouštědla používají např. n-hexan [17, 16], petrolether [13, 14, 16] nebo pentan. Směs je několikrát (ve většině případů třikrát) vytřepána do příslušného organického rozpouštědla a po rozdělení nemísitelných složek je vrchní vrstva tohoto rozpouštědla odebrána. Po odebrání všech frakcí je rozpouštědlo na rotační odparce [15, 16] nebo pod mírným proudem dusíku [13, 14, 17] odpařeno do sucha a odparek je znovu rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle, např. cyklohexanu [17], methanolu [15, 16] nebo jiném.

2.4.1.5. *Promývání v koloně*

Možností, jak oddělit z extraktu rušivé látky, které by mohly rušit stanovení, je promytí na SPE koloně, jak je popsáno v práci Abramsona a Smitha (2001) [17]. Odparek po extrakci je rozpuštěn v cyklohexanu a nastříknut do kolony se silikagelem a je promýván dalšími dvěma díly cyklohexanu. Poté je kolona promyta tetrachlormethanem a odsáta dosucha. Ergosterol je eluován acetonem a eluát je následně vysušen v atmosféře dusíku a znovu rozpuštěn v pyridinu. Po acetylaci anhydridem kyseliny octové a dalším vysušením v atmosféře dusíku je výsledný extrakt rozpuštěn v acetonitrilu [17].

2.4.2. **Modifikace klasické metody podle Vargové a kol.**

Tato metoda vychází také z původního postupu použitého Seitzem a kol. [13], ovšem s jedním zásadním rozdílem. Proces extrakce ergosterolu ze vzorku a alkalické saponifikace je spojen do jednoho kroku. Výhodou je zejména menší časová náročnost, než u původní metody. Co se týče výtěžnosti, jsou výsledky obou metod podobně kvalitní a záleží především na materiálu ve kterém je ergosterol stanovován.

2.4.2.1. *Příprava materiálu*

Stejně jako u klasické metody, je touto metodou možné izolovat ergosterol z velkého množství biologických matric. Co se týče izolace z ječmene a sladu, používá se rozemletých ječných i sladových zrn.

2.4.2.2. *Extrakce ergosterolu ze vzorku a alkalická saponifikace*

Extrakce ze vzorku a saponifikace probíhá zároveň. Jednou možností je zahřívání směsi vzorku a roztoku 10 % KOH v methanolu [4, 9, 18] nebo směsi KOH/ethanol/methanol [19], na vodní lázni (80 – 85°C).

2.4.2.3. *Extrakce rozpouštědlem*

Po zchlazení na laboratorní teplotu je stejně jako v předchozí metodě přidána voda, pro snadnější dělení a poté je vytřepána třikrát do hexanu [4, 9, 18] nebo do pentanu [19]. Po následném odpaření rozpouštědla je odparek opět rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle: methanol [19] nebo směs methanol/toluen [4, 9, 18].

2.4.3. Další modifikace klasické extrakce podle Jambunathana a kol.

Další metoda vycházející z původní metody podle Seitze a kol. [13] je metoda Jambunathana a kol. (1991) [18]. Narozdíl od předchozí metody je extrakce ergosterolu ze vzorku prováděna samostatně (nejčastěji v methanolu) a v následujícím kroku provádí alkalická saponifikace spojená zároveň s extrakcí do rozpouštědla.

2.4.3.1. *Příprava materiálu*

Viz. předchozí metody.

2.4.3.2. *Extrakce ergosterolu ze vzorku*

Směs vzorku a methanolu [10, 11, 20] je třepána na třepáčce, případně může být vystavena působení ultrazvuku v ultrazvukové lázni.

2.4.3.3. *Saponifikace a extrakce rozpouštědlem*

V čistém extraktu je rozpuštěn hydroxid draselný a po přidání destilované vody a n-hexanu je směs temperována na vodní lázni po dobu cca. 30 minut při teplotě 55 – 65°C. Po ochlazení na laboratorní teplotu je odebrána vrchní vrstva. Extrakce do n-hexanu je provedena celkem třikrát. Spojené frakce jsou poté odpařeny na vakuové odparce a odparek je znovu rozpuštěn v methanolu [10, 11, 20].

2.4.4. Extrakce na tuhé fázi

Extrakce na tuhé fázi (SPE, solid phase extraction) je další vhodnou metodou k extrakci ergosterolu z různých biologických materiálů. Poprvé byla použita v experimentu Gessnerem a kol. (1995) [21] pro stanovení ergosterolu v čerstvých a tlejících listech. Dále byla použita ke stanovení ergosterolu v rýži [22] a v pšenici [23] a dá se tedy předpokládat, že by bylo možné ji využít i v případě ječmene a sladu. Metoda se skládá ze tří dílčích kroků. Nejprve dochází k extrakci lipidů a saponifikaci, poté je směs okyselena a nakonec je provedena samotná extrakce na SPE koloně.

Jak bylo zjištěno, SPE extrakce přináší podobně uspokojivé výsledky jako klasická extrakce kapalina-kapalina (LLE, liquid-liquid extraction). Tato metoda tedy může být vhodnou alternativou ke klasickým metodám popsaným výše.

2.4.4.1. *Extrakce lipidů a saponifikace*

Směs rozemletého vzorku a roztoku KOH v methanolu je zahřívána pod zpětným chladičem po dobu cca. 30 min [22, 23].

2.4.4.2. *Okyselení*

Extrakt je zchlazen na laboratorní teplotu je pH upraveno na hodnotu 4 – 6 a směs je zředěna destilovanou vodou [22, 23].

2.4.4.3. *Extrakce na tuhé fázi*

SPE kolona je promyta methanolem a následně promývacím roztokem, o stejném složení jako okyselený extrakt vzorku (roztok KOH v methanolu okyselený kyselinou chlorovodíkovou). Vrchní vrstva extraktu je zavedena do kolony a je dále promývána směsí KOH s methanolem. Poté je ergosterol z kolony vymyt směsí KOH s isopropanolem do vialky obsahující směs KOH a methanol [22, 23].

2.4.5. Mikrovlnná extrakce

Tato metoda byla poprvé použita Youngem (1995) [24]. Byla vyvinuta a vyzkoušena na hyfách hub, sporách, vyšších houbách, filtrovaném vzduchu, uměle kontaminované kukuřici, obilném prachu a půdě [24]. V dalších studiích však byla úspěšně použita i pro analýzu obsahu ergosterolu v obilninách [2] i přímo v ječmeni a sladu [3]. Vychází také částečně z metody použité Seitzem a kol. [13], s tím rozdílem, že extrakce ergosterolu ze vzorku methanolem a alkalická saponifikace probíhá společně v jednom kroku, a to za ozařování mikrovlnami.

Také mikrovlnná extrakce se ukázala být velice efektivní metodou izolace ergosterolu z různého biologického materiálu a to i ve srovnání s klasickou metodou. Výhodou je ještě menší časová náročnost, než u modifikovaných metod klasické extrakce podle Seitze a kol [13] a spotřeba menšího množství analyzovaného materiálu [24].

2.4.5.1. *Extrakce ergosterolu ze vzorku a alkalická saponifikace*

Vzorek je v kultivační zkumavce smíchán s methanolem a poté je ke směsi přidán vodný roztok chloridu sodného a zkumavka je pevně uzavřena. Kultivační zkumavka je umístěna do plastové lahve a ta je opět pevně uzavřena. Plastová láhev je poté umístěna do středu běžné domácí mikrovlnné trouby. Vzorek je poté vystaven ozařování mikrovlnami po dobu 35 – 45 sekund při výkonu 400 – 750 W [2, 3, 24].

2.4.5.2. *Extrakce rozpouštědlem*

Po vyjmutí z mikrovlnné trouby je kultivační zkumavka zchlazena na teplotu laboratoře a směs uvnitř je neutralizována vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové a poté extrahována třikrát pentanem (vše probíhá v kultivační zkumavce). Spojené pentanové frakce jsou poté odpařeny dosucha a odparek je znovu rozpuštěn v příslušném množství methanolu [2, 3, 24].

2.4.6. **Superkritická fluidní extrakce**

Nová technika pro superkritickou fluidní extrakci (SFE, supercritical fluid extraction) ergosterolu superkritickým oxidem uhličitým byla vyvinuta a vyzkoušena na vzorcích mouky, plesnivého chleba a hub *Youngem* a *Gamesem* (1995) [25].

Superkritické kapaliny mohou být definovány jako sloučeniny, které jsou ve stavu nad jejich kritickým tlakem (P_c) a nad jejich kritickou teplotou (T_c). Mohou pronikat pevnými látkami, jako plyny a rozpouštět jiné látky, jako kapaliny. Superkritické kapaliny jsou vhodné jako náhrada za organická rozpouštědla v celé řadě průmyslových i laboratorních postupů [26].

Protože rozpustnost ergosterolu v superkritickém oxidu uhličitým závisí na jeho hustotě, je možné, na základě změny hustoty, dosáhnout rozpuštění ergosterolu. Jelikož u této metody vzorek neprochází saponifikací, je možné takto stanovovat pouze volný ergosterol. Ke kvantifikaci se používá superkritická fluidní chromatografie (SFE, supercritical fluid chromatography), kde jako mobilní fáze vystupuje kapalina v superkritickém stavu [25].

SFE s následnou kvantifikací SFC je velmi rychlou a efektivní metodou stanovení volného ergosterolu, která je použitelná i při použití menších množství analyzovaného vzorku. Nevýhodou metody je, že neposkytuje údaje o vázaném ergosterolu a také její značná finanční náročnost [25].

2.4.6.1. *Extrakce*

Vzorek v extrakční patroně z nerezové oceli je umístěn do SFE modulu a ergosterol je extrahován za následujících podmínek: teplota extrakční komory, 40°C; extrakce je prováděna superkritickým oxidem uhličitým o hustotě 0,90 g/ml a tlaku 281 barů po dobu 11,4 minut při průtoku 3,3 ml/min. Analyty z extrakční kolony jsou zachycovány na oktadecylsilylovou kolonu při teplotě 40°C, kde dochází k ohřevu na 50°C a postupnému promytí 0,5, 1,0 a 1,5 ml methanolu. Tyto tři frakce jsou poté odpařeny dosucha a znovu rozpuštěny v dichlormethanu [25].

2.5. Metody stanovení ergosterolu

Pro kvantifikaci ergosterolu se používají tři chromatografické techniky. Nejvíce rozšířené je použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC, high-performance liquid chromatography) s detekcí pomocí UV detektoru s diodovým polem (DAD, diode-array detection), případně s detekcí hmotnostním spektrometrem (MS, mass spectrometer). Druhou metodou, která je ovšem podstatně méně využívána pro stanovení ergosterolu, je plynová chromatografie (GC, gas chromatography), která taktéž k tomuto stanovení využívá detekce pomocí hmotnostního spektrometru. Třetí, opět méně využívanou metodou kvantifikace, je chromatografie na tenké vrstvě (TLC, thin layer chromatography).

2.5.1. Stanovení pomocí plynové chromatografie (GC)

Stanovení pomocí GC/MS, kterému předchází pouze „jednokroková“ extrakce – která zahrnuje saponifikaci ve směsi KOH/MeOH, po které následuje pouze jedna extrakce do organického rozpouštědla nemísitelného s vodou (pentan/hexan) – s následnou derivatizací trimethylsilyl reagentem, se ukázalo být velmi spolehlivou, citlivou a rychlou metodou pro analýzu obsahu ergosterolu v ječmeni i v jiném materiálu. Jedna osoba je schopna tímto způsobem analyzovat až 40 – 80 vzorků denně [27, 28]. Nevýhodou metody může být její vyšší finanční náročnost.

2.5.1.1. GC – popis metody

Plynová chromatografie je analytická separační metoda, kde jako mobilní fáze vystupuje plyn a jako stacionární fáze pevná látka (polyethylenglykoly (Carbox), polypropylenglykoly (Ucon), polyestery, silikony, polysiloxany aj), případně kapalina, která je zakotvena buď na nosiči (u náplňových kolon) nebo na vnitřním povrchu kapiláry (u kapilárních kolon). Vzorek musí být v plynném stavu, nebo se musí převést do plynného stavu za zvýšené teploty (dostatečně těkavé látky) [29]. K dělení analytů dochází na základě jejich různé afinity k sorbentu. Různé analyty vykazují různou distribuci mezi sorbentem a eluentem nebo adsorpci na sorbentu. Rozdílné analyty jsou rozdílně zadržovány a rozdílně zpožďovány (retardovány) [30]. Aplikační možnosti GC lze rozšířit derivatizací, tj. převedením stanovovaných látek na deriváty, které vyhovují výše uvedeným podmínkám [31].

2.5.1.2. GC – Instrumentace

- zdroj nosného plynu – nosný plyn slouží jako transportní médium pro plynnou směs, která je analyzována a neinteraguje ani se stacionární fází, ani s analyzovaným vzorkem (např. He, N₂ a další) [29, 30]
- dávkovací zařízení – nástřík se provádí ručně nebo automaticky speciální injekční stříkačkou [29]
- kolona – používají se kolony náplňové (trubice o průměru 2 až 5 mm obsahující adsorbent nebo nosič se zakotvenou kapalnou fází) a kapilární (vyrábějí se

z křemeného skla, potaženého kvůli pevnosti filmem polyamidu, o maximálním průměru 5 mm [29, 30]

- detektor – plameno-ionizační (FID), tepelně vodivostní, detektor elektronového záhytu (ECD): citlivý, vhodný pro detekci halogenů, specifické detektory a kombinované techniky: GC-AAS, GC-MS, aj. [29]
- rozvody, regulační zařízení, programátory gradientu, vyhodnocovací zařízení [29]

2.5.1.3. *Detekce – MS*

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda, která stanovuje hmotnosti molekul a atomů po jejich převedení na ionty. Podstatou hmotnostní spektrometrie je separace iontů produkovaných v iontovém zdroji přístroje na základě jejich efektivní hmotnosti (m/z , kde m -hmotnost iontu a z -nábojové číslo) a jejich následná detekce. Všechny tyto procesy probíhají v uzavřeném prostoru, ve kterém je pomocí systému pump kontinuálně udržováno vakuum [31].

2.5.1.4. *Příprava vzorku – derivatizace*

Derivatizace je cílená chemická reakce pro určitý typ sloučenin. Cílem této reakce je zlepšení separační účinnosti, odstranění nežádoucích vedlejších interakcí polárních skupin analytů na koloně – symetrické vyšší úzké píky - snížení meze detekce – redukce potencionálních falešně negativních nálezů . Vhodnou derivatizací se může podpořit selektivita a citlivost detekce [32].

Po extrakci do rozpouštědla (hexan [27], pentan [28]) a vysušení na vakuové odparce nebo v atmosféře dusíku, je ergosterol v extraktu derivatizován přídavkem trimethylsilyl (TMS) reagentu. Dochází tak ke vzniku ergosterol-TMS derivátu, který jsou v hmotnostním spektru charakterizován třemi fragmentovými ionty s poměrem $m/z = 337, 363$ a 467 [27]. Po derivatizaci TMS reagentem je do vialky přidána směs isooktan/Mirex (dodekachlorpentacyklodekan), směs je jemně protřepána a poté je ke směsi přidána voda, aby bylo usnadněno rozdělení nemísitelných fází. Ergosterol-TMS derivát je extrahován do horní isooktanové vrstvy a poté převeden do vialky vhodné do GC autosampleru [1]. Další možností je odpaření TMS reagentu na odparce, opětovné rozpuštění ergosterol-TMS derivátu v toluenu a opět převedení do vialky vhodné do GC autosampleru [28].

2.5.2. TLC

Stanovení obsahu ergosterolu na TLC je vhodnou alternativou k GC a HPLC, která vyžaduje méně sofistikované a finančně náročné vybavení. Nevýhodou metody je její menší výtěžnost a nižší citlivost, nicméně i tak může být s úspěchem použita v běžném provozu například v laboratořích, které nejsou vybaveny GC nebo HPLC [33, 34].

2.5.2.1. *TLC – popis metody*

Chromatografie na tenké vrstvě je separační analytická metoda, která může být typu kapalina-kapalina nebo kapalina-tuhá látka. V obou případech je mobilní fází kapalina.

Stacionární fází je v případě TLC chromatografie buď kapalina zakotvená v tenké vrstvě na podložním materiálu nebo pevná látka (adsorbent) v podobě tenké vrstvy. V papírové chromatografii (PC, paper chromatography) je mobilní fází kapalina. Stacionární fází je v PC také kapalina, která je ovšem zakotvena v chromatografickém papíru. Používanými mobilními fázemi jsou například: cyklohexan, isopropanol, aceton, voda, toluen a pod. Stacionárními fázemi mohou být: silikagel, oxid hlinitý, iontoměniče a pod. Jako podložní materiál se pro stacionární fáze používají skleněné desky nebo hliníkové fólie [35].

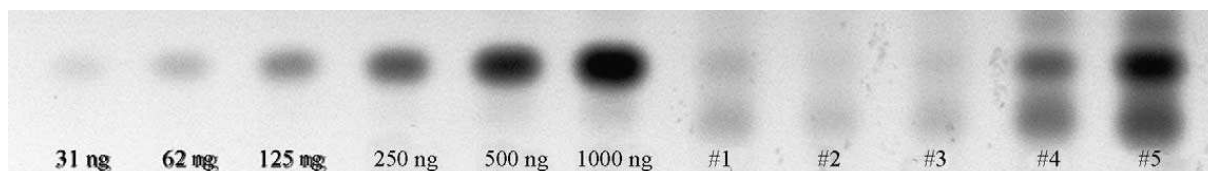
2.5.2.2. Vyhodnocení

Chromatogram je i v případě této metody možno vyhodnocovat kvalitativně a kvantitativně. Kvalitativní vyhodnocení (o jakou látku se jedná) se provádí tak, že se současně s analyzovanou směsí o neznámém složení analyzuje na téže tenké vrstvě předem připravená směs o známém složení (standard), který je nanesen na startovní pozici vedle neznámé směsi. Pokud se na chromatogramu shodují vzdálenosti jednotlivých složek od startu v neznámé směsi a ve směsi známé, pak se jedná o tytéž látky. Kvantitativní vyhodnocení se provádí pomocí denzitometru nebo extrakcí z chromatogramu. Denzitometr je přístroj, který zjednodušeně řečeno, dokáže změřit intenzitu zabarvení skvrn na chromatogramu a z intenzity vypočítat koncentraci látky. Při extrakční metodě jsou jednotlivé skvrny látek extrahovány z chromatogramu do vhodného rozpouštědla a jejich koncentrace v rozpouštědle je pak určena vhodnou metodou [35].

2.5.2.3. Příprava vzorku a postup stanovení ergosterolu na TLC

Extrakci ergosterolu ze vzorku, jak bylo popsáno, lze provádět klasickým způsobem, vycházejícím z metody podle Seitze a kol. [13] a v tomto případě je vysušený extrakt znovu rozpuštěn v methanolu a následně, společně se standardy ergosterolu, nanesen na fólii vysokoúčinné chromatografie na tenké vrstvě (HPTLC, high performance thin layer chromatography), kde je vyvíjen směsí toluen aceton. Po skončení vyvíjení je fólie vystavena působení par jodu a poté je koncentrace ergosterolu stanovena pod UV lampou [34].

U jiné metody je po saponifikaci provedena extrakce ergosterolu parafinovým olejem a extrakt je nanesen na TLC desku. Deska je vyvíjena pentanem a následně acetonem. Poté jsou desky derivatizovány směsí chloridu železnatého, demineralizované vody, kyseliny octové a kyseliny sírové a po vysušení je deska zahřátá na teplotu 120 °C a obsah ergosterolu je stanovován fluorodensitometricky [34].



Obr. č. 2: TLC fólie fotografovaná fluorescenční metodou. Standardy 31- 1000 ng a vzorky různých přírodních substrátů # 1 – 5 [34].

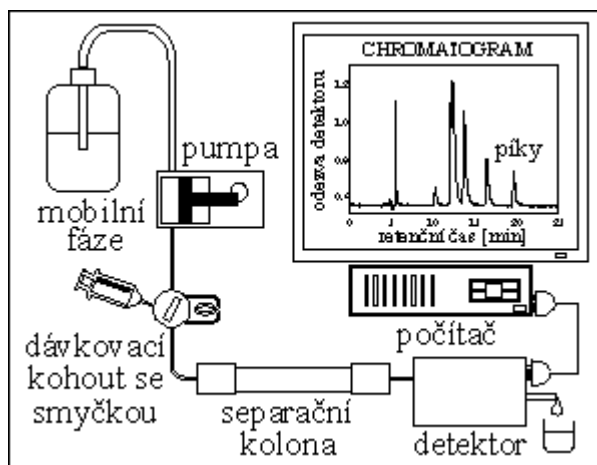
2.5.3. HPLC

Podstatně nejrozšířenější metodou kvantifikace ergosterolu, která byla použita i v našem experimentu, je HPLC se spektrofotometrickou detekcí (UV-VIS, DAD) nebo MS detekcí. HPLC je velmi vhodnou a vysoce citlivou metodou pro stanovování obsahu ergosterolu v ječmeni a sledu, ale i v široké škále jiných materiálů.

2.5.3.1. HPLC – popis metody

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je separační analytická metoda, kde jako mobilní fáze slouží kapalina a jako stacionární fáze slouží pevný adsorbent, případně kapalina nemísitelná s mobilní fází, zakotvená na pevném nosiči [36]. K separaci analytů dochází různými mechanismy podle typu metody. Gelová permeační chromatografie (GPC), využívá mechanického dělení molekul analytů v pórech gelu na základě jejich rozdílné velikosti. Rozdělovací chromatografie (LLC) využívá rozdílné rozpustnosti (a tudíž i rozdílné distribuce) molekul analytů mezi dvěma zcela nemísitelnými kapalinami. Adsorpční chromatografie (LSC) využívá rozdílné adsorpce molekul analytů na povrchu tuhé fáze s aktivními centry. Ionově výměnná chromatografie (IEC) využívá rozdílné výměnné adsorpce analytů (ionů) na povrchu iontového měniče [37].

2.5.3.2. HPLC – Instrumentace



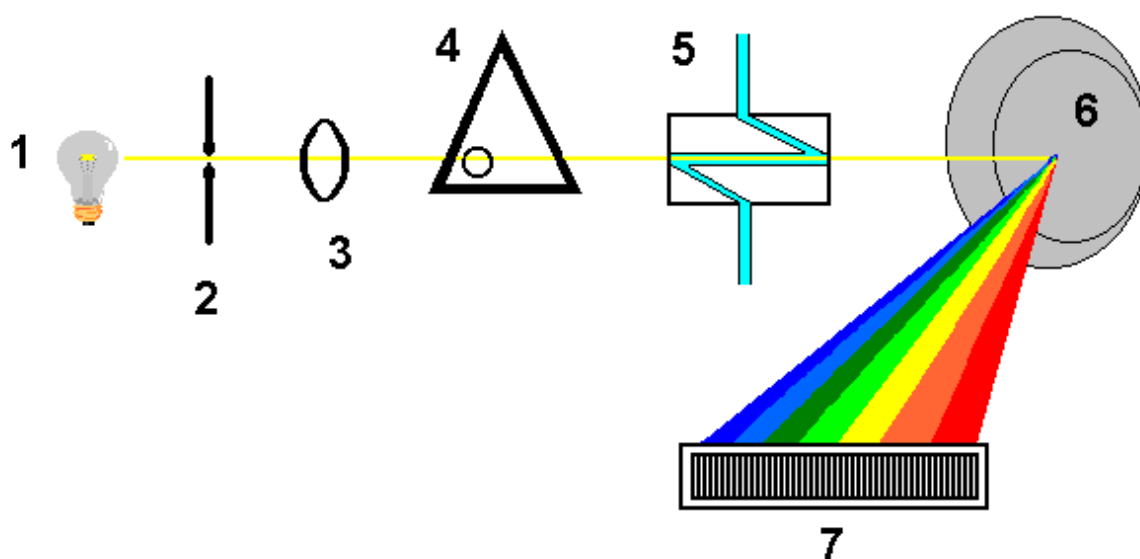
Obrázek č. 3: Schéma kapalinového chromatografu [37]

- zásobníky mobilní fáze – skleněné zásobní lahve s různými mobilními fázemi, které je možné navzájem mísit v předem zvoleném poměru (např.: voda, methanol, acetonitril a jiné) [35, 36]
- zařízení pro tvorbu gradientu – pokud se je použita gradientová eluce, eluční síla mobilní fáze vzrůstá během analýzy. Tvorba gradientu je zajištěna vysokotlakými čerpadly. Pokud se jedná o izokratickou eluci, složení mobilní fáze (její eluční síla) se během analýzy nemění [35, 36]
- vysokotlaké čerpadlo – musí zajistit konstantní (nebo programovatelný) bezpulsní průtok (ca. 0,1 - 10 ml/min) dávkovací zařízení při tlacích do ca. 60 mPa [36]

- kolona – Zpravidla se jedná o nerezovou trubici o vnitřním průměru okolo 4 mm a délce typicky 5-25 cm, která je naplněna stacionární fází. O schopnosti kolony separovat určité směsi na jednotlivé složky opět rozhoduje zejména typ stacionární fáze zakotvené na silikagelovém nosiči [35, 36]
- detektor – metoda HPLC využívá tyto typy detektorů: spektrofotometrický detektor (UV-VIS, DAD), fluorescenční detektor, hmotnostní spektrometr, refraktometrický detektor a další [36]
- registrační zařízení (zapisovač, integrátor, PC) [36]

2.5.3.3. DAD

Jedná se o nejdokonalejší typ spektrofotometrického detektoru. Na rozdíl od jednodušších detektorů, které snímají pouze záření o určité (předem zvolené) vlnové délce, je tento typ schopen snímat celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Záření ze zdroje se po průchodu štěrbinou, čočkou, clonou a měrnou celou detektoru spektrálně rozkládá holografickou mřížkou, takže na každou z fotodiód dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v cele detektoru (viz. schéma na obrázku č. 4). Fotoelektrický proud, který vzniká po dopadu záření na diodu pak vybije kondenzátor, je úměrný intenzitě dopadajícího záření. Proud, který je nutný k opětovnému nabití kondenzátoru na původní úroveň. Velikost tohoto proudu se ukládá do paměti řídicí jednotky a takto se zaznamenávají údaje o absorbanci při každé vlnové délce v každém okamžiku [38].



Obrázek č. 4: Schéma UV detektoru s diodovým polem: 1 – zdroj záření, 2 – štěrbinu, 3 – čočka, 4 – clona, 5 – měrná cela detektoru, 6 – holografická mřížka, 7 – fotodiody [38]

2.5.3.4. Příprava vzorku

Jak již bylo popsáno výše, je extrakt odpařen dosucha a odparek je znovu rozpuštěn v příslušném rozpouštědle (methanol, směs methanol/toluen, cyklohexan, dichlormethan) a převeden do tmavé vialky, aby bylo zabráněno vystavení ergosterolu UV záření a přeměně na

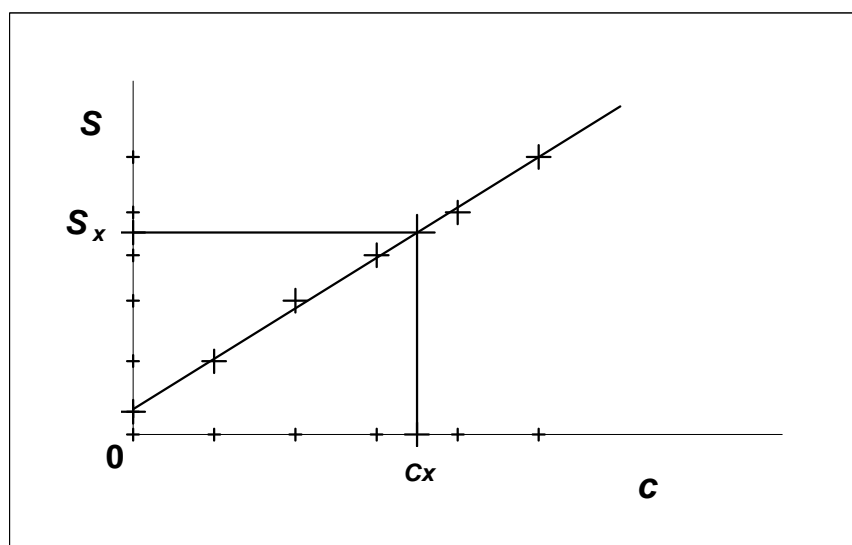
ergokalciferol. Před samotným stanovením je pak roztok přes PTFE filtr převeden do vialky pro kapalinovou chromatografii a vialka je umístěna do autosampleru HPLC.

2.6. Kvantifikace a stanovení výtěžnosti extrakce

Vhodným způsobem kvantifikace je metoda kalibrační křivky, která spočívá v přípravě tzv. standardních roztoků o známých rostoucích koncentracích a proměření jejich odezvy příslušnou měřicí metodou. Výtěžnost extrakce je možné určit tzv. metodou standardního přídávku, kdy ke stanovovanému vzorku je ještě před extrakcí přidáno známé množství standardu stanovované látky.

2.6.1. Metoda kalibrační křivky

Ze standardu zkoumané látky je pomocí ředění připravena řada roztoků o známých rostoucích koncentracích. Takto připravené roztoky jsou proměřovány příslušnou metodou, čímž jsou získány vždy dvojice hodnot signálu a koncentrace. Z takto získaných dat je sestaven graf závislosti signálu (S) na koncentraci (c), kde rovnice: $S = a + b \cdot c$ vyjadřuje rovnici kalibrační přímky. Konstanta a vyjadřuje úsek vytčený přímkou na ose x a konstanta b je směrnici přímky. Vyneseme-li na ose y hodnotu signálu pro vzorek (S_x) získáme na ose x hodnotu koncentrace analytu (c_x) [39].



Obrázek č. 5: Kalibrační křivka [39]

2.6.2. Metoda standardního přídávku

Metodu standardního přídávku je možné použít v případě, že mezi signálem analytu a jeho koncentrací platí přímá úměra a roztok o nulové koncentraci stanovované látky má také nulový signál. Navážíme dvakrát stejné množství zkoumaného vzorku a k jednomu vzorku přidáme známé množství standardu stanovované látky. Dále provádíme extrakci a stanovení analytu stejným způsobem pro oba vzorky. Z rozdílu stanovené koncentrace analytu ve vzorku s přídávkem známého množství standardu a koncentrace vzorku bez přídávku

standardu je možné vydělením koncentrací původně přidaného standardu vypočítat procentuální výtěžnost extrakce. K výpočtu použijeme tento vzorec:

$$R = \frac{c_{VZ+SPIKE} - c_{VZ}}{c_{SPIKE}} \cdot 100 \quad [39]$$

kde R vyjadřuje výtěžnost extrakce a $c_{VZ+SPIKE}$, c_{VZ} , c_{SPIKE} jsou jednotlivé koncentrace [39].

Přídavek stanovované látky ve vzorku se nazývá „spike“ a podle toho bývá metoda standardního přídavku označována jako „spikování“.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použité přístroje

- Analytické váhy Sartorius GMBH Göttingen
- Třepačka LT-2
- Ultrazvuk TESLA, ČR
- Vodní lázeň Memmert, M001, Německo
- Vakuová odparka IKA RV10
- Kapalinový chromatograf Dionex – Ultimate 3000
- Detektor DAD Dionex – Ultimate 3000
- Kolony:
 - WATREX Nucleosil 120 – 5 C18, 250 x 4 mm, 5 µm
 - Ascentis express C18 (s pevným jádrem), 150 x 3 mm, 2,7 µm
- Termostat MetaTherm™, HPLC Column Temperature Control
- Mlýnek Bühler-Miag
- Běžné laboratorní sklo a další vybavení

3.2. Software

- Chromeleon client 6.80, SR6 Build 2491
- Microsoft Office Word 2003
- Microsoft Office Word 2003
- ACD/ChemSketch FREEWARE, verze 10.0

3.3. Chemikálie

- Methanol G Chromasolv[®], for gradient elution 99,9 %, Sigma – Aldrich
- Acetonitril Chromasolv[®], for HPLC, gradient grade 99,9 %, Sigma – Aldrich
- Hexane Chromasolv[®], for HPLC, 95 %, Sigma – Aldrich
- Hydroxid draselný (v pecičkách), purum, Lachema

3.4. Standard

- Ergosterol, purum 95 % (HPLC), Sigma

3.5. Použité vzorky

K analýze vzorků byly vybrány ječmeny z pokusné stanice Branišovice (Jižní Morava, okres Pohořlice). Jednalo se o odrůdy Bojos, Jersey, Radegast, Sebastian a Tolar, v ošetřené i neošetřené variantě. Ošetřená varianta zahrnuje postřik fungicidem proti plísňovým chorobám. Dále byly analyzovány chemicky neošetřené vzorky ječmene Bojos a Sebastian z pokusných stanic Hrubčice (Olomoucký kraj, okres Prostějov), Lednice (Jižní Morava, okres Břeclav) a Krásné Údolí (Karlovarský kraj, okres Karlovy Vary). Byly analyzovány těž

dva vzorky sladu vyrobených z ječmene odrůdy Bojos z pokusné stanice Branišovice a z ječmene odrůdy Sebastian z pokusné stanice Lednice.

Všechny použité odrůdy patří do skupiny sladovnických odrůd ječmenů jarních. Tyto odrůdy se vyznačují vysokým výnosem předního zrna, dobrou odolností vůči chorobám napadajícím obilniny i proti poléhání, dostupností osiva a jsou vysoce ceněné ve sladařském průmyslu [40].

Vzorky byly vybírány s ohledem na naměřené pozitivní hodnoty gushingu.

3.5.1. Odrůda Bojos

Polopozdní sladovnická odrůda, která je Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským doporučena pro výrobu Českého piva. Výnos předního zrna je v kukuřičných oblastech středně vysoký až vysoký a v ostatních oblastech je středně vysoký. Rostliny jsou středně vysoké až vysoké a středně odolné proti poléhání. Zrno je středně velké. Riziko pro pěstitele představuje menší odolnost proti napadení rhynchosporiovou skvrnitostí. Jedná se o chorobu, která napadá zejména ječmen, žito a tritikale a projevuje se tvořením podélných běžových skvrn zejména na listech [40, 41].

3.5.2. Odrůda Jersey

Polopozdní sladovnická odrůda, která je vzhledem k zájmu sladoven zařazena do kategorie doporučených odrůd. Výnos předního zrna je v řepařské a obilnářské oblasti a v neošetřené variantě v bramborářské oblasti nízký, v kukuřičné oblasti a v ošetřené variantě v bramborářské oblasti je středně vysoký. Rostliny jsou středně vysoké až vysoké, náchylné k poléhání. Zrno je středně velké až malé. Rizikem pro pěstitele je její náchylnost k napadení rzí ječnou. Tato choroba se na ječmeni projevuje vznikem malé oranžové krupičky – ložisek letních výtrusů [40, 41].

3.5.3. Odrůda Radegast

Polopozdní sladovnická odrůda, která je Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským doporučena pro výrobu Českého piva. Výnos předního zrna je ve všech oblastech středně vysoký. Rostliny jsou středně vysoké až vysoké a středně odolné proti poléhání. Zrno je velké. Výhodou pro pěstitele je střední odolnost vůči napadení hnědou skvrnitostí. Tato choroba ječmene se projevuje vznikem podélných, nepravidelně tvarovaných, tmavě hnědých skvrn na listech [40, 41].

3.5.4. Odrůda Sebastian

Polopozdní odrůda s výběrovou sladovnickou jakostí, která je preferovaná některými sladovnicemi. Výnos předního zrna je v bramborářské oblasti a v ošetřené variantě v řepařské a obilnářské oblasti vysoký, v kukuřičné oblasti a v neošetřené variantě v řepařské a obilnářské oblasti je středně vysoký. Rostliny jsou nízké, středně odolné proti poléhání. Zrno je středně velké. Odrůda je středně odolná proti napadení rzí ječnou (viz. výše), ale méně odolná proti napadení padlím travním na listu. Choroba se projevuje vznikem malých malých, bělavých

kupek micelia na spodních listech, na kterých se později objevují drobné černé tečky – plodnice pohlavního stadia houby [40, 41].

3.5.5. Odrůda Tolar

Polopozdní sladovnická odrůda, která je Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským doporučena pro výrobu Českého piva. Výnos předního zrna je ve všech oblastech nízký. Rostliny jsou středně vysoké až vysoké a středně až méně odolné proti poléhání. Zrno je středně velké. Odrůda je méně odolná proti napadení padlím travním na listu (viz. výše) [40].

3.6. Postupy extrakce

3.6.1. Příprava vzorku

- zrna ječmene a sladu byla pomleta na mlýnku a uzavřena v plastové krabici, která byla označena číslem vzorku
- označená plastová krabice se vzorkem byla uchovávána při laboratorní teplotě na tmavém místě

3.6.2. Postup extrakce

- 2 g namletého vzorku ječmene nebo sladu byly naváženy do vialky z čirého skla o objemu 40 ml (vzorky byly navažovány duplicitně)
- do vialky bylo přidáno 20 ml 10 % roztoku KOH v methanolu
- vialka byla uzavřena plastovým víčkem s PTFE (Polytetrafluorethylen, Teflon®) septem a řádně protřepána
- vialka byla dále vystavena působení ultrazvuku v ultrazvukové vodní lázni po dobu 20 minut
- ke směsi vzorku a roztoku KOH v methanolu bylo přidáno 10 ml hexanu
- vialka byla inkubována 30 minut na vodní lázni o teplotě 66 °C
- po ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 5 ml deionizované vody
- horní hexanová vrstva byla opatrně odebrána Pasteurovou pipetou a přenesena do odpařovací baňky o objemu 100 ml
- ke směsi bylo opět přidáno 10 ml hexanu a po inkubaci 30 minut na vodní lázni byla opatrně odebrána vrchní hexanová vrstva a znovu přenesena do odpařovací baňky o objemu 50 ml
- stejný postup byl ještě jednou zopakován
- spojené hexanové frakce v odpařovací baňce byly vysušeny na vakuové odparce při teplotě 55 °C
- odparek byl rozpuštěn postupně ve dvakrát 2 ml methanolu a převeden do tmavé vialky o objemu 4 ml

3.7. Identifikace a kvantifikace analytu

Získané vzorky byly analyzovány pomocí vysokoúčinného kapalinového chromatografu Dionex – Ultimate 3000 na koloně WATREX Nucleosil 120-5 C18, 250 x 4 mm, 2,7 µm s použitím DAD detekce. Kvantifikace byla prováděna metodou kalibrační křivky a výtěžnost byla ověřena metodou standardního přídávku.

3.7.1. Příprava vzorku pro stanovení na HPLC

- cca. 1 ml vzorku z vialky (4 ml) byl nasát do injekční stříkačky a přes filtr o velikosti póru 45 µm převeden do vialky určené pro HPLC
- vialka byla pomocí speciálních kleští uzavřena krimpovacím uzávěrem s PTFE septem a vložena do autosampleru kapalinového chromatografu

3.7.2. Příprava roztoků pro kalibraci

- do odměrné baňky na 100 ml bylo naváženo 50 mg standardu ergosterolu
- odměrná baňka byla doplněna po rysku methanolem
- k úplnému rozpuštění ergosterolu v methanolu byla odměrná baňka vystavena 5 minut působení ultrazvuku v ultrazvukové vodní lázni
- 2 ml roztoku byly napipetovány do vialky z tmavého skla
- vialka byla doplněna 2 ml methanolu a řádně promíchána
- takto byla připravena řada standardních roztoků ergosterolu v methanolu o následujících koncentracích: 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml, 1,5625 µg/ml
- připravené standardní roztoky byly, stejně jako v případě vzorků, převedeny do vialek určených pro HPLC

3.7.3. Metoda standardního přídávku

- k navážce 2 g vzorku bylo ze standardního roztoku ergosterolu v methanolu napipetováno množství odpovídající 20 µg ergosterolu
- dále bylo postupováno stejným způsobem jako u vzorků neobsahujících přídavek standardu ergosterolu

3.7.4. Chromatografické podmínky

- Mobilní fáze: 20 % acetonitril, 80 % methanol, isokratická eluce
- Průtok: 1 ml/min
- Nástřik: 20 µl
- Teplota: 35 °C
- Detekce: 282 nm
- Čas analýzy: 12 minut

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Obsahy ergosterolu ve všech testovaných odrůdách byly stanoveny výše uvedenou metodou. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce. Tato metoda je co se týče výtěžnosti extrakce testované „spikování“ vybraných vzorků (výtěžnost kolem 100 %) i co se týče opakovatelnosti výsledků na vysoké úrovni. Nevýhodou bohužel je její složitost i vysoká časová náročnost. Další nevýhodou je, že při zahřívání směsi s hexanem dochází k velkému natlakování vialek při varu směsi a k unikání hexanu, čímž dochází nejen k jeho nežádoucímu rozšíření v prostředí laboratoře (pokud se vodní lázeň nenachází v digestoři), ale také k narušování plastových vršek a jejich odpadávání.

Tab. č. 1: Výsledky měření

oblast:	odrůda:	chemické ošetření:	c (mg/kg)
Branišovice	Bojos	NEOŠETŘENÉ	11,99
	Jersey		12,09
	Radegast		11,35
	Sebastian		13,31
	Tolar		12,01
	Bojos	OŠETŘENÉ	11,69
	Jersey		11,69
	Radegast		11,05
	Sebastian		10,95
	Tolar		10,70
Hrubčice	Bojos	NEOŠETŘENÉ	8,43
	Sebastian		9,82
Lednice	Bojos	NEOŠETŘENÉ	8,76
	Sebastian		12,64
Krásné Údolí	Bojos	NEOŠETŘENÉ	10,76
	Sebastian		10,25

4.1. Nehomogenita vzorku

Před stanovením se vzorek ječmene mele na mlýnku na částice o velikosti 0,2 mm, a to i s pluchami (obalová vrstva ječmene), které jsou, jak se dá předpokládat, více kontaminovány plísněmi, než vnitřní endosperm, který je těmito obalovými vrstvami chráněn. Při odvažování vzorku pak může nastat situace, kdy je nabráno více či méně těchto pluch, což se projevuje ve výsledcích stanovení. Je třeba tedy brát v úvahu, že drobné odchylky mezi jednotlivými stanoveními mohou být způsobeny právě touto nehomogenitou vzorku.

4.2. Optimalizace extrakce

V rámci snahy o dosažení co nejlepších výsledků a zároveň co nejjednodušší a nejrychlejší metody, byly testovány různé způsoby extrakce. Výsledky jsou uvedeny níže.

4.2.1. Použití třepačky

V původní metodě bylo namísto vystavení vzorku působení ultrazvuku v ultrazvukové lázni (20 minut) použito třepání na třepačce po dobu 30 minut. Dosažené výsledky jsou téměř shodné, nicméně z důvodu o něco menší časové náročnosti byla dále používána pouze ultrazvuková lázeň.

Tab. č. 2: Srovnání výsledků při použití třepačky a ultrazvuku

	vzorek (oblast – odrůda)	c (mg/kg)
třepačka	Branišovice – Tolar	11,72
ultrazvuk	Branišovice – Tolar	11,81

4.2.2. Snížení počtu extrakcí do hexanu

Další testovanou změnou bylo snížení počtu extrakcí do hexanu z původních tří na dvě. Jak je ale patrné z tabulky, je rozdíl ve stanoveném obsahu ergosterolu natolik významný, že není možné počet extrakcí snížit. Celá sada vzorků tedy byla extrahována do hexanu třikrát.

Tab. č. 3: Srovnání výsledků při provedení dvou a tří extrakcí do hexanu

počet extrakcí	vzorek (oblast – odrůda)	c (mg/kg)
2	Branišovice – Jersey	9,17
3	Branišovice – Jersey	12,02

4.2.3. Změna postupu extrakce – vytřepání do hexanu bez zahřívání

Aby odpadlo zahřívání směsi s hexanem na vodní lázni, kvůli problémům popsaným výše, byla otestována následující metoda, vycházející ze způsobu stanovení ergosterolu podle Varga a kol. [24]. Po částečné optimalizaci se zdá, že by mohla být vhodnou alternativou k metodě původní.

4.2.3.1. Postup

- 2 g namletého vzorku ječmene nebo sladu byly naváženy do vialky z čírého skla o objemu 40 ml
- do vialky bylo přidáno 20 ml roztoku 10 % KOH v methanolu
- vialka byla uzavřena plastovým víčkem s PTFE septem a řádně protřepána
- vialka byla inkubována 30 minut na vodní lázni o teplotě 60 °C
- po ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 5 ml deionizované vody a 10 ml hexanu
- směs ve vialce byla intenzivně protřepávána po dobu jedné minuty
- horní hexanová vrstva byla opatrně odebrána Pasteurovou pipetou a přenesena do odpařovací baňky o objemu 50 ml
- vytřepávání do 10 ml hexanu bylo provedeno ještě dvakrát
- spojené hexanové frakce v odpařovací baňce byly vysušeny na vakuové odparce při teplotě 55 °C

- odparek byl rozpuštěn postupně ve dvakrát 2 ml methanolu a převeden do tmavé vialky o objemu 4 ml

4.2.3.2. *Optimalizace nového postupu – snížení počtu extrakcí do hexanu*

V rámci testování této nové metody byly vyzkoušeny některé změny oproti postupu. První změnou bylo snížení počtu extrakcí do hexanu vytřepáváním z původních tří na dvě. Byly testovány vždy dva vzorky od jedné odrůdy, z nichž jeden byl „ospikován“ přídavkem 20 µg standardu ergosterolu.

Tab. č. 4: Srovnání výsledků při provedení dvou a tří třepání do hexanu

počet extrakcí	vzorek (oblast – odrůda)	c (mg/kg)	výtěžnost (%)
3	Branišovice – Tolar	9,71	106,1
2	Lednice – Sebastian	9,58	119,9

Oproti výsledkům získaným původní metodou jsou výsledné obsahy ergosterolu velmi nízké (u odrůdy Tolar z Branišovic byla naměřena hodnota 12,01 mg/kg a u odrůdy Sebastian z Lednice 12,64 mg/kg). Hodnoty výtěžnosti jsou však vysoké, a to zejména u vzorku, který byl extrahován pouze dvakrát. To by ukazovalo na to, že k největším ztrátám dochází při izolaci ergosterolu ze vzorku, pravděpodobně při saponifikaci. Na vině by mohla být nízká teplota při procesu saponifikace.

4.2.3.3. *Použití čerstvě namletého ječmene*

Stejným postupem, ale opět se třemi extrakcemi do hexanu, byly testovány dva vzorky použité při posledním stanovení. V tomto případě však byl ječmen před extrakcí čerstvě pomlet.

Tab. č. 5: Výsledky stanovení u čerstvě namletého ječmene

vzorek (oblast – odrůda)	c (mg/kg)
Branišovice – Tolar	11,67
Lednice – Sebastian	10,41

Tento test prokázal, že existuje souvislost mezi stářím namletého vzorku a obsahem ergosterolu, protože u obou testovaných vzorků z čerstvě pomletého ječmene vzrostly výsledky oproti výsledkům získaným stejnou metodou (viz. předchozí kapitola). U vzorku odrůdy Sebastian z pokusné stanice Lednice však nelze tento rozdíl jednoznačně potvrdit, protože byly provedeny pouze dvě extrakce do hexanu.

4.2.3.4. *Optimalizace nového postupu – zvýšení teploty inkubace na vodní lázni*

Další změnou oproti postupu bylo použití vyšší teploty pro inkubaci směsi vzorku a roztoku 10 % KOH v methanolu, a to 80 °C.

Tab. č. 6: Výsledky za zvýšené teploty inkubace

vzorek (oblast – odrůda)	c (mg/kg)
Branišovice – Tolar	13,31
Lednice – Sebastian	11,76

Získané hodnoty obsahu ergosterolu jsou v porovnání s výsledky se stejnou metodou, ovšem při inkubaci pouze na 60 °C, poměrně výrazně vyšší, což potvrzuje předpoklad, že při vyšší teplotě probíhá saponifikace v roztoku 10 % KOH v methanolu účinněji. V porovnání s výsledky získanými při extrakci původní metodou je hodnota obsahu ergosterolu u vzorku odrůdy Tolar z pokusné stanice Branišovice o něco vyšší a naopak u vzorku odrůdy Sebastian z pokusné stanice Lednice nižší. Rozdíly se však pohybují v obou případech kolem 10 %, což nepředstavuje nijak zásadní rozdíl a je možné je přičítat nehomogenitě vzorku. Tato metoda vyžaduje ještě další testování a získání většího objemu dat, ale osobně si myslím, že se jedná o metodu, u které se dá předpokládat uplatnění i do budoucna.

4.2.4. Extrakce do diethyletheru

Zvolený postup vychází z postupu pro stanovení vitamínu E a karotenoidů (luteinu a β -karotenu) v ječmeni a sladu. Jelikož se stejně jako v případě ergosterolu jedná o látky rozpustné v tucích, dalo by se uvažovat o použití této metody pro stanovení jak vitamínu E a karotenoidů, tak současně ergosterolu.

4.2.4.1. Postup

- do odpařovací baňky na 250 ml byly naváženy 2 g vzorku
- bylo přidáno 50 ml ethanolu (do dvou baněk, do dalších dvou směs ethanolu a methanolu) a směs byla důkladně promíchána
- vzorek se nechal lehce nabobtnat a poté bylo přidáno 10 ml 50% KOH a na špičku nože kyseliny askorbové
- směs byla opět promíchána, do baňky byl napuštěn dusík a byla ponechána přes noc na tmavém místě
- směs se vzorkem byla přelita do dělicí baňky, bylo přidáno 80 ml deionizované vody a 50 ml diethyletheru
- po protřepání a rozdělení fází byla spodní frakce přepuštěna do odpařovací baňky a horní čistá frakce byla přepuštěna do čisté děličky
- spodní frakce byla přelita do děličky a vytřepána s dalšími 50 ml diethyletheru
- čisté frakce byly spojeny a promyty v děličce dvakrát 80 ml vody
- extrakt byl přelit do Erlenmayerovy baňky a byly přidány dvě lžice bezvodého síranu sodného
- dále byl extrakt převeden do suché odpařovací baňky a odpařen na vakuové odparce při teplotě 45 °C
- odparek byl rozpuštěn ve dvakrát 2 ml methanolu a převeden do tmavé vialky (4 ml)

4.2.4.2. Výsledky

Jak je patrné z následující tabulky a po porovnání z hodnotou obsahu ergosterolu stanoveném pro stejnou odrůdu původní metodou, která činila 8,76 mg/kg, tak výsledek stanovení po extrakce která byla prováděna do směsi ethanol – methanol naprosto neodpovídá původně zjištěné hodnotě a i výtěžnost je v tomto případě velmi nízká. Co se týče druhého vzorku, který byl extrahován pouze do ethanolu, tam se zjištěná hodnota obsahu ergosterolu blíží původně naměřené hodnotě a i výtěžnost dosahuje poměrně akceptovatelné hodnoty. Dalším testováním této metody a případným vylepšením postupu by se tedy teoreticky mohlo v budoucnu dosáhnout uspokojivých výsledků. Na druhou stranu je však třeba dodat, že se jedná o metodu poměrně dosti složitou a časově náročnou a pro samostatné stanovení ergosterolu nepříliš vhodnou. Pro současné stanovení ergosterolu, vitamínu E a karotenoidů ze stejných vzorků by však po určité optimalizaci mohla být tato metoda vhodná.

Tab. č. 7: Výsledky stanovení po vytřepání do diethyletheru

	vzorek (oblast – odrůda)	c (mg/kg)	výtěžnost (%)
EtOH	Lednice - Bojos	8,20	75,7
EtOH/MeOH		5,77	49,3

4.3. Stanovení ergosterolu ve sladu

Obsah ergosterolu ve sladu byl testován zjednodušenou metodou, tedy inkubování vzorku s roztokem 10 % KOH v methanolu po dobu 30 minut na 60 °C a poté vytřepávání třikrát do hexanu.

Tab. č. 8: Srovnání výsledků u stejných odrůd ječmene a sladu

	vzorek (oblast – odrůda)	c (mg/kg)	
slad	Branišovice – Tolar	11,71	
	Lednice – Sebastian	10,40	nárůst (%)
ječmen	Branišovice – Tolar	15,67	33,8
	Lednice – Sebastian	15,19	46,1

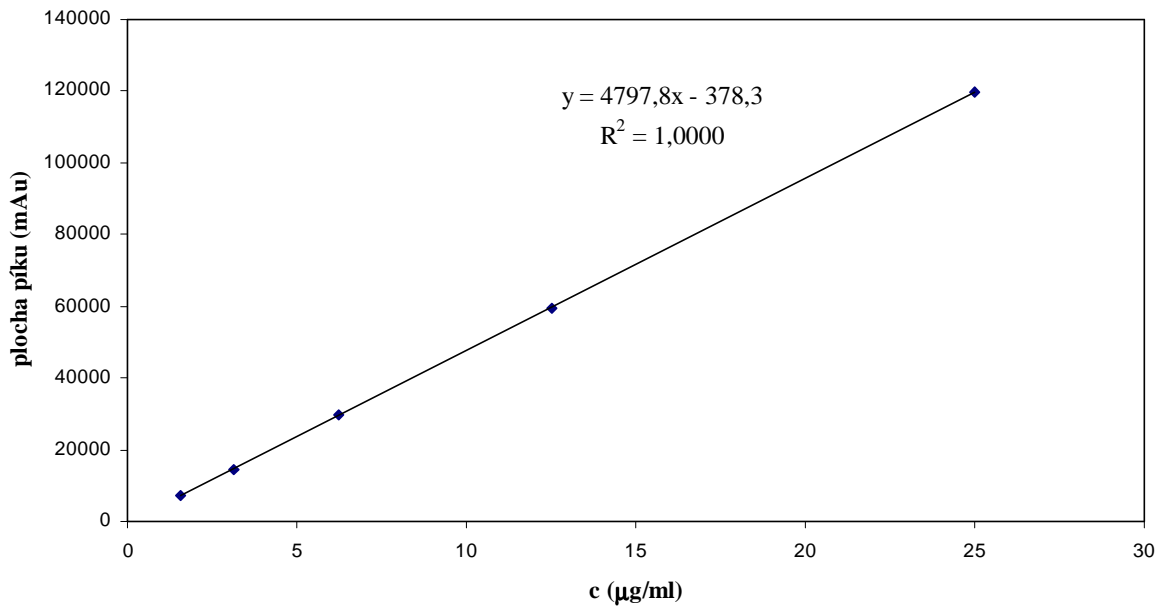
V tabulce jsou spolu porovnány hodnoty obsahu ergosterolu ve dvou odrůdách ječmene a z nich připravených sladů, stanovovaných stejnou metodou v čerstvě namletých vzorcích. Evidentní nárůst obsahu ergosterolu u sladů oproti ječmenům, ze kterých byly tyto slady připraveny je patrně způsoben oslabením obalových vrstev ječmene během sladování a tedy vyšší náchylností zrna k infekci plísněmi.

4.4. Stanovení ergosterolu na HPLC

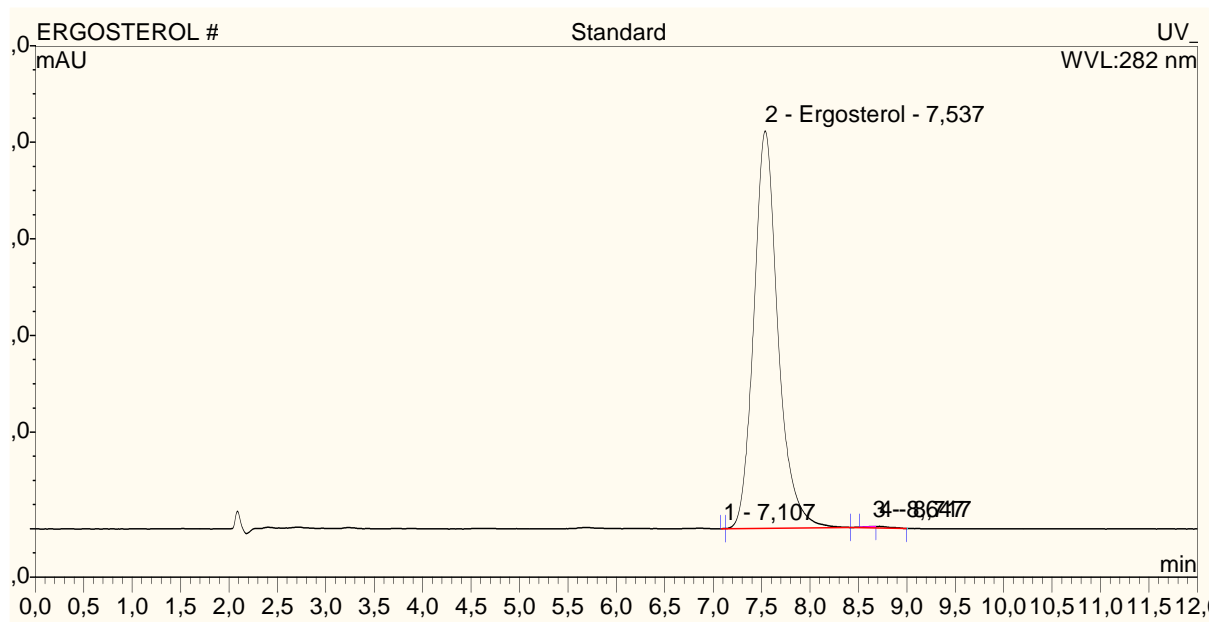
4.4.1. Kalibrace

Podle postupu popsaného v experimentální části byla sestavena kalibrační křivka a při výpočtech obsahu ergosterolu se vycházelo z rovnice regrese této kalibrační křivky.

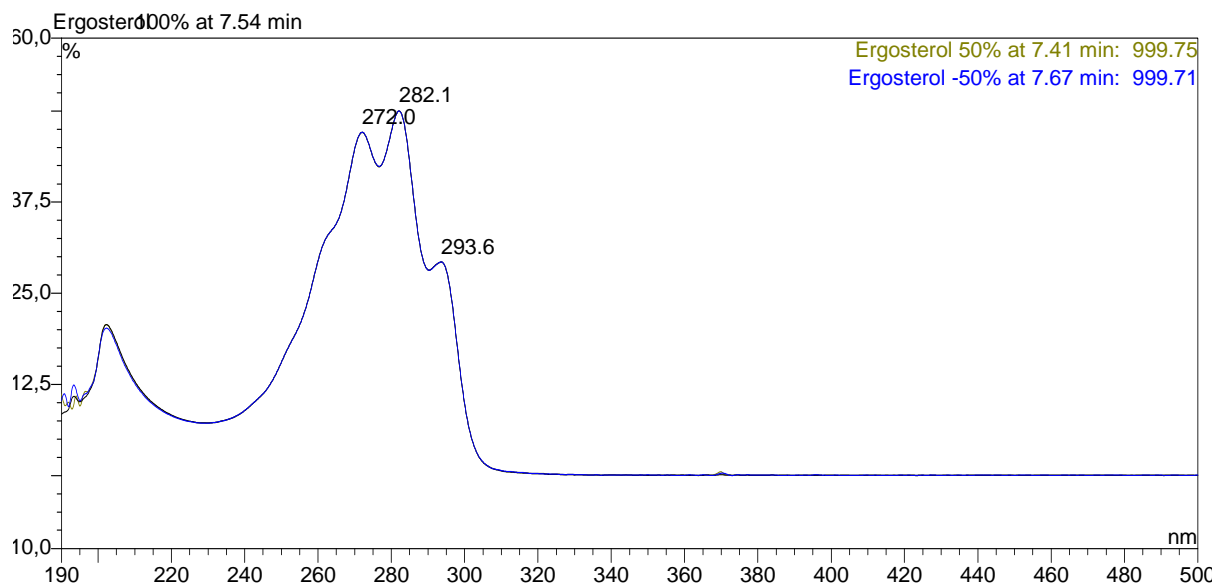
Kalibrační křivka



Obr. č. 6: Kalibrační křivka ergosterolu



Obr. č. 7: Chromatogram standardu 25 µg/ml



Obr. č. 8: Absorpční spektrum standardu 25 µg/ml

Na obrázku č. 6 je zobrazen chromatogram standardu ergosterolu o koncentraci 25 µg/ml a na obrázku č. 7 absorpční spektrum píku ergosterolu z tohoto chromatogramu. Porovnáním spekter píků z reálných vzorků a retenčních časů s tímto spektrem a retenčním časem píku ze stanovení standardu ergosterolu byly identifikovány píky ergosterolu v reálných vzorcích.

4.4.2. Výpočet koncentrace ergosterolu ve vzorku

Z rovnice regrese kalibrační křivky $y = a \cdot x + b$, kde a a b jsou koeficienty rovnice, y je odezva signálu (A) vypočítáme x , koncentraci vzorku stanovovaného na kapalinovém chromatografu (c):

$$c = \frac{A - b}{a} \text{ [}\mu\text{g/ml]} .$$

Tuto koncentraci poté přepočítáme na hmotnostní zlomek vyjadřující obsah ergosterolu v miligramech na kilogram původního vzorku (w):

$$w = c \cdot \frac{V_{odp}}{m_{vz}} \text{ [mg/kg]} ,$$

kde V_{odp} je objem znovu rozpuštěného odparku po extrakci (4 ml) a m_{vz} je původní navážka vzorku.

4.4.3. Optimalizace metody

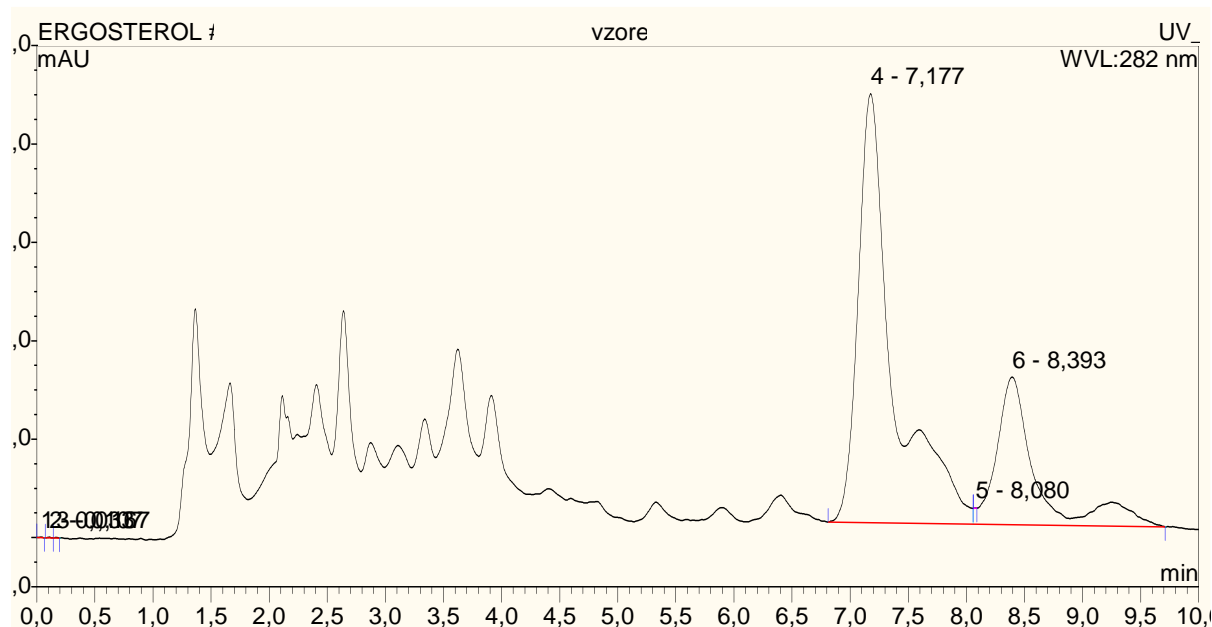
Jelikož je extrakce prováděna z přírodního materiálu, obsahuje vyextrahovaný vzorek stanovovaný na kapalinové chromatografii i velké množství jiných látek, než pouze ergosterol. Pro získání přesných výsledků je tedy nutné provést optimalizaci

chromatografických podmínek tak, aby píku ergosterolu byly úplně odděleny od píků dalších látek a zároveň, aby retenční čas byl pokud možno co nejkratší.

4.4.3.1. *Optimalizace mobilní fáze*

Chromatografické podmínky:

- Mobilní fáze: 10 % acetonitril, 90 % methanol, isokratická eluce
- Průtok: 1 ml/min
- Nástřik: 20 μ l
- Teplota: 35 °C
- Detekce: 282 nm
- Čas analýzy: 12 minut

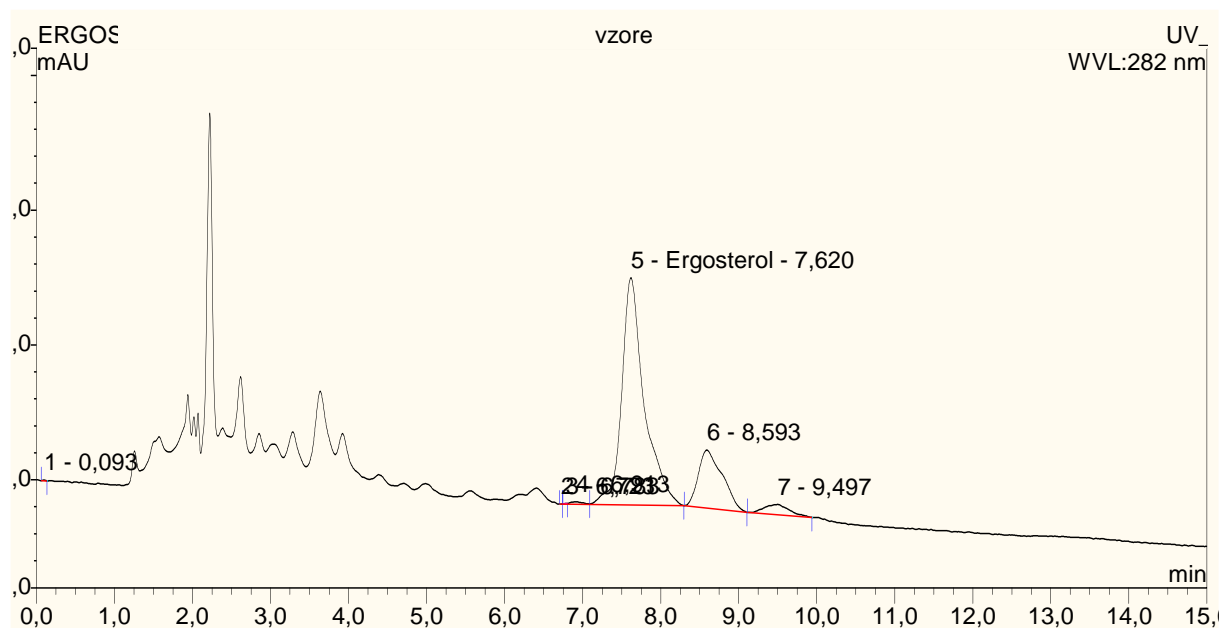


Obr. č. 9: Chromatogram vzorku za výše uvedených podmínek

Píku ergosterolu (č. 4) není zcela oddělen. Tyto podmínky tedy nejsou pro stanovení ergosterolu vhodné.

Chromatografické podmínky:

- Mobilní fáze: 20 % acetonitril, 80 % methanol, isokratická eluce
- Průtok: 1 ml/min
- Nástřik: 20 μ l
- Teplota: 35 °C
- Detekce: 282 nm
- Čas analýzy: 12 minut



Obr. č. 10: Chromatogram vzorku za výše uvedených podmínek

Pík č. 5, ergosterol je dobře oddělen od píku č. 6. Tyto chromatografické podmínky jsou tedy vhodné a byly pro stanovení ergosterolu dále používány.

4.4.4. Použití kolony s pevným jádrem

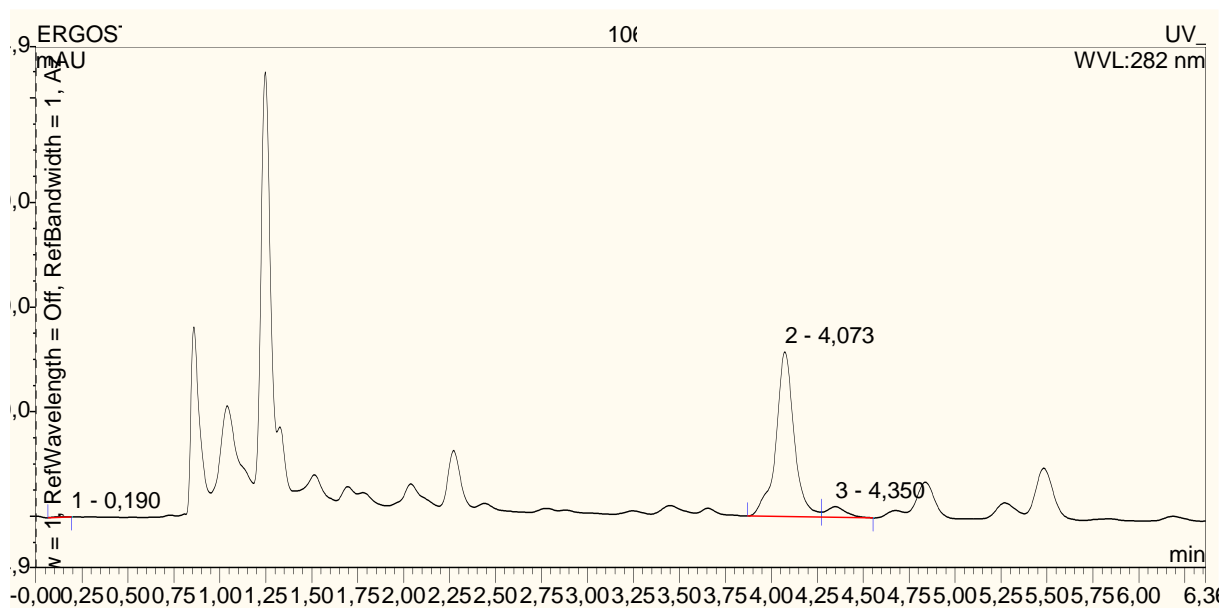
Do budoucna se plánuje využívat pro stanovování ergosterolu (i pro jiná stanovení) kolonu s pevným jádrem Ascentis express C18 (s pevným jádrem), 150 x 3 mm, 2,7 μ m. Prozatím byla otestována na několika vzorcích, při rozdílných chromatografických podmínkách.

Částice, kterými jsou plněny kolony s pevným jádrem, jsou rozdílné od částic v běžných kolonách, které jsou celé porézní, složeny z pevného jádra ze silikagelu, obklopeného homogenním porézním obalem. Díky částečné porositě těchto částic se dochází ke snížení axiální disperse analytu a výsledkem jsou štíhlejší píky a podstatné zkrácení analýzy [41].

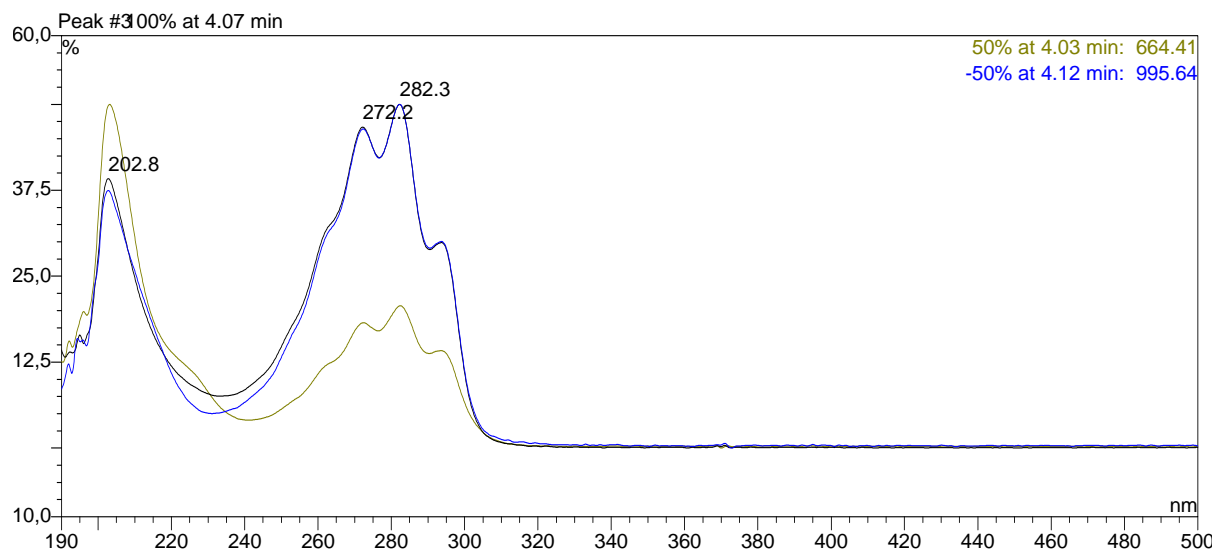
4.4.4.1. Optimalizace mobilní fáze

Chromatografické podmínky:

- Mobilní fáze: 30 % acetonitril, 70 % methanol, isokratická eluce
- Průtok: 0,75 ml/min
- Nástřik: 10 μ l
- Teplota: 35 °C
- Detekce: 282 nm
- Čas analýzy: 8 minut



Obr. č. 11: Chromatogram vzorku za použití kolony s pevným jádrem za výše uvedených podmínek

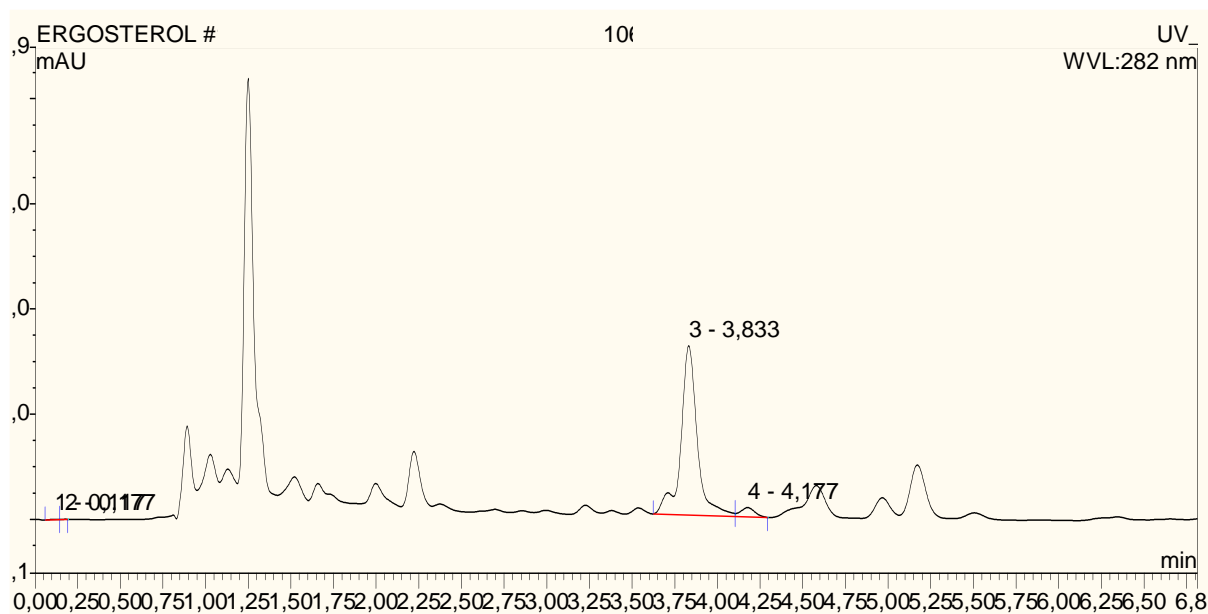


Obr. č. 12: Absorpční spektrum vzorku za použití kolony s pevným jádrem za výše uvedených podmínek

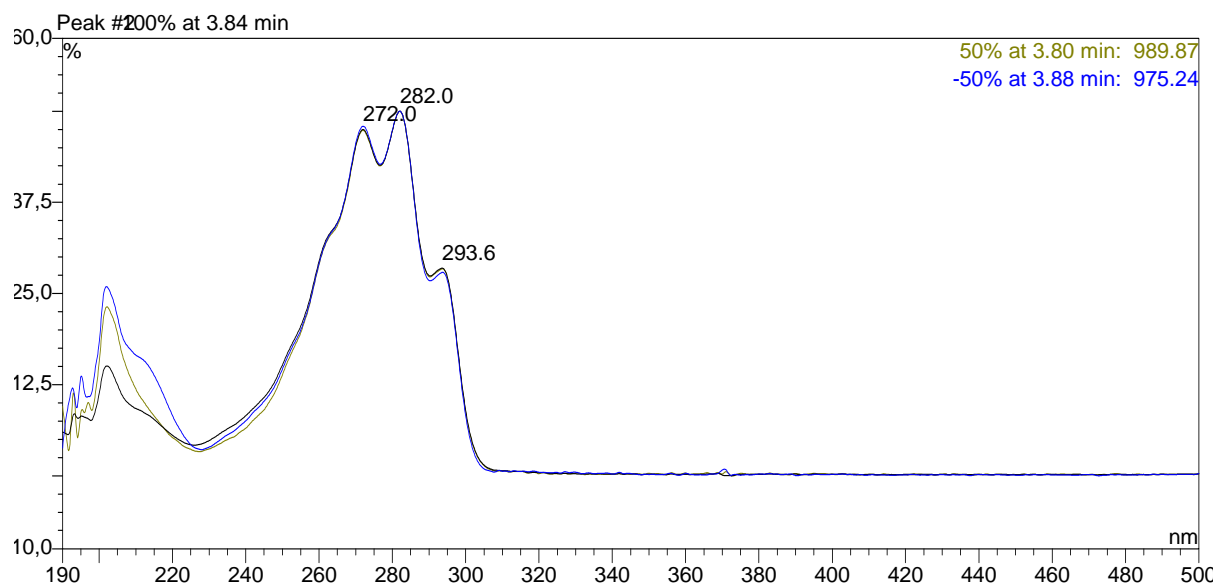
Jak je patrné z chromatogramu i ze spektra, tyto podmínky nejsou pro stanovení vhodné. Pík ergosterolu (č. 2) není zcela oddělen od píku č. 3.

Chromatografické podmínky:

- Mobilní fáze: 20 % acetonitril, 80 % methanol, isokratická eluce
- Průtok: 0,75 ml/min
- Nástřik: 10 μ l
- Teplota: 35 °C
- Detekce: 282 nm
- Čas analýzy: 8 minut



Obr. č. 13: Chromatogram vzorku za použití kolony s pevným jádrem za výše uvedených podmínek



Obr. č. 14: Absorpční spektrum vzorku za použití kolony s pevným jádrem za výše zmíněných podmínek

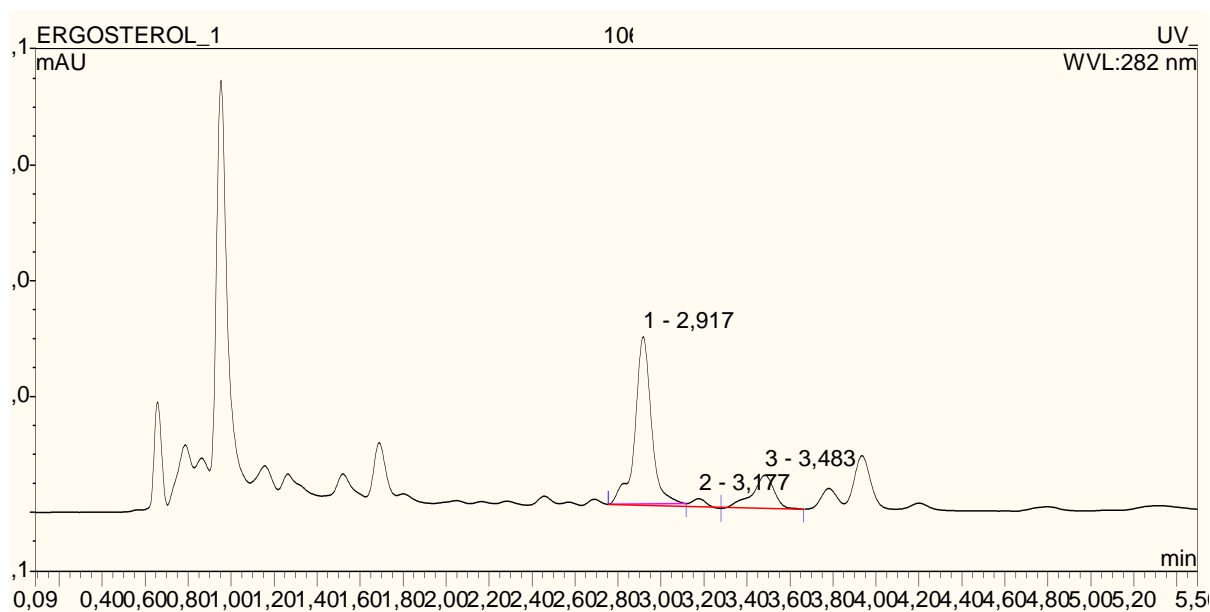
Podle spektra se zdá, že by se mohlo jednat o vhodné chromatografické podmínky. Tento závěr by však bylo třeba potvrdit ještě dalšími měřeními.

4.4.4.2. Optimalizace průtoku

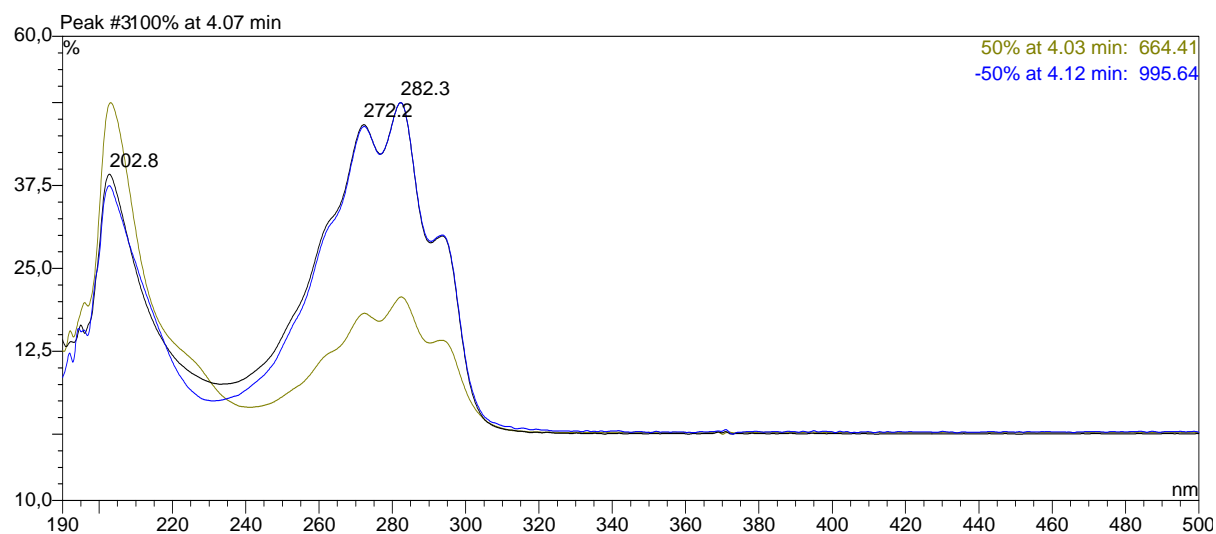
Chromatografické podmínky:

- Mobilní fáze: 20 % acetonitril, 80 % methanol, isokratická eluce
- Průtok: 1 ml/min
- Nástřik: 10 μ l

- Teplota: 35 °C
- Detekce: 282 nm
- Čas analýzy: 8 minut



Obr. č. 15: Chromatogram vzorku za použití kolony s pevným jádrem za výše uvedených podmínek



Obr. č. 16: Absorpční spektrum vzorku za použití kolony s pevným jádrem za výše uvedených podmínek

Pík ergosterolu (č. 1) není úplně oddělen od píku č. 2 a i podle absorpčního spektra je zřejmé, že v tomto čase nevystupuje pouze čistý ergosterol.

5 ZÁVĚR

Na základě studií vydaných na dané téma odbornými časopisy byla vypracována literární rešerše, jejímž cílem je přinést ucelený pohled na problematiku stanovení ergosterolu zejména v pivovarských surovinách. Byly popsány důvody stanovování ergosterolu v pivovarských surovinách, dále byl vytvořen přehled používaných způsobů extrakcí i možnosti identifikace a kvantifikace ergosterolu chromatografickými metodami. V experimentální části bylo cílem vytvořit vhodný metodický postup pro stanovování ergosterolu v pivovarských surovinách v podmínkách laboratoře Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Brně. Možnosti různých způsobů a variant stanovení ergosterolu jsou však natolik široké, že je možné v hledání optimální metody i nadále pokračovat například v rámci navazující diplomové práce.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Šárka, B., Ferenčík, M.: *Biochémiá*. 2. vyd. Bratislava: Alfa 1987. 744 s.
- [2] Perkowski, J., Busko, M., Stuper, K., Kostecki, M., Matysiak, A., Sz wajkowska-Michalek, L.: Concentration of ergosterol in small-grained naturally contaminated and inoculated cereals, *Biologia*, 2008, vol. 63, no. 3, pp. 542-547. ISSN 0006-3088.
- [3] Gawrysiak-Witulska, M., Wawrzyniak, J., Ryniecki, A., Perkowski, J.: Relationship of ergosterol content and fungal contamination and assessment of technological quality of malting barley preserved in a metal silo using the near-ambient method, *Journal of stored products research*, 2008, vol. 44, no. 4, pp. 360-365. ISSN 0022-474X.
- [4] Kaderová, I., Dohnal, V., Skládanka, J.: Ergosterol jako marker fungálního napadení píce. 8. vedecká konferencia doktorandov a mladých vedeckých pracovníkov, Nitra, 18.-19.4.2007 (SK)
- [5] Olson, J., Borjesson, T., Lundstedt, T., Schnurer, J.: Detection and quantification of ochratoxin A and deoxynivalenol in barley grains by GC-MS and electronic nose, *International journal of food and microbiology*, 2002, vol. 72, no. 3, pp. 203-214. ISSN 0168-1605.
- [6] Perkowski, J., Miedaner, J., Geiger, H. H., Muller, H. M., Chelkowski, J.: Occurrence of deoxynivalenol (DON), 3-acetyl-DON, zearalenone and ergosterol in winter rye inoculated with *Fusarium culmorum*, *Cereal chemistry*, 1995, vol. 72, no. 2, pp. 205-209. ISSN 0009-0352.
- [7] Boley, A. and Müller, H. M., Production of ochratoxin A, citrinin and ergosterol by *Penicillium viridicatum* in autoclaved and non-autoclaved wheat at low temperature. *Mycotoxin Research* 2, 1986, pp. 99–103.
- [8] Ježková, A., Karasová, J., Dohnal, V., Polišínská, I.: Vývoj metodiky extrakce na tuhé fázi a HPLC-MS pro stanovení deoxynivalenolu v ječmeni a sladu, *Chemické listy*, 2009, roč. 103, s. 679-683.
- [9] Dohnal, V., Ježková, A., Pavlíková, L., Musílek, K., Jun, D., Kuča, K.: Fluctuation in the ergosterol and deoxynivalenol content in barley and malt during malting process, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, vol. 397, no. 1, pp. 109-114. ISSN 1618-2642.
- [10] Jedličková, L., Gadas, D., Havlová, P., Havel, J.: Determination of ergosterol levels in barley and malt varieties in the Czech Republic via HPLC, *Journal of agricultural and food chemistry*, 2008, vol. 56, no. 11, pp. 4092-4095. ISSN 0021-8561.

- [11] Schwarz, P. B., Bettie, S., Casper, H. H.: Relationship between Fusarium infestation of barley and the gushing potential of malt, *Journal of the institute of brewing*, 1996, vol. 102, no. 2, pp. 93-96. ISSN 0046-9750.
- [12] Sarlin, T., Nakari-Setälä, T., Linder, M., Penttilä, M., Haikara, A.: Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of malt, *Journal of the institute of brewing*, 2005, vol. 111, no. 2, pp. 105-111. ISSN 0046-9750.
- [13] Seitz, L. M., Mohr, H. E., Burroughs, R., Sauer, D. B.: Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains, *Cereal chemistry*, 1977, vol. 54, no. 6, pp. 1207-1217. ISSN 0009-0352.
- [14] Lopez-Diaz, T. M., Flannigan, B.: Production of patulin and cytochalasin E by *Aspergillus clavatus* during malting of barley and wheat, *International journal of food microbiology*, 1997, vol. 35, no. 2, pp. 129-136. ISSN 0168-1605.
- [15] Magalhaes, P. J., Carvalho, D. O., Guido, L. F., Barros A. A.: Detection and quantification of provitamin D₂ and vitamin D₂ in hop (*Humulus lupulus* L.) by liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass Spectrometry, *Journal of agricultural and food chemistry*, 2007, vol. 52, no. 20, pp. 7995-8002. ISSN 0021-8561.
- [16] Anderson, P., Davidson, C. M., Littlejohn, D., Ure, A. M., Shand, A. M., Cheshire, M. V.: Extraction of ergosterol from peaty soils and determination by high performance liquid chromatography, *Talanta*, 1994, vol. 41, no. 5, pp. 711-720. ISSN 0039-9140.
- [17] Abramson, D., Smith, D. M.: Determination of ergosterol in canola (*Brassica napus* L.) by liquid chromatography, *Journal of stored products research*, 2002, vol. 39, no. 2, pp. 185-191. ISSN 0022-474X.
- [18] Varga, M., Bartok, T., Mesterhazy, A.: Determination of ergosterol in Fusarium-infected wheat by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Journal of chromatography A*, 2006, vol. 1103, no. 2, pp. 278-283. ISSN 0021-9673.
- [19] Headley, J. V., Peru, K. M., Verma, B., Robarts, R. D.: Mass spectrometric determination of ergosterol in a prairie natural wetland, *Journal of chromatography A*, 2002, vol. 958, no. 1-2, pp. 149-156. ISSN 0021-9673.
- [20] Jambunathan, R., Kherdekar, M. S., Vaidya, P.: Ergosterol concentration in mold-susceptible and mold-resistant sorghum at different stages of grain development and its relationship to flavan-4-ols, *Journal of agricultural and food chemistry*, 1991, vol. 39, no. 10, pp. 1866-1870. ISSN 0021-8561.
- [21] Gessner, M. O., Schmitt, A. L.: Use of solid-phase extraction to determine ergosterol concentrations in plant tissue colonized by fungi, *Applied and environmental microbiology*, 1996, vol. 62, no. 2, pp. 415-419. ISSN 0099-2240.

- [22] Srzednicki, G., Craske, J., Nimmuntavin, C., Mantais, L. G., Wattananon, S.: Determination of ergosterol in paddy rice using solid phase extraction, *Journal of agricultural and food chemistry*, 2004, vol. 84, no. 15, pp. 2041-2046. ISSN 0022-5142.
- [23] Abramson, D., Ganb, Z., Clearc, R. M., Gilberta, J., Marquardt, R. R.: Relationships among deoxynivalenol, ergosterol and *Fusarium* exoantigens in Canadian hard and soft wheat, *International journal of food microbiology*, 1998, vol. 45, no. 3, pp. 217-224. ISSN 0168-1605.
- [24] Young, J. C.: Microwave-assisted extraction of the fungal metabolite ergosterol and total fatty acids, *Journal of agricultural and food chemistry*, 1995, vol. 43, no. 11, pp. 2904-2910. ISSN 0021-8561.
- [25] Young, J. C., Games, D. E.: Supercritical fluid extraction and supercritical fluid chromatography of the fungal metabolite ergosterol, *Journal of agricultural and food chemistry*, 1993, vol. 41, no. 4, pp. 577-581. ISSN 0021-8561.
- [26] Superkritické kapaliny [online]. 2008 [cit. 24.4.2010]. Dostupný z WWW: <http://is.muni.cz/th/77987/prif_m/superkriticke_kapaliny.pdf>.
- [27] Dong, Y. H., Steffenson, B. J., Mirocha, C. J.: Analysis of ergosterol in single kernel and ground grain by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of agricultural and food chemistry*, 2006, vol. 54, no. 12, pp. 4121-4125. ISSN 0021-8561.
- [28] Nielsen, K. F., Madsen, J. O.: Determination of ergosterol on mouldy building materials using isotope dilution and gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of chromatography A*, 2000, vol. 898, no. 2, pp. 227-234. ISSN 0021-9673.
- [29] Plynová chromatografie [online]. 1.4.2004 [cit. 12.5.2010]. Dostupný z WWW: <fzp.ujep.cz/ktv/uc_texty/inan/inan_9.doc>.
- [30] Plynová chromatografie (GC) [online]. [cit. 12.5.2010]. Dostupný z WWW: <<http://www.chemi.muni.cz/~literak/uvod.pdf>>.
- [31] Laboratoř experimentální medicíny: Hmotnostní spektrometrie [online]. [cit. 12.5.2010]. Dostupný z WWW: <<http://lem.ocol.cz/cs/info/hmotnostni-spektrometrie>>.
- [32] Balíková, M.: Plynová chromatografie aplikace v toxikologii [online]. 1.12.2005. [cit. 12.5.2010]. Dostupný z WWW: <<http://www.lf1.cuni.cz/Data/files/Toxikologie/GC%20aplikace%20v%20toxikologii.ppt>>.
- [33] Larsen, T., Axelsen, J., Ravn, H. W.: Simplified and rapid method for extraction of ergosterol from natural samples and detection with quantitative and semi-quantitative methods using thin-layer chromatography, *Journal of chromatography A*, 2004, vol. 1026, no. 1-2, pp. 301-304. ISSN 0021-9673.

[34] Saxena, J., Munimbazi, C., Bullerman, L. B.: Relationship of mould count, ergosterol and ochratoxin A production, *International journal of food microbiology*, 2001, vol. 71, no. 1, pp. 29-34. ISSN 0168-1605.

[35] Chromatografie [online]. 13.10.2004 [cit. 12.5.2010]. Dostupný z WWW: <old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc>.

[36] Kapalinová chromatografie [online]. 1.4.2004 [cit. 15.5.2010]. Dostupný z WWW: <fzp.ujep.cz/ktv/uc_texty/inan/inan_8.doc>.

[37] High Performance Liquid Chromatography, HPLC [online]. 27.6.2006 [cit. 15.5.2010]. Dostupný z WWW: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>.

[38] UV/VIS HPLC detektory [online]. 17.8.2007 [cit. 15.5.2010]. Dostupný z WWW: <http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html>.

[39] Metoda kalibrační křivky [online]. 7.4.2007 [cit. 16.5.2010]. Dostupný z WWW: <fzp.ujep.cz/~synek/analytika/texty/8Kalibrace.doc>.

[40] Horáková, V., Dvořáčková, O., Mezlík, T.,: Odrůdy 2009. 1. vyd.: Ústřední kontrolní a zkušební úřad zemědělský Brno, 2009. 216 s. ISBN 978-80-7401-016-3

[41] Atlas chorob [online]. 2006 [cit. 19.5.2010]. Dostupný z WWW: <http://syngenta.cz/cz/atlas/choroby/>.

[42] Ascentis Express HPLC Columns with Fused-Core Technology. 2008 Sigma-Aldrich Co.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

HPLC.....	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
GC.....	plynová chromatografie
TLC.....	chromatografie na tenké vrstvě
LLC.....	rozdělovací chromatografie
GPC.....	gelová permeační chromatografie
LSC.....	adsorpční chromatografie
IEC.....	iontově výměnná chromatografie
MS.....	hmotnostní spektrometrie
DAD.....	detekce diodovým polem
SPE.....	extrakce na tuhé fázi
LLE.....	extrakce kapalina-kapalina
PLE.....	extrakce urychleným tokem
SFE.....	superkritická fluidní extrakce
Pc.....	kritický tlak
Tc.....	kritická teplota
OTA.....	ochratoxin A
DON.....	deoxynivalenol