

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Vliv přípravy vzorku na elektrochemické stanovení ergosterolu s využitím
vybraných elektrod
Diplomová práce

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Effect of sample preparation on the electrochemical determination of
ergosterol using selected electrodes

Master thesis

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Pavlína Strnadová**
Osobní číslo: **C21463**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Vliv přípravy vzorku na elektrochemické stanovení ergosterolu s využitím vybraných elektrod**
Téma práce anglicky: **Effect Of Sample Preparation On The Electrochemical Determination Of Ergosterol Using Selected Electrodes**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Stručně popsat ergosterol (struktura, funkce) a možnosti elektrochemického stanovení.
2. Popsat možnosti přípravy vzorku pro elektrochemické stanovení ergosterolu. Zaměřit se na extrakční techniky, používaná rozpouštědla, podmínky extrakce s ohledem na dosažení nejvyšší účinnosti.
3. Uvést konkrétní příklady z dostupné literatury se zaměřením na potenciální kontaminaci potravin.

Experimentální část:

1. Testování vybraných elektrod pro elektrochemické stanovení ergosterolu pomocí square-wave voltametrie (s využitím standardu). Pro stanovení otestovat běžné elektrody – GCE, BDDE, pastové elektrody s přídavkem tenzidů, tištěné BDDE elektrody.
2. Ověřit možné způsoby extrakce ergosterolu. V prvních experimentech se standardem ergosterolu, určit výtěžnost metody. Nejúčinnější metodu využít pro analýzu reálných vzorků. Optimalizovat minimální množství vzorku potřebné pro analýzu se zachováním dostatečné citlivosti.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Recentní odborná literatura dostupná v databázích WoS, Medline, Scencedirect. Odborné monografie a další dle pokynů vedoucí diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **MSc. Gylxhane Kastrati**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem „Vliv přípravy vzorku na elektrochemické stanovení ergosterolu s využitím vybraných elektrod“ jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 5. 5. 2023

Bc. Pavlína Strnadová

Poděkování

Děkuji za odborné vedení při zpracování diplomové práce paní docentce RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. a konzultantce MSc. Gylxhane Kastrati. Děkuji Ing. Ivetě Brožkové za mikrobiologické vzorky poskytnuté pro extrakce. Zároveň děkuji panu Ing. Milanu Sýsovi, Ph.D. za jeho rady a nedocenitelnou pomoc při práci s tenzidovými elektrodami. Děkuji za trpělivost a čas, který mi byl věnován, stejně tak jako za poskytnutou pomoc a konzultace při laboratorní práci a psaní diplomové práce.

Nakonec bych ráda poděkovala své rodině za jejich trpělivost a podporu.

Anotace

Cílem práce bylo elektrochemické stanovení ergosterolu a zavedení vhodné úpravy vzorku pro měření pomocí extrakce stanovované látky. V teoretické části jsou shrnuty obecné informace o ergosterolu, jeho funkce v souvislosti s vitamínem D a korelace jeho obsahu s přítomností některých mykotoxinů. V dalších kapitolách jsou popsány způsoby extrakce ergosterolu ze vzorku, z nichž vybrané byly následně využity v experimentální části práce. Dále jsou popsány vybrané typy elektrod, které byly použity pro detekci ergosterolu a porovnány. Praktická část je věnována optimalizaci některých podmínek elektrochemické detekce pro použité elektrody porovnání vybraných extrakčních postupů. Optimalizace a stanovení výtěžnosti extrakcí bylo provedeno s pomocí standardu ergosterolu. Extrakce s nejvyšší výtěžností byla použita pro stanovení reálných vzorků čistých plísní narostlých na médiu a uměle kontaminovaných vzorků potravin. V závěrečné části práce jsou popsány a diskutovány získané výsledky.

Klíčová slova

ergosterol, mykotoxiny, extrakce, square-wave voltametrie, tištěné elektrody, borem dopovaná diamantová elektroda, nevodné pastové elektrody, elektroda ze skelného uhlíku

Title

Effect of sample preparation on the electrochemical determination of ergosterol using selected electrodes

Annotation

The goal of the work was the electrochemical determination of ergosterol and the introduction of a suitable preparation of the sample for measurement using the extraction of the determined substance. The theoretical part summarizes general information about ergosterol, its function in connection with vitamin D and the correlation of its content with the presence of some mycotoxins. In other chapters there are descriptions of methods of extracting ergosterol from the sample, some of which were subsequently used in the experimental part of the work. In next chapters there are

descriptions and comparisons of selected types of electrodes that were used for the detection of ergosterol. The practical part is devoted to the optimization of some conditions of electrochemical detection for used electrodes and the comparison of selected extraction procedures. Optimization and determination of the extraction yield was carried out with the help of the ergosterol standard. The extraction with the highest yield was used for the determination of real samples of pure fungi grown on media and artificially contaminated food samples. In the final part of the thesis, the obtained results are described and discussed.

Keywords

ergosterol, mycotoxins, extraction, square-wave voltammetry, screen printed electrodes, boron doped diamond electrode, non-aqueous paste electrodes, glassy carbon electrode

Obsah

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....	12
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	15
Úvod.....	17
1 Ergosterol.....	18
1.1 Základní informace.....	18
1.2 Objev ergosterolu.....	18
1.3 Ergosterol jako prekurzor vitamínu D.....	19
1.4 Ergosterol u vyšších hub.....	20
1.4.1 Obsah ergosterolu v sušených houbách.....	21
1.4.2 Rozdíly mezi způsoby sušení.....	22
1.5 Ergosterol v plísních.....	23
1.6 Ergosterol a mykotoxiny.....	25
2 Metody extrakce ergosterolu.....	30
2.1 Extrakce.....	30
2.2 Saponifikace.....	31
2.3 Soxhletova extrakce.....	32
2.4 Extrakce kapalinou (LLE).....	33
2.4.1 Příklady extrakce ergosterolu kapalinou.....	33
2.5 Extrakce na pevné fázi (SPE).....	34
2.5.1 Molekulově imprintované polymery (MIP).....	35
2.6 Extrakce ultrazvukem.....	36
2.7 Superkritická fluidní extrakce (SFE) a tlaková extrakce (PLE).....	37
2.8 Mikrovlnná extrakce (MAE).....	38
3 Metody stanovení ergosterolu.....	39
3.1 Elektrochemické metody.....	39
3.2 Voltametrie.....	40
3.2.1 Cyklická voltametrie.....	40
3.2.2 Square-wave voltametrie (SWV).....	41
4 Typy pracovních elektrod.....	42
4.1 Elektroda ze skelného uhlíku (GCE).....	42
4.2 Borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE).....	42

4.3	Pastové elektrody.....	43
4.4	Tištěné elektrody.....	44
5	Experimentální část.....	46
5.1	Seznam použitých přístrojů, pomůcek, chemikálií a pracovních roztoků.....	46
5.1.1	<i>Chemikálie a roztoky.....</i>	<i>46</i>
5.1.2	<i>Použité přístroje a pomůcky.....</i>	<i>46</i>
5.1.3	<i>Příprava standardu.....</i>	<i>47</i>
5.1.4	<i>Použité elektrody.....</i>	<i>47</i>
5.2	Podmínky elektrochemické detekce.....	48
5.2.1	<i>Elektrochemické čištění (aktivace) cyklickou voltametrií.....</i>	<i>48</i>
5.2.2	<i>Příprava pastových elektrod.....</i>	<i>48</i>
5.2.3	<i>Elektrochemická detekce square-wave voltametrií.....</i>	<i>49</i>
5.3	Obecný postup extrakce.....	50
	<i>První extrakční postup.....</i>	<i>50</i>
	<i>Druhý extrakční postup.....</i>	<i>51</i>
	<i>Třetí extrakční postup.....</i>	<i>51</i>
	<i>Čtvrtý extrakční postup.....</i>	<i>51</i>
6	Výsledky a diskuze.....	55
6.1	Tištěné tříelektrodové senzory s borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou	56
6.1.1	<i>Optimalizace elektrolytu – příměs vody.....</i>	<i>59</i>
6.1.2	<i>Optimalizace elektrolytu – koncentrace chloristanu.....</i>	<i>60</i>
6.1.3	<i>Kalibrační křivka pro kvantifikaci ergosterolu s SP-BDDE Pt.....</i>	<i>61</i>
6.2	Nevodné pastové elektrody.....	63
6.2.1	<i>Optimalizace amplitudy pro nevodnou pastovou elektrodu.....</i>	<i>64</i>
6.2.2	<i>Optimalizace frekvence pulzu nevodné pastové elektrody.....</i>	<i>65</i>
6.2.3	<i>Kalibrační křivka pro kvantifikaci ergosterolu s nevodnou pastovou elektrodou</i>	<i>66</i>
6.3	Elektroda ze skelného uhlíku a borem dopovaná diamantová elektroda.....	68
6.3.1	<i>Kalibrační křivka pro kvantifikaci ergosterolu pomocí elektrody ze skelného uhlíku</i>	<i>69</i>
6.4	Proudová hustota.....	70
6.5	Výpočet LOD a LOQ.....	71
6.6	Extrakce ergosterolu.....	72
6.7	Stanovení ergosterolu v reálných vzorcích.....	73
	Závěr.....	76

Seznam použitých zdrojů.....	78
-------------------------------------	-----------

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1: Strukturní vzorec ergosterolu.....	18
Obrázek 2: Přeměna ergosterolu na aktivní formu vitamínu D v houbách.....	20
Obrázek 3: Korelace mezi obsahem patulinu, ergosterolu a stupni rozkladu jablek.....	24
Obrázek 4: Korelace mezi koncentrací ergosterolu a alternariolu (A) a kyseliny tenazuové (B)..	29
Obrázek 5: Grafické vyjádření průběhu konvenční a nekonvenční extrakce.....	31
Obrázek 6: Soxhletova extrakce 1. Ohřátí analytu, 2. Kondenzace analytu a naplnění soxhletovy komory, 3. Opakování extrakce, 4. Výsledný extrakt obsahující analyt.....	32
Obrázek 7: Schématické znázornění principu extrakce LLE.....	33
Obrázek 8: Obvyklé čtyři kroky SPE extrakce.....	35
Obrázek 9: Schématické znázornění tvorby molekulově imprintovaných polymerů.....	36
Obrázek 10: Výsledky získané při elektrochemickém a spektrofotometrickém stanovení ergosterolu ve třech odlišných houbových extraktech.).....	43
Obrázek 11: Teflonové tělo elektrody, třecí miska, zásobní lahvičky s olejem, uhlíkem a tenzidem.	49
Obrázek 12: Reálný vzorek <i>Fusarium tricinatum</i> , narostlý na kontaminovaném pečivu, který byl homogenizován v 10 ml 10 % KOH v methanolu a byl k němu přidán 1 ml deionizované vody a 5 ml hexanu.....	52
Obrázek 13: Reálný vzorek <i>Penicilium chrysogenum</i> , narostlý na kontaminovaném pečivu, který byl homogenizován v 10 ml 10 % KOH v methanolu a byl k němu přidán 1 ml deionizované vody a 5 ml hexanu.....	52
Obrázek 15: Reálný vzorek <i>Cladosporium herbarum</i> , narostlý na kontaminovaném pečivu, který byl homogenizován v 10 ml 10 % KOH v methanolu a byl k němu přidán 1 ml deionizované vody a 5 ml hexanu.....	53
Obrázek 14: Reálný vzorek <i>Mucor racemosus</i> narostlý na médiu, který byl homogenizován v 10 ml 10 % KOH v methanolu a byl k němu přidán 1 ml deionizované vody a 5 ml hexanu.....	53
Obrázek 16: Reálný vzorek <i>Aspergillus brasiliensis</i> narostlý na médiu, který byl homogenizován v 10 ml 10 % KOH v methanolu a byl k němu přidán 1 ml deionizované vody a 5 ml hexanu.....	54

Obrázek 17: SW-voltamogram standardu ergosterolu v rozmezí 1-100 μM koncentrace. .56	56
Obrázek 18: Kalibrační křivka závislosti proudové odezvy na koncentraci ergosterolu v roztoku.57	57
Obrázek 19: SW voltamogram pro optimalizaci frekvence.....58	58
Obrázek 20: SW voltamogram závislosti proudové odezvy na potenciálu při použití odlišných poměrů acetonitrilu s destilovanou vodou.....59	59
Obrázek 21: SW voltamogram pro koncentrace 0,05-0,5 M chloristanu lithného v 95 % acetonitrilu.....60	60
Obrázek 22: Kalibrační závislost mezi proudovou odezvou a koncentrací ergosterolu 0-1300 μM61	61
Obrázek 23: Kalibrační křivka závislosti proudové odezvy na koncentraci v rozmezí 0-500 μM koncentrace ergosterolu.....62	62
Obrázek 24: Určení optimální amplitudy pro nevodnou pastovou elektrodu.....64	64
Obrázek 25: Určení optimální frekvence pulzu pro nevodnou pastovou elektrodu.....65	65
Obrázek 26: SW voltamogram závislosti proudové odezvy na potenciálu pro standard ergosterolu v rozmezí koncentrací 1–100 μM . Měření pro nevodnou pastovou elektrodu.....66	66
Obrázek 27: Kalibrační křivka závislosti proudové odezvy na koncentraci ergosterolu pro nevodnou pastovou elektrodu.....67	67
Obrázek 28: SW voltamogram optimalizace frekvence.....68	68
Obrázek 29: Kalibrační závislost mezi koncentrací ergosterolu 0-600 μM a proudovou odezvou.69	69
Obrázek 30: Kalibrační závislost proudové hustoty a koncentrace ergosterolu 0-200 μM .70	70
Obrázek 31: Přehledový graf znázorňující jednotlivé výtěžnosti u všech čtyř vyzkoušených extrakcí s 2,1 mg a 2,3 mg standardního ergosterolu.....72	72
Obrázek 32: Sloupcový graf vyjadřující proudové odezvy jednotlivých elektrod u kultur narostlých na médiu, ze kterých byl ergosterol extrahován za pomoci čtvrtého extrakčního postupu. 73	73
Obrázek 33: Souhrnný graf proudových odezev pro jednotlivé elektrody u vzorků uměle kontaminovaného pečiva.....74	74

Tabulka 1: Přístroje a pomůcky použité v diplomové práci.....	45
Tabulka 2: Podmínky elektrochemické aktivace.....	47
Tabulka 3: Square-wave voltametrie – použité detekční podmínky.....	49
Tabulka 4: Porovnání pěti měření provedených pro neměněný a leštěný povrch elektrody.	62
Tabulka 5: Limit detekce a limit kvantifikace pro použité elektrody.....	70
Tabulka 6: Koncentrace ergosterolu u naočkovaného média, přepočítáno z rovnice kalibrační přímky pro elektrodu ze skelného uhlíku.....	73
Tabulka 7: Koncentrace ergosterolu pro kontaminované pečivo, přepočítáno z rovnice kalibrační přímky pro elektrodu ze skelného uhlíku.....	74

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	acetonitril
BDDE	Borem dopovaná diamantová elektroda (Boron doped diamond electrode)
BDDP	Borem dopovaný diamantový prášek (Boron doped diamond powder)
GC	Plynová chromatografie (Gas chromatography)
GCE	Elektroda ze skelného uhlíku (Glassy carbon electrode)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Pressure Liquid Chromatography)
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer)
J	Proudová hustota
LLE	Kapalina/kapalina extrakce (Liquid/liquid extraction)
LOD	Limit detekce (limit of detection)
LOQ	Limit kvantifikace (limit of quantification)
MAE	Mikrovlnná extrakce (Microwave assisted extraction)
OTA	Ochratoxin A (mykotoxin)
PLE	Tlaková kapalinová extrakce (Pressurized liquid extraction)
SDS	dodecylsulfát sodný (C12 tenzid)
SFE	Extrakce superkritickou kapalinou (Supercritical fluid extraction)
SMODCH	Směrodatná odchylka
SP-BDDE Pt	Tištěná borem dopovaná diamantová elektroda s referenční argentchloridovou a pomocnou diamantovou elektrodou
SP-BDDE Metrohm	Tištěná komerční borem dopovaná diamantová elektroda s uhlíkovou pomocnou elektrodou od Metrohm
SPE	Extrakce na pevné fázi (Solid phase extraction)
SWV	Voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím (Square wave voltametrie)
$t_{0,05}$	Stupeň volnosti pro 95%
UAE	Ultrazvuková extrakce (Ultrasound-assisted extraction)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

ZEA

Zearalenon

ÚVOD

Ergosterol je látka, která se primárně vyskytuje v buněčných stěnách hub a plísní. Jedná se o důležitý prekurzor vitamínu D, jehož nedostatek může působit velmi negativně na lidské tělo.

Vzhledem k tomu, že se ergosterol skoro výlučně nachází v plísních, je tuto látku možné využít jako ukazatel kontaminace potravin a ovzduší. Plísně působí negativně na kvalitu napadených produktů, ať už se jedná o barvu, vůni nebo strukturu. Zároveň mohou produkovat mykotoxiny, jako je například ochratoxin A, nebo aflatoxin B1. Tyto toxiny jsou nebezpečné pro zdraví člověka a jsou potenciální karcinogeny. Produkce ergosterol je v korelaci s produkcí toxinů a může tak sloužit jako včasný varovný ukazatel pro jejich přítomnost.

Diplomová práce je zaměřena na alternativní stanovení ergosterolu, který je v současnosti stanovován zejména pomocí chromatografických a spektrofotometrických metod. Zmíněné metody jsou ale relativně nákladné a vyžadují finančně náročné přístrojové vybavení. Možným nástupcem těchto metod by mohlo být elektrochemické stanovení, které je finančně dostupnější. Elektrochemické metody mají také relativně vysokou senzitivitu a nízký detekční limit. Tyto vlastnosti z nich činí efektivní nástroj pro praktický screening.

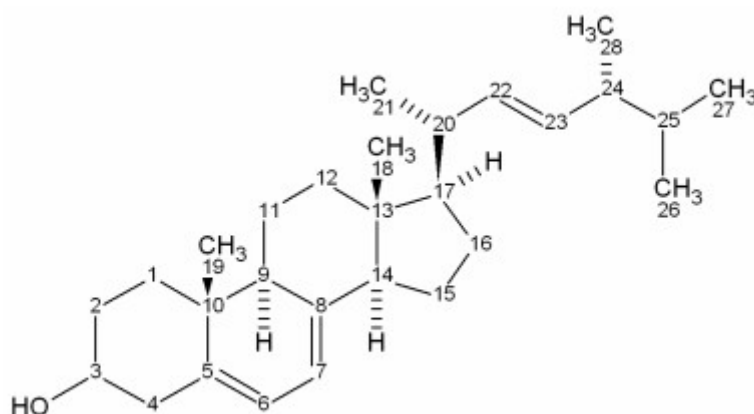
Cílem práce bylo vyzkoušet různé typy elektrod a jejich schopnost detegovat obsah ergosterolu v prostředí organického rozpouštědla. Zároveň byly otestovány vybrané extrakce a porovnána jejich výtěžnost a praktické využití u reálných vzorků.

1 ERGOSTEROL

1.1 Základní informace

Ergosterol se řadí mezi hlavní steroly produkované nižšími a vyššími houbami. Jedná se o látku, která je stavební jednotkou buněčných membrán hub (*Luchini et al., 2020*). Steroly určují v rámci buněčné membrány její permeabilitu, fluiditu a tuhost (*Guan et al., 2009; Nowak et al., 2022*).

Je to lipofilní bílá krystalická látka téměř nerozpustná ve vodě. Strukturně je velmi podobná cholesterolu (viz. *Obrázek 1*), který zastává podobné funkce jako ergosterol, ale v rámci buněčných membrán živočichů. Látky se liší přítomností methylové skupiny na uhlíku C-24 a dvojnými vazbami lokalizovanými mezi uhlíky 7-8 a uhlíky 22-23 (*Dohnal et al., 2008*).



Obrázek 1: Strukturní vzorec ergosterolu. Převzato z: (*Dohnal et al., 2008*).

1.2 Objev ergosterolu

Poprvé byl ergosterol vyizolován z paličkovice nachové, taktéž známé jako „námel“, která paraziticky roste na žitě. Izolace byla provedena Charlesem Tanretem v roce 1889. Název vychází z názvu nemoci „ergotismu“, kterou námel vyvolává u lidí po jeho pozření (*Dohnal et al., 2008; Grzybowski et al. 2021*). Při onemocnění (označovaném také jako oheň svatého Antonína) ve středověku, lidé, kteří konzumovali kontaminované obilí, přicházeli o prsty, údy a jiné části těla. Končetiny nejdříve zčernaly a posléze odpadly (*Gupta, 2019; Vandamme et al., 1989*).

Výskyt ergosterolu byl potvrzen ve kvasinkách a plísních. V sušině plísní najdeme koncentrace okolo 0,6 % a u kvasinek se obsah pohybuje v desetínách procent (*Vandamme et al., 1989*). Geneticky modifikované kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou v současnosti používány pro biosyntézu ergosterolu (*He, 2007*).

Membrány některých bakterií také obsahují ergosterol, nicméně velmi vzácně. Jeho výskyt v potravinách je tak možné spojovat téměř výhradně s kontaminací parazitickými houbami (*Dohnal et al., 2007*).

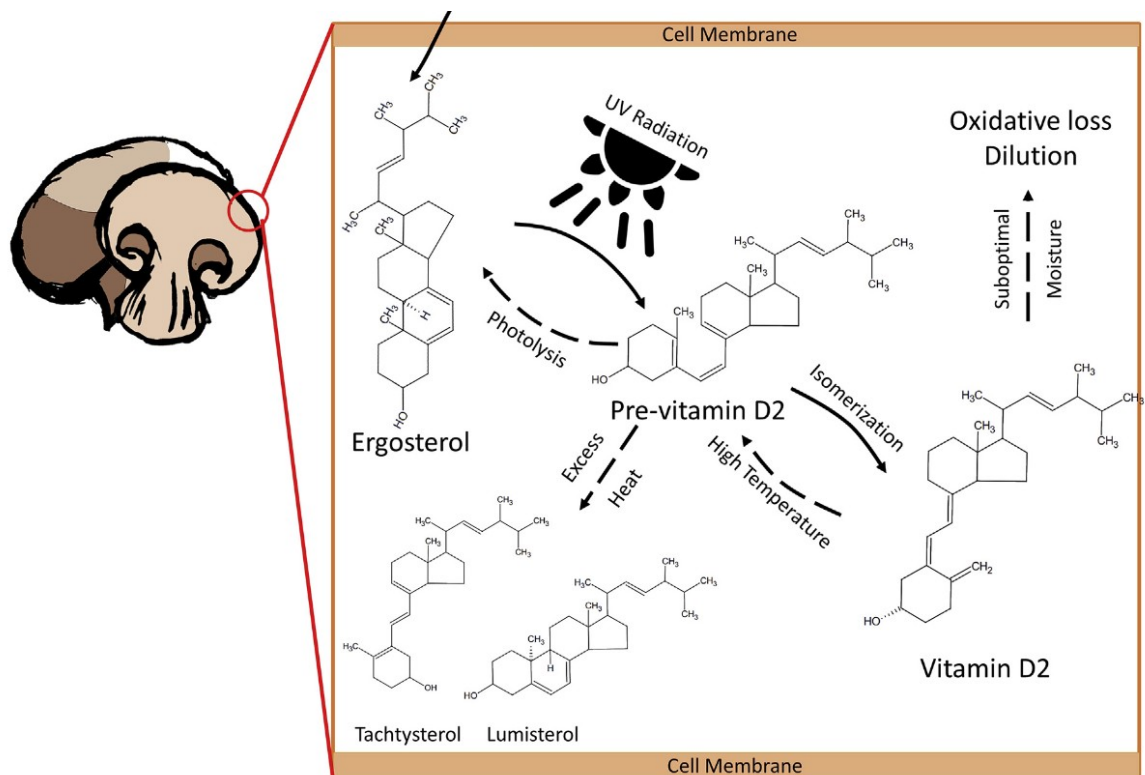
V roce 1977 Seitz a kol. zkoumali souvislost mezi koncentrací ergosterolu a množstvím plísní v cereáliích. Popsali první jednoduchou metodu extrakce a stanovení ergosterolu za pomoci kapalinové chromatografie (*Seitz et al., 1977*).

1.3 Ergosterol jako prekurzor vitamínu D

Nedostatek vitamínu D patří mezi obvyklé problémy světové populace. Je tomu tak především v rámci obyvatel Severní Ameriky, Evropy a Středního východu, kde nejsou lidé vystaveni v dostatečné míře slunečním paprskům převážně v zimním období. U dětí se projevuje onemocněním křivice, zatímco starší lidé trpí na osteomalácii v důsledku narušené mineralizace kostí (*Holick et al., 2010*). Nedostatek vitamínu D může být problematický i díky vlivu na imunitní systém a funkci slinivky břišní (*Wu et al., 2020*). Dle některých studií také může zvyšovat riziko rozvoje rakoviny (*Messaritakis et al., 2020*), *diabetes mellitus* (*Mirzavandi et al., 2020; Zhang et al., 2020*), neuropsychiatrických problémů (*Kim et al., 2020*) a srdečních chorob (*Mokhtar et al., 2019*).

Právě jedlé houby jsou zdrojem vitamínu D₂. Samy o sobě ho neobsahují vysoké množství, neboť obvykle vyrůstají v temném prostředí. Ale jsou velmi bohaté na ergosterol, který je známým prekurzorem vitamínu D. K přeměně dochází za pomoci přírodního či umělého ultrafialového světla (viz. *Obrázek 2*) (*Jiang et al., 2020*).

Přeměna ergosterolu na vitamín D je ovlivněna nejen délkou ozáření ale i teplotou. Čím vyšší je teplota v době vystavení záření, tím více ergosterolu se přemění na vitamín D. Proto je doporučeno vzorky obsahující ergosterol udržovat v temném a chladném prostředí (*Villares et al., 2014*).



Obrázek 2: Přeměna ergosterolu na aktivní formu vitamínu D v houbách. Převzato a upraveno z: (Papoutsis *et al.*, 2020).

1.4 Ergosterol u vyšších hub

Čerstvé houby, které jsme zvyklí konzumovat, obvykle neobsahují významná množství ergosterolu, kromě některých výjimek. Mezi ty patří houževnatec jedlý, spíše známý pod japonským názvem shiitake, pečárka dvouvýtrusá, neboli žampion, hlíva ústříčná a penízovka sametonohá (Jasinghe *et al.*, 2005).

Obvykle se v houbách nachází pouze stopové množství vitamínu D. Jeho obsah se významně zvýší, když je daná houba vystavena slunečnímu či ultrafialovému záření. Společně s jeho nárůstem klesá koncentrace ergosterolu, což potvrzuje roli ergosterolu jako prekursoru vitamínu D (Ahn, 2018; Hu *et al.*, 2020).

Obsah ergosterolu není rovnoměrně rozprostřen v rámci zkoumané houby. Ve třeni se nachází méně ergosterolu než ve spodní části klobouku, kde je koncentrován v rourkách, lupenech, ostnech či lištách (Jasinghe *et al.*, 2005).

V houbovém průmyslu je za rok vygenerováno velké množství „houbového odpadu“. Jedná se přibližně o 20 % celkové produkce. (Aguiló-Aguayo *et al.*, 2017). Vitamín D a ergosterol, které se

nachází v těchto odpadech, by mohly být dodatečně zpracovány ve farmaceutickém průmyslu a potravinářství do jiných výrobků (*Papoutsis et al., 2020*).

Pokud je zapotřebí měřit ergosterol u hub, pak je důležité zaznamenat, jakým způsobem byly vzorky před měřením zpracovány. Houby mohou do laboratoře dorazit buď čerstvé, nebo sušené. Studie naznačují, že existují významné rozdíly mezi obsahem ergosterolu u jednotlivých typů sušení. Velký vliv na celý proces má převážně teplota. Je pravděpodobné, že stejné rozdíly budou patrné i v případě sušených potravin jiného druhu, které byly před sušením kontaminovány plísněmi (*Ahn, 2018; Won et al., 2018*).

1.4.1 Obsah ergosterolu v sušených houbách

Samotná příprava vzorku před extrakcí je pro obsah ergosterolu stejně důležitá jako později vybraná metoda extrakce. Ergosterol může být degradován nejenom slunečním zářením, ale i přílišnou vlhkostí. Studie, které se věnují výzkumu ergosterolu u hub, obvykle pracují s čerstvými nebo sušenými vzorky. Metoda sušení je u hub velice důležitá, neboť může velmi negativně nebo pozitivně ovlivnit konečný obsah ergosterolu. Taktéž je nutné dodat, že dokonalá metoda sušení neexistuje a jak již bylo zmíněno, každý druh houby obsahuje jiné množství ergosterolu (*Papoutsis et al., 2020*).

Houby nevydrží dlouhý transport, což je hlavně v potravinářském, ale i farmaceutickém průmyslu, řešeno jejich sušením. Pokud tedy budeme stanovovat ergosterol u vyšších hub, je nutné počítat s fluktuací jeho koncentrace nejenom s ohledem na druh dané houby, ale i typ sušení, kterým houba prošla. To je důležité v případě, že bychom chtěli ergosterol použít jako ukazatel napadení plísněmi u vyšších hub a potravin vyrobených z hub. Sušení může být prováděno několika různými způsoby. První z nich je sušení horkým vzduchem (hot-air drying) metoda. Jedná se o techniku, která využívá proudy horkého vzduchu k vysušení vzorků. Mezi další hojně využívané techniky se řadí lyofilizace (freeze-drying), což je sublimační sušení za nízké teploty a tlaku. V neposlední řadě je nutné zmínit mikrovlnné sušení (microwave-drying), což je metoda, která využívá schopnosti mikrovln přeměnit se na teplo, které postupně vysušuje vzorek, dále také vakuové sušení (vacuum-drying), které využívá vakua pro snížení bodu varu vody, což vede k jejímu rychlejšímu odpařování (*Gąsecka et al., 2019*).

1.4.2 Rozdíly mezi způsoby sušení

Cílem studie Slawinska a kol. (2016) bylo určení stability vitamínu D v sušených houbách *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* a *Lentinula edodes*. Práce se také zabývala možností uměle vyvolat

přeměnu ergosterolu na vitamín D za pomoci UV záření. Jeden kus od každého exempláře byl vystaven horkému vzduchu. Druhý kus od každého exempláře byl naopak lyofilizován („freeze-drying“). U všech vzorků byl změřen obsah ergosterolu a vitamínu D před i po samotném sušení. Co se týče ergosterolu, u lyofilizovaných vzorků bylo dosaženo mírně lepšího výsledku, a to pouze u *Agaricus bisporus*. Vitamín D byl stanoven spektrofotometricky. Látka byla viditelně zastoupena ve větším množství ve všech lyofilizovaných vzorcích. Výsledky byly naopak horší u exemplářů sušených horkým vzduchem. To potvrzuje, že vitamín D negativně reaguje na teplo a degraduje za přítomnosti kyslíku rychleji (Slawinska et al., 2016).

V roce 2017 Bernas a kol. navázali na předchozí studii Slawinske a kol. (2016). Na základě přechodných výsledků rozšířili testování pro *Agaricus bisporus*. Potvrdili, že zmíněná kultura je významně citlivá na metodu sušení. Znovu provedli sušení za pomoci lyofilizace a horkého vzduchu. Rozdíl v koncentraci ergosterolu mezi vzorky, které byly vysušené lyofilizací a horkým vzduchem, dosahoval až 30%, z toho vyplývá, že ergosterol degraduje za zvýšené teploty (Bernas et al., 2017).

Vzhledem k hojnému zastoupení hub shiitake v jídelníčku asijských zemí byla v roce 2016 provedena studie, která měla za cíl vyzkoušet tři typy sušení a vybrat takové, které je nejvíce šetrné k obsahu ergosterolu, nutrientů a nepřímo vitamínu D v těchto houbách. Tým Tian a kol. (2016) ve své práci vyzkoušeli metodu mikrovlnného sušení (539 W po 18 min), vakuového sušení (-90 kPa při 60 °C 15 h) a horkovzdušného sušení (60–70 °C). Pak bylo provedeno vzájemné porovnání získaných výsledků. Nejmenší obsah vitamínu D byl zjištěn ve vzorcích, které podstoupily mikrovlnné sušení a horkovzdušné sušení. Výsledky tak nadále stvrzují domněnku, že vitamín D podléhá degradaci za vysoké teploty a přístupu kyslíku (Tian et al., 2016).

V roce 2018 Nölle at al. provedl experiment zahrnující několik druhů hub. Mimo jiné houby shiitake (*Lentinula edodes*), hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*) a žampióny (*Agaricus bisporus*). Jeho cílem bylo zjistit, zda existuje rozdíl v obsahu vitamínu D mezi čerstvými a horkovzdušně sušenými vzorky hojně vyhledávaných a konzumovaných hub. Všechny exempláře byly ozářeny UV zářením (1.5 J/cm²). V případě hlívy ústříčné a žampiónů byl zaznamenán podstatný vliv sušení na obsah vitamínu D. Naopak houby shiitake nevykazovaly žádné významné změny v koncentraci. Studie tedy naznačuje, že jednotlivé druhy hub mohou vyžadovat jiné druhy sušení k tomu, aby v sobě uchovaly, co největší množství ergosterolu a vitamínu D (Nölle et al., 2018).

V jedné z nejnovějších studií, které se věnují vztahu mezi koncentrací ergosterolu a typem sušení, byly k přípravě vzorku použity dvě kultury *Hericium erinaceus* a *Leccinum scabrum*. Autoři

sledovali nejdříve obsah ergosterolu u čerstvých vzorků. Ten porovnali s výsledky, které získali poté, co vystavili houby zvyšující se teplotě 20°-70°C. Obsah ergosterolu v čerstvých houbách byl vyšší než naměřený obsah ergosterolu v houbách, které byly vysušené tímto způsobem (*Gqsecka et al., 2019*).

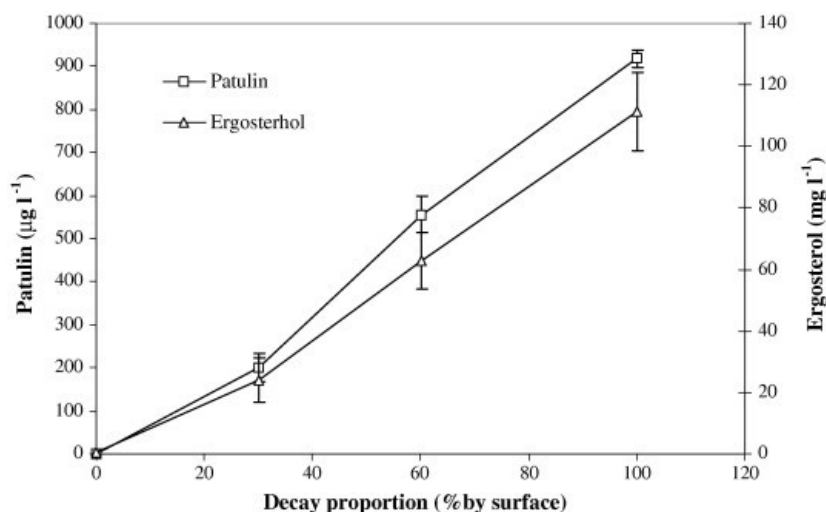
1.5 Ergosterol v plísních

Ergosterol je biochemickým markerem přítomnosti plísní v potravinách nebo například i ve vzduchu. Plísně ovlivňují velmi negativně kvalitu potravin, ať už se jedná o chuť, barvu nebo vůni. Navíc mohou produkovat toxiny, které způsobují zdravotní potíže různé závažnosti. Ačkoliv látku můžeme najít v membránách některých bakterií, vyskytuje se zde natolik vzácně, že v případě potravinách je možné přítomnost ergosterolu spojovat téměř výhradně s kontaminací plísněmi (*Dohnal et al., 2007; Wilkes, 2023*).

Plísně obsahují nejvíce ergosterolu ve svých sporách. Ostatní morfologické formy ergosterol také obsahují, ale v menším množství. Ergosterol je možné uplatnit i jako marker kontaminace ve vnitřních prostorách. V případě, že jeho koncentrace překročí hodnotu 1ng na 1 m³, je možné konstatovat, že prostor je nadměrně zamořen plísněmi (*Gutarowska et al., 2015*).

Zájem o látku, která koreluje s přítomností plísní je vysoký. Proto význam ergosterolu pro hodnocení kvality potravin postupně roste. Tomu odpovídá i fakt, že byl ergosterol dokonce už v roce 2004 navržen jako nový parametr hodnocení kvality rajčat a rajčatových produktů. Vedoucí studie potvrdili, že obsah ergosterolu v rostlinách a bakteriích je v podstatě zanedbatelný a tím pádem lze ergosterol přímo úměrně spojovat s obsahem plísní v rajčatech (*Kadalkal et al, 2004*).

O rok později, v roce 2005, Kadalkal a kol. zkoumal tlející jablka, která byla periodicky monitorována pro svůj obsah ergosterolu a patulinu. Na obrázku 3 je uveden graf korelace koncentrace ergosterolu i patulinu v závislosti na stupni rozkladu. Stupeň rozkladu jablek je určován procentuálně na základě zasaženého povrchu.



Obrázek 3: Korelace mezi obsahem patulinu, ergosterolu a stupni rozkladu jablek. Převzato z: (Kadalkal et al, 2005).

Domněnka, se kterou studie pracovala, tedy že koncentrace ergosterolu se zvyšuje v závislosti na stupni zasažení jablka, byla potvrzena. Ergosterol lze proto použít i jako ukazatel kvality jablek (Kadalkal et al, 2005).

Nejenom ovoce a zelenina, ale i obiloviny jsou velmi náchylné k plísňovým onemocněním. V dnešní době nám již v civilizované části světa skoro nehrozí otrava námelovými alkaloidy, ale plísně jsou schopné stejně dobře zničit chuť, barvu i nutriční kvalitu obilovin a jejich výrobků. Mezi různými druhy obilí jako je pšenice, ječmen a oves jsou patrné rozdíly v odolnosti proti napadení plísněmi (Perkowski et al., 2008; Super-Szablewska et al., 2017).

Kontaminované vzorky obilí, které jsou mechanicky semlety na mouku, by teoreticky neměly ztrácet obsažený ergosterol. Koncentrace se ale mění na základě úspěšnosti předchozí purifikace a složení mletého výrobku. Stupeň napadení původního zrna je možné zjistit ze zpracovaného výrobku pouze výjimečně. Ideálně by totiž mouka musela obsahovat všechny původní části obilky. Plísně se chytají na vnější části obilí, proto mouky, které neobsahují příměs vnějších obalů, nemusejí obsahovat ergosterol, anebo jenom jeho velmi malé množství, i když bylo původní zrna z vnější strany napadeno (Thammawong et al., 2011).

Perkowski et al. (2008) se zabýval rozdíly mezi obsahem ergosterolu v napadených obilovinách a vybraných moukách, které byly zakoupeny v obchodě. Pro přípravu vzorků byly využity kultury *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium sporotrichioides* a *Fusarium poae*. Kultury byly naočkovány do obilovin a jejich růst a vývoj byl sledován. V průběhu studie byly také průběžně testovány vzorky pšenice po 2, 4 a 6 týdnech (Perkowski et al., 2008).

Z výsledků bylo možné vyvodit hned několik závěrů. Obiloviny obsahovaly mnohem větší obsah ergosterolu než zakoupené zpracované výrobky. Jednalo se o předpokládaný výsledek, neboť výrobky prodávané v obchodě by neměly být napadené plísněmi. I přesto v nich bylo chromatograficky stanoveno stopové množství ergosterolu, konkrétně okolo 3mg/kg. Takové množství je však považováno za zdraví nezávadné (*Perkowski et al., 2008; Schnürer & Jonsson, 1992*).

Největší množství ergosterolu vykazoval oves naočkovaný *Fusarium sporotrichioides*, což poukazuje na rozdílnou schopnost kultur infikovat obiloviny. Průběžně sledovaná koncentrace ergosterolu u pšenice rostla zpočátku méně (4,74 mg/kg), po dvou týdnech byl pozorován významný nárůst (45,46 mg/kg) a v 6. týdnu došlo k dalšímu nárůstu koncentrace (76,19 mg/kg). Bylo tedy potvrzeno, že koncentrace ergosterolu kopíruje růst a šíření plísně (*Perkowski et al., 2008*).

Pro svou jednoduchost ve stanovení a relativní přesnost byl ergosterol vybrán jako vhodný marker plísňové kontaminace i v České Republice. Výzkum, který vedl k tomuto závěru, provedl Dohnal a kol. v roce 2008 u vybraných druhů trav na konci vegetačního období. Za pomoci chromatografických a spektrofotometrických metod sledoval obsah ergosterolu. Výsledky ukázaly, že jednotlivé druhy trav jsou různě náchylné k plísním, neboť obsahovaly rozdílné koncentrace ergosterolu. (*Dohnal et al, 2008*).

Novější studie prováděná na ergosterolu našla přímou souvislost mezi množstvím ergosterolu a počtem plísňových kolonií (*Kadikal et al, 2019*).

1.6 Ergosterol a mykotoxiny

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity produkované plísněmi. Právě jejich přičiněním dochází ke změnám vlastností napadené potravin. V případě, že je člověk mykotoxinům vystaven, hrozí mu různá onemocnění včetně problémů s ledvinami, játry či imunitním systémem. Mykotoxiny mohou mít teratogenní, kancerogenní nebo mutagenní efekty jak pro lidské, tak i zvířecí konzumenty (*Ekwomadu et al., 2022*).

Aflatoxiny jsou velmi významné mykotoxiny převážně produkované rodem *Aspergillus*. Aflatoxin B1 byl roku 1993 klasifikován jako kancerogenní toxin Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC). Ostatní aflatoxiny jsou spojovány se žloutenkou, krvácením, otokem, imunosupresí a rakovinou jater (*Nabizadeh et al., 2018; Speijers & Speijers, 2004*).

Patulin je mykotoxin, který se objevuje v sýrech, zelenině a ovoci, převážně v moštu (Kadalkal et al., 2005), obilí (Super-Szablewska et al., 2017) a měkkýších (Carreón-Palau et al., 2020). Důležití producenti patulinu jsou *Penicillium patulum* a *Penicillium expansum*. Mezi producenty ale také řadíme rody *Aspergillus*, *Byssochlamys* a některé další zástupce rodu *Penicillium*. Ačkoliv nebyly prokázány žádné negativní vlivy patulinu na zdraví člověka, Světová zdravotnická organizace (WHO) stanovila limit koncentrace patulinu v potravinách na 0,4 mg/kg tělesné váhy (Pattono et al., 2013; Kadalkal, 2020).

Ochratoxin A byl v roce 1993 klasifikován jako možný lidský karcinogen (skupina 2B) Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC). Jedná se o mykotoxin, který je převážně produkován zástupci rodu *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. niger*, *A. alliaceus*, *A. auricomus*, *A. carbonarius*, *A. glaucus*, *A. melleus*) a *Penicillium* (*P. nordicum*, *P. verrucosum*). Obvykle jej najdeme v obilí (ječmen, oves, pšenice, žito), ovoci (fíky, rozinky) a v kakakových a kávových zrnech (Dall'Asta et al., 2008). OTA je spojován s výskytem nádorů v urinárním traktu a s onemocněním ledvin, které je v Bulharsku, Řecku a Rumunsku označováno jako „Balkánská endemická nefropatie“ (Pavlović, 2013).

Alternariol, alternariol monomethyl ether a kyselina tenazuová jsou mykotoxiny produkované *Alternaria alternata* zástupcem rodu *Alternaria*. Tato plíseň hlavně postihuje rajčata v období sklizně a po ní. Přímou u rajčat způsobuje černou hnilobu, ale je také schopná napadat rajčatové keříky, u kterých způsobuje skvrnitost. Kromě rajčat také může postihovat obilí, olejná semena, ovoce a zeleninu. Tyto mykotoxiny mají velmi pravděpodobně genotoxické, mutagenní, karcinogenní a cytotoxické efekty (Nizamlioglu, 2022).

Vztah mezi obsahem mykotoxinů a koncentrací ergosterolu byl zkoumán mimo jiné u kukuřičných zrn, a to pro aflatoxiny B1 a B2 (Castro et al., 2002), u jablek pro patulin (Kadalkal, 2005), u kukuřice pro ochratoxin, zearalenon a aflatoxin B1 (Hossain et al., 2015), u sýrů pro patulin a ochratoxin A (Kadalkal, 2020) a u rajčat, konkrétně u rajčatového pyré a džusu, pro alternariol, alternariol monomethyl ether a kyselinu tenazuovou (Nizamlioglu, 2022).

Kukuřice, hlavní pěstovaná plodina v Brazílii, je velmi náchylná k napadení plísněmi. Je tomu tak převážně kvůli počasí, které je v Brazílii teplé a vlhké po většinu roku. Výzkum prováděný na kukuřici varianty Taiúba se stal určitou snahou nahradit stávající metody pro stanovení a detekci aflatoxinů. Cílem práce bylo najít či vyvrátit korelaci mezi koncentrací ergosterolu a aflatoxinů. Výzkum byl prováděn s pomocí *Aspergillus flavus*. Zkoumány byly dvě skupiny vzorků varianty Taiúba, dvě skupiny varianty Cargill hybrid 606 a dvě uměle kontaminované sady vzorků Taiúba.

Monitorované přírodní vzorky neobsahovaly aflatoxiny a zaznamenány byly pouze minimální hodnoty ergosterolu. Aflatoxin B1 byl detekován devátý den experimentu v obou setech uměle kontaminovaných vzorků, zatímco aflatoxin B2 byl přítomen až den dvanáctý, taktéž pro oba dva sady. Koncentrace aflatoxinu B1 rostla společně s koncentrací ergosterolu. Ve chvíli, kdy plíseň dosáhla svého růstového maxima aflatoxin B1 začal postupně degradovat a koncentrace ergosterolu se přestala zvyšovat. Vzhledem ke korelaci nárůstu aflatoxinu B1 a koncentrace ergosterolu bylo konstatováno, že ergosterol je možným indikátorem přítomnosti aflatoxinu B1. Spojitost mezi ergosterolem a aflatoxinem B2 nebyla zaznamenána (*Castro et al., 2002*).

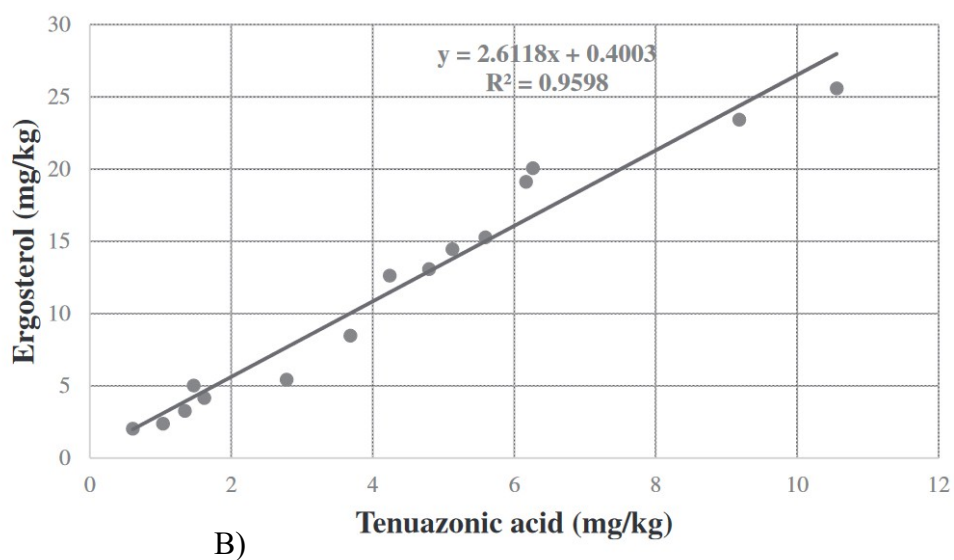
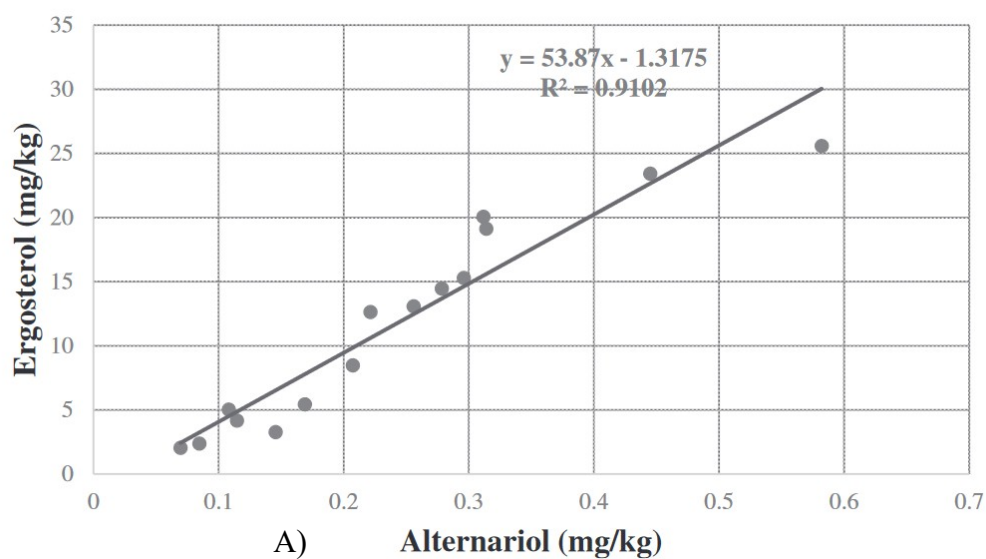
V roce 2015 Hossain a kol. zkoumali spojitosti mezi koncentrací ergosterolu, aflatoxiny B1, B2, G1, ochratoxinem A (OTA) a zearalenonem (ZEA). Vzorků kukuřice bylo celkově 139. Byly nashromážděny mezi lety 2011 a 2013 laboratoří v Singapuru z celého světa. Použity byly vzorky z Jižní (24), Severní Ameriky (76), Evropy (7) i Asie (32). Evropské vzorky pocházely z Ukrajiny, Ruska a Azerbajdžánu. Americké z USA, Brazílie a Argentiny. Mezi asijskými vzorky byly vzorky z Thajska, Tchaj-wanu, Kambodži, Indonésie, Filipín, Indie a Pákistánu. Autoři měli také k dispozici několik vzorků z Austrálie. Ke zjištění koncentrace ergosterolu byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV a fluorescenční detekcí. Ergosterol byl v různých koncentracích přítomen ve všech 139 vzorcích. Nejmenší obsah mykotoxinů byl ve vzorcích z Evropy, které zároveň obsahovaly nejmenší množství ergosterolu. Všechny se držely pod limitem 3 mg/kg, což je zdraví nezávadné množství ergosterolu (*Schnürer & Jonsson, 1992*). U těchto vzorků byl obsah mykotoxinů zanedbatelný. Naopak jakmile se vzorky dostaly nad 8 mg/kg ergosterolu pravděpodobnost přítomnosti mykotoxinů se velmi zvýšila (*Hossain et al., 2015*).

U aflatoxinu B1 a ergosterolu byla nalezena slabá spojitost ($r^2=0,253$) ovšem mezi zbylými aflatoxiny (B2, G1) a ergosterolem nebyla pozorována žádná souvislost. Vzhledem k tomu, že mezi vzorky byl přítomen pouze jeden obsahující OTA, studie nehodnotila vztah mezi koncentrací ergosterolu a OTA. Koncentrace zearalenonu a ergosterolu dosahovaly velmi vysoké vzájemné korelace hodnot ($r^2=0,82$). Ergosterol byl označen jako možný časný indikátor produkce ZEA a aflatoxinu B1 (*Hossain et al., 2015*).

V roce 2005 proběhla studie vedená Kadakal a kol. zaměřená na souvislost mezi koncentrací ergosterolu, patulinu a ochratoxinu A a to v několika odlišných vzorcích sýrů. V žádném ze vzorků nebyl nalezen patulin. Tento jev byl zdůvodněn nevhodným substrátem pro tvorbu toxinů typu patulin a kyselina penicilová, a jejich nestabilitou v prostředí sýrů (*Kokkonen et al., 2005; Kadakal et al., 2005*). Mezi ergosterolem a ochratoxinem A byla pozorována silná korelace ($r^2=0,98$). Autoři

zmiňují, že stanovení ergosterolu je jednodušší a rychlejší než stanovení patulinu a OTA. Zároveň byli schopni s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie detekovat ergosterol i u sýrů, kde nebylo napadení plísněmi zřetelně viditelné. Tyto skutečnosti naznačují, že ergosterol by mohl v budoucnu sloužit jako varovný indikátor produkce OTA (Kadalkal, 2020).

Vzhledem k náchylnosti rajčat k plísňovému napadení, obvykle zástupcem rodu *Alternaria*, zde byl určitý předpoklad výskytu mykotoxinů. V roce 2022 proto Nizamlioglu provedl experiment, ve kterém porovnal alternariol, alternariol methyl ether a kyselinu tenazuovou s obsahem ergosterolu v rajčatovém protlaku a džusu. K experimentu bylo použito patnáct různých odrůd rajčat z Turecka. Všechny vzorky obsahovaly pouze stopová množství ergosterolu nebo vůbec žádný. Alternariol methyl ether nebylo možné v rajčatech detegovat. Alternariol a kyselina tenazuová se zde nacházely a jak je vidět na obrázcích dole (Obrázek 4A, B), oba mykotoxiny vykazovaly významnou korelaci s koncentrací ergosterolu, ($r^2=0,91$; $r^2=0,95$) (Nizamlioglu, 2022).



Obrázek 4: Korelace mezi koncentrací ergosterolu a alternariolu (A) a kyseliny tenazuové (B).
Převzato z: (Nizamlioglu, 2022).

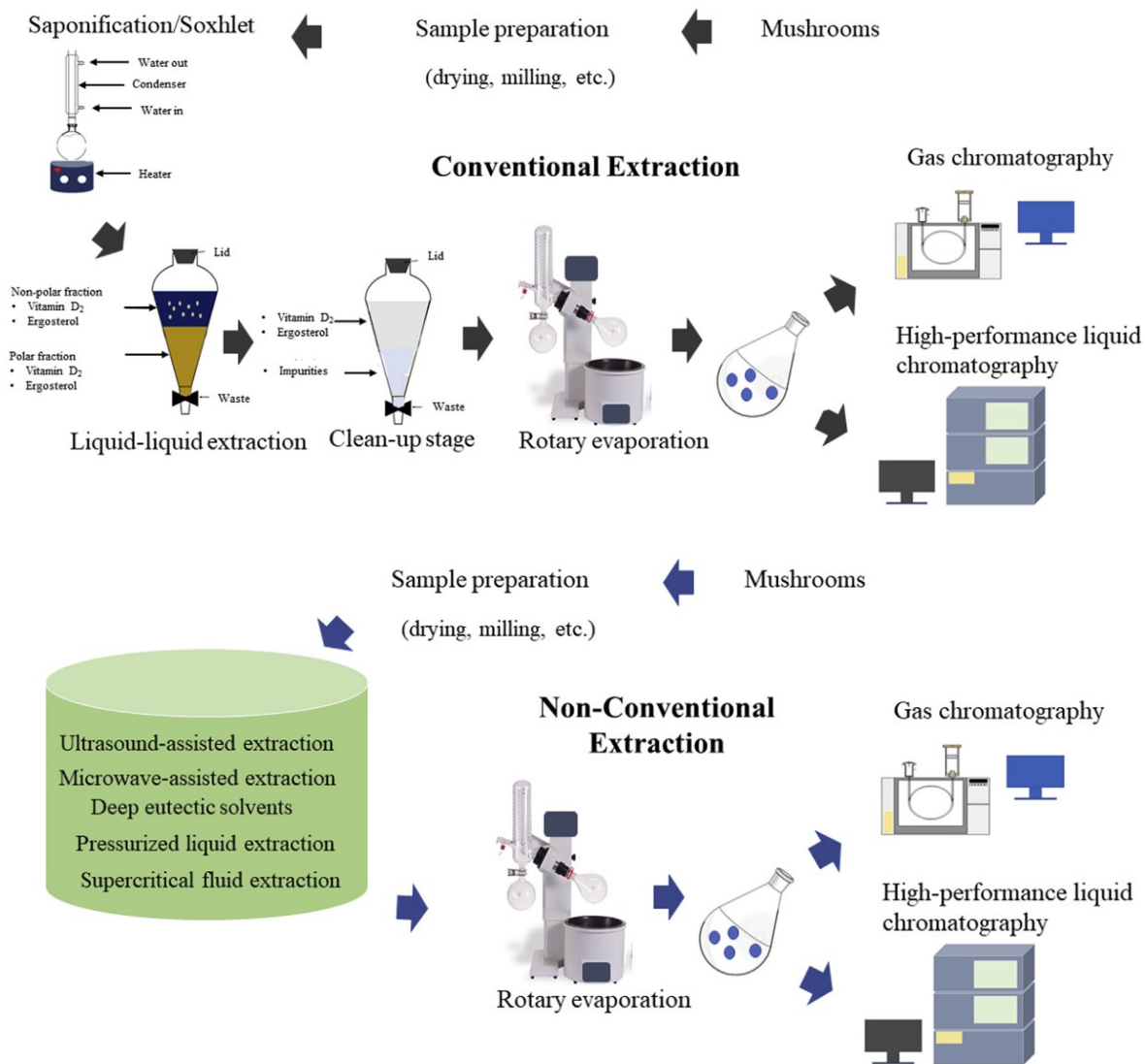
2 METODY EXTRAKCE ERGOSTEROLU

2.1 Extrakce

Mezi první extrakce ergosterolu pravděpodobně patří experimentální studie z roku 1977, ve které byl ergosterol poprvé označen za možný významný marker pro sledování růstu a vývoje hub (*Seitz et al., 1977*). Jímí popsaná metoda extrakce na pevné fázi je s určitými úpravami používána a citována dodnes.

Metody extrakce ergosterolu lze rozdělit na konvenční a nekonvenční (*Obrázek 5*). Citovaná literatura se liší v definování daných pojmů. Dle Barba et al. (2017) patří mezi konvenční metody takové, které pro své provedení vyžadují konvenční rozpouštědla, což jsou látky toxické k životnímu prostředí a lidskému zdraví. Naopak dle Heleno, Prieto et al. (2016) konvenční extrakce jsou takové, které jsou časově náročné a vyžadují velké množství nebezpečných rozpouštědel. Jako nekonvenční jsou označeny extrakce, které vyžadují nižší teploty a kratší dobu zpracování než extrakce konvenční (*Barba et al. 2017; Heleno & Prieto et al., 2017; Roselló-Soto et al., 2016*).

Z tohoto pravidla ovšem existují výjimky. Což je např. použití nekonvenční extrakční metody za současného využití methanolu, který se řadí mezi organická rozpouštědla, a proto celý proces nemůže být označen jako nezávadný pro životní prostředí, což se jinak zdá být hlavním rozdílem mezi oběma skupinami extrakcí. Nekonvenční extrakce by teoreticky měly být „zelené“. To znamená, že by měly splňovat určitá kritéria, mezi která řadíme nízkou spotřebu energie, použití alternativních rozpouštědel, která neničí životní prostředí a jejich výsledkem by měly být bezpečné extrakty vysoké kvality (*Chemat et al., 2012; Roselló-Soto et al., 2016*).



Obrázek 5: Grafické vyjádření průběhu konvenční a nekonvenční extrakce. *Převzato a upraveno z: (Papoutsis et al., 2020).*

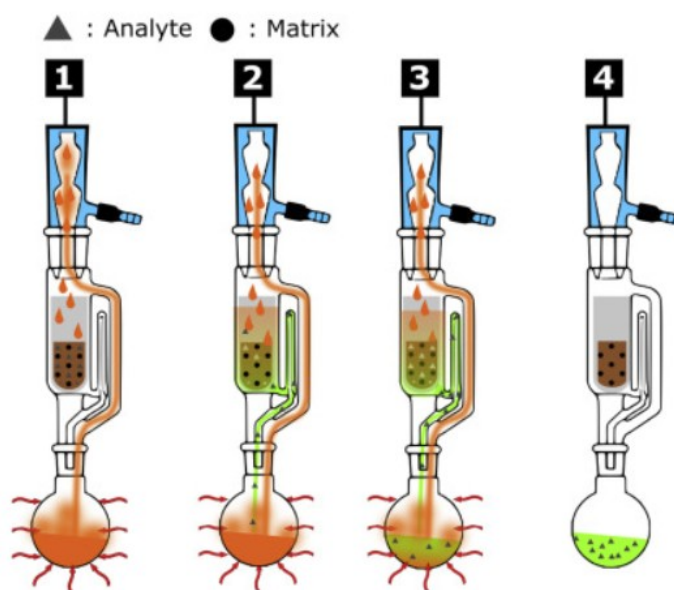
2.2 Saponifikace

Saponifikace je hydrolytická reakce, ve které volný hydroxid naruší esterovou vazbu mastných kyselin a glycerolu v triacylglycerolu. Výsledkem je volný glycerol a mastné kyseliny (Prabu et al., 2015). Když jsou konjugované steroly hydrolyzovány, jsou přeměněny do podoby volných sterolů, které mají podobnou polaritu, což nám umožňuje steroly extrahovat jediným rozpouštědlem. V případě ergosterolu a vitamínu D₂ je možné saponifikaci provést buď na vzorcích, nebo na výsledných extraktech. Pokud je saponifikace provedena na vzorcích hub, jejím výsledkem je rozbití komplexních struktur houby, což vede k přesnějšímu stanovení ergosterolu a vitamínu D₂ z okolní matrix (Han & Zhou, 2015).

Saponifikace se obvykle provádí při teplotách mezi 60° a 80°C v rozmezí 15 až 60 minut (Heleno & Diz, et al., 2016). V průběhu hydrolýzy je obvykle použita kyselina askorbová, aby se předešlo degradaci sterolů způsobené zvýšenou teplotou. V nedávných studiích bylo prokázáno, že lze krok saponifikace zcela přeskočit u některých nekonvenčních metod extrakce (Heleno & Diz, et al., 2016; Heleno & Prieto et al., 2016).

2.3 Soxhletova extrakce

Soxhletova extrakce patří mezi konvenční metody. Často bývá použita před saponifikací a extrakcí. Princip je uveden na obrázku 6. Na spodu aparatury je umístěna baňka, ve které je zvolené rozpouštědlo. Na ní je napojena soxhletova extrakční patrona, která je naplněna vzorkem s analyzovanou látkou. Stanovovaný analyt musí být rozpustný ve zvoleném rozpouštědle. Extrakční patrona může být papírová nebo skleněná. Na vrchní zábrus extrakční patrony je umístěna kondenzační část s chladičem (Wegglar et al., 2020).



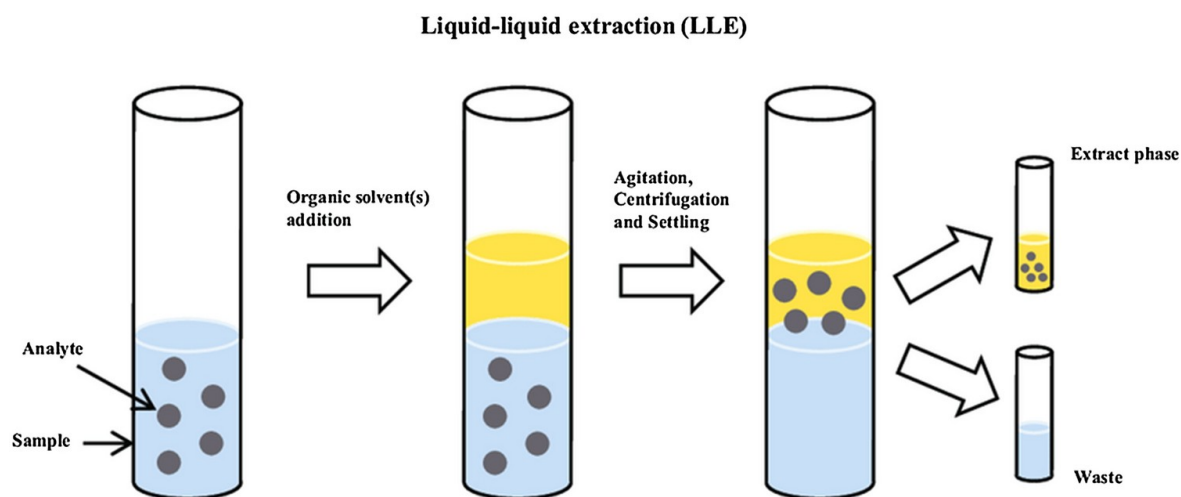
Obrázek 6: Soxhletova extrakce 1. Ohřátí analytu, 2. Kondenzace analytu a naplnění soxhletovy komory, 3. Opakování extrakce, 4. Výsledný extrakt obsahující analyt. Převzato z: (Wegglar et al., 2020).

Extrakce je založena na opakovaném odpařování a kondenzaci rozpouštědla, které postupně naplňuje Soxhletovu patronu. Když je naplněna, rozpouštědlo s částí analytu proteče zpět do spodní baňky, odkud se celý proces znovu zopakuje. Principem extrakce je postupné vymývání analytu z extrakční patrony do spodní baňky, dokud není vzorek vyčerpán (Wegglar et al., 2020).

2.4 Extrakce kapalinou (LLE)

V současnosti je tato tradiční extrakce z velké části nahrazena extrakcí na pevné fázi. Je tomu tak hlavně proto, že extrakce na pevné fázi nabízí mnohem rychlejší zpracování vzorků a zároveň je mnohem více specifická. Velikou nevýhodou extrakce LLE je také běžné užívání toxických rozpouštědel (*Papoutsis et al., 2020*).

Extrakce kapalinou je založena na principu dvou nemísitelných kapalných fází (*Obrázek 7*). Obvykle se jedná o vodný vzorek a organické rozpouštědlo. Volba extrakčního činidla významně ovlivňuje selektivitu a účinnost extrakce. Analyt je rozpuštěn v různém poměru v obou fázích na základě své rozpustnosti v daných rozpouštědlech. Čím větší je rozdíl mezi rozdělovacími koeficienty extrahované látky, tím dokonalejší je oddělení. Extrakt je obvykle preferován ve více těkavé fázi, neboť po extrakci následuje odpařování rozpouštědla v koncentrátoru (*Tsenang et al., 2022*).



Obrázek 7: Schématické znázornění principu extrakce LLE.

Převzato z: Tsenang et al., 2022).

2.4.1 Příklady extrakce ergosterolu kapalinou

Extrakce kapalinou je velmi jednoduchá a účinná metoda extrakce, kterou lze použít pro extrakci ergosterolu z různých vzorků. Vzhledem k jednoduchosti provedení metody byla také vybrána pro experimentální část práce.

V roce 2010 Matyáš v rámci své diplomové práce extrahoval ergosterol z ječmene a sladu za pomoci 10 % roztoku KOH v methanolu, ve kterém byla rozpuštěna rozdrčená směs zmíněných obilovin přídatkem hexanu při teplotě 60°. Po ochlazení byla přidána destilovaná voda, odebrána

organická a postup byl opakován třikrát. Konečný obsah ergosterolu byl stanoven pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s použitím detekce s diodovým pólem. Výťažnost byla stanovena na 106,1 % (Matyáš, 2010).

Heleno, Diz a kol provedli v roce 2016 extrakci ergosterolu u hub. Proces byl započat saponifikací s 2M KOH v methanolu s 0,1M kyselinou askorbovou. Vzorky byly saponifikovány 45 minut při 60°. Ke vzorkům poté byla přidána destilovaná voda a cyklohexan. Celá směs byla vortexována (3500 rpm, 5 minut) a po dokonalém oddělení fází z ní byla odebrána hexanová vrstva, která byla odpařena na koncentrátoru. Obsah ergosterolu byl stanoven pomocí HPLC (Heleno, Diz, et al., 2016).

Pro extrakci ergosterolu z půdy Davis a kol. použili v roce 1992 směs n-hexan a methanol 1:4 v/v, která byla smíchána se směsí a ponechána v třepačce 16 hodin. Poté byla půda odfiltrována pomocí vakuové filtrační aparatury se skleněnými vlákny. Ke zbylé směsi byla přidána voda. Lahvička byla ponechána stát, aby se oddělila vodná a hexanová frakce. Organická část byla odebrána a odpařena v koncentrátoru. Extrahovaný ergosterol byl změřen gravimetricky pomocí vah (Davis et al., 1992).

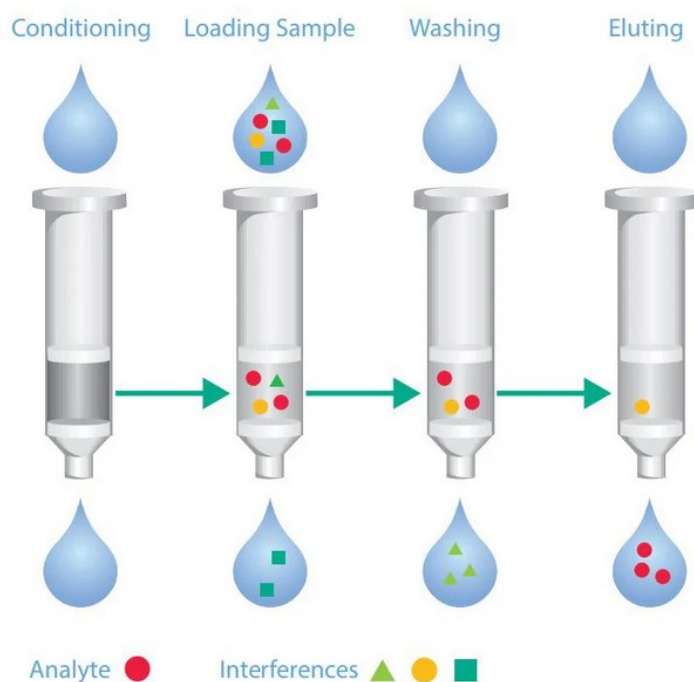
Extrakci ergosterolu z píce Dohnal a kol. v roce 2007 smísením analyzované pícniny z 10 % KOH v methanolu. Poté byla směs 30 sekund intenzivně promíchávána na míchačce, a ponechána na 90 minut v termobloku při 80°C. Po ochlazení byla ke vzorku přidána destilovaná voda a hexan. Celý obsah byl centrifugován (4000 ot./min) a organická frakce byla oddělena. Postup byl opakován třikrát, a nakonec byly hexanové frakce odpařeny v koncentrátoru. Finální odparek byl rozpuštěn ve směsi methanol/toluen 75:25 v/v a analyzován pomocí kapalinové chromatografie s UV detekcí (Dohnal et al., 2007).

2.5 Extrakce na pevné fázi (SPE)

V praxi je extrakce na pevné fázi převážně využívána při separaci parazitických hub rostoucích v rámci rostlinných pletiv. Oddělování parazitických hub a kontaminací tohoto typu je obzvláště složité, neboť oba materiály jsou vzájemně prorostlé (Newell, 1992; Newell, 1994; Gessner, 1996).

SPE metoda je obvykle používána pro extrakci kapalných látek, zejména těkavých a středně těkavých, které v sobě mají nějaké příměsi, které by mohly ovlivnit následná analytická stanovení. Principem extrakce je interakce mezi pevnou fází a protékajícím vzorkem. Molekuly vzorku by měly být zachyceny na tuhém sorbentu (Obr. 8), který je náplní extrakčních kolonek různých

velikostí. Extrakce využívá chemických vlastností molekul vzorku, které pak v důsledku mezimolekulových interakcí ulpívají na sorbentu (Ötles *et al.*, 2016).



Obrázek 8: Obvyklé čtyři kroky SPE extrakce. Převzato z: (www.gilson.com)

Mezi výhody SPE se určitě řadí, že při ní není potřeba používat vysoce toxické látky jako je například hexan nebo pentan, což jsou látky, které jsou obvykle používány v LLE. Nevýhodou je citlivost metody na špatné vysušení kolony po projití vzorku a v případě ergosterolu rozklad jeho chemické struktury po eluci, což je způsobeno nedostatečně nízkým pH v konečném extraktu (Gessner *et al.*, 1996).

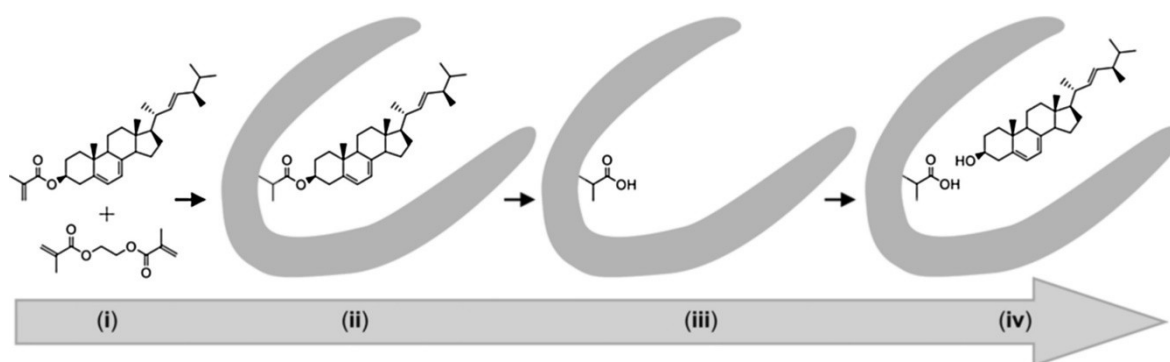
SPE metoda je hojně využívána i pro extrakci jiných steroidních látek a jejich derivátů. Jako příklad můžeme uvést vitamín D, který je navíc ergosterolu strukturně velmi podobný (Hartwig, 1995; Pluscec *et al.*, 1987).

2.5.1 Molekulově imprintované polymery (MIP)

Mezi experimentální verze extrakce na pevné fázi, které jsou v současnosti na vzestupu, můžeme zařadit právě MIP. Jedná se o struktury, v podstatě umělé receptory, které jsou vyrobené na míru hledané molekule, na základě jejích chemických, fyzických a geometrických vlastností. K jejich výrobě je využito tzv. templátové molekuly, která vlastnostmi odpovídá hledané molekule. S její

pomocí jsou vyrobeny molekulárně imprintované polymery (z anglického molecular imprinted polymers), které uchovávají v paměti tvar a vlastnosti templátové molekuly (*Obrázek 9*). Je možné je využít opakovaně bez toho, že by ztratily svou schopnost vázat určenou molekulu (*Oktay et al, 2021*).

Molekulově imprintované polymery byly poprvé zmíněny již ve studiích v roce 1930, ale až nedávno byly použity v praxi pro ergosterol. Stalo se tak pro medicínské účely, kdy byly Erg-MIP kolony použity pro extrakci ergosterolu v *Ganoderma tsugae*, což je houba studovaná pro své protinádorové účinky, kvantifikace obsaženého ergosterolu byla provedena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi (*Hashim et al, 2016*).



Obrázek 9: Schématické znázornění tvorby molekulově imprintovaných polymerů *Převzato z: (Hashim et al, 2016)*.

2.6 Extrakce ultrazvukem

Extrakce ultrazvukem (UAE) je konvenční metoda, která je založena na vysokoenergetických, nízkofrekvenčních ultrazvukových vlnách. Tyto vlny generují střídání vysokotlakých a nízkotlakých cyklů. Během nízkotlakých cyklů se vytvářejí mikrobubliny v kapalině, které se postupně zvětšují, až nakonec v průběhu vysokotlakého cyklu prasknou. Tomuto jevu se říká kavitace. Místa kavitace jsou horká a mikrobubliny při svém prasknutí vytvářejí relativně rychlý proud kapaliny. Takto uměle vyvolané extrémní podmínky jsou schopné mechanicky poškodit buňky, u kterých se nacházejí. Tím dojde k vylití jejich obsahu (*Chemat et al., 2017*). Intenzivní nízkofrekvenční zvukové vlny mají frekvenci přibližně 20-65 kHz (*Heleno & Diz, et al., 2016*). Lidé je tedy nemohou slyšet (*Papoutsis et al., 2020*).

V roce 2016 byly porovnány dvě metody extrakce ergosterolu a to UAE metoda se Soxhletovou extrakcí. Zatímco Soxhletova extrakce trvá přibližně 4 hodiny a je potřeba ji spojit se saponifikací, ultrazvuková extrakce byla hotova po optimalizaci podmínek (375 W) za 15 minut. Výsledné

hodnoty ergosterolu se ukázaly být významně závislé na druhu použitého rozpouštědla. V případě použitín-hexanu a limonenu byly výsledky obou typů extrakcí stejné, ačkoliv UAE nepředcházela saponifikace. Když byl použit jako rozpouštědlo ethanol, výsledný extrakt nebyl tak čistý jako u druhého typu se saponifikací. Tento výsledek byl odůvodněn vyšší polaritou ethanolu, která mohla způsobit, že se do extraktu dostalo kromě ergosterolu více látek (*Heleno & Diz, et al., 2016; Papoutsis et al., 2020*).

2.7 Superkritická fluidní extrakce (SFE) a tlaková extrakce (PLE)

Extrakce tohoto typu se používají pro různé bioaktivní látky včetně sterolů, pigmentů, různých olejů a polyfenolů. Jak již název napovídá principem superkritické fluidní extrakce je použití superkritické kapaliny k extrakci analytu. Metoda může být použita jak pro tekutý vzorek, tak i pevný. Nejběžnější superkritickou kapalinou je CO₂ (*Gallego, Bueno, & Herrero, 2019*).

Metoda SFE byla v roce 2017 použita u hub shiitake pro extrakci ergosterolu. Kvantifikace získaného ergosterolu byla provedena za pomoci plynového chromatografu ve spojení s hmotnostním spektrometrem. Oba zkoumané parametry, teplota a tlak, významně ovlivňovaly výsledné koncentrace ergosterolu. Doporučená teplota SFE pro ergosterol byla stanovena na 70 °C a tlak na 350 bar (*Morales et al., 2017*).

Tlaková kapalinová extrakce využívá speciální nerezové cely, ve které je udržována zvýšená teplota a tlak. Díky podmínkám se zvyšuje rozpustnost přítomných látek v rozpouštědle, které je do cely dávkováno. Vzorek je obvykle smíchán s inertní hmotou, jako je např. písek nebo jíl, aby byla cela plně vyplněna. Po určeném čase je rozpouštědlo s analytem odčerpáno do odběrné baňky za pomoci proudu dusíku (*Bogialli et al., 2007*).

Cílem výzkumu provedeného v roce 2013 byla optimalizace podmínek PLE pro ergosterol. Mezi sledované parametry patřil počet cyklů, extrakční čas, poměr mezi vzorkem a pískem v cele a teplota. Jako rozpouštědlo byl použit ethanol, který byl dávkován pod tlakem o hodnotě 10,7MPa. Výsledné optimalizované podmínky bylo 5 cyklů dávkování ethanolu za 5 min, poměr vzorku proti písku 1:4 a teplota 50 °C (*Gil-Ramirez et al., 2013*).

Mezi oběma extrakčními metodami SFE a PLE byly nalezeny rozdíly. SFE byla více selektivní a schopná technického rozšíření, které jí umožnilo pojmout i vzorky o větším objemu. PLE je naopak metoda, která je omezena svou kapacitou cely a je proto vhodná pouze pro vzorky o dostatečně malém objemu (*Papoutsis et al., 2020*).

2.8 Mikrovlnná extrakce (MAE)

MAE využívá mikrovln, což jsou ve své podstatě elektromagnetické signály, které se pohybují v rozmezí mezi 300Mhz a 300GHz. Mikrovlny ohřívají rozpouštědlo, ve kterém je vzorek. Analyt přechází do rozpouštědla. Výsledná směs je odebrána a odpařena na koncentrátoru. Mikrovlnná extrakce byla v minulosti použita pro extrakci polyfenolů, polysacharidů, mastných kyselin a tuků (*Maeng et al., 2017*).

Taofiq et al. (2019) optimalizoval podmínky pro extrakci ergosterolu za využití MAE. Doba extrakce se pohybovala mezi 2-25 minutami při teplotě 60°-150°C (*Taofiq et al., 2019*).

3 METODY STANOVENÍ ERGOSTEROLU

Pro stanovení ergosterolu je používána celá řada chromatografických a spektrofotometrických metod. Řadíme mezi ně tenkovrstvou chromatografií (*Larsen, 2004*), plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (*Nielsen, 2000*), a mezi nejpoužívanější patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí (*Lohr et al., 2017*). Nedostatek finančně dostupných a méně nákladných alternativ podnítilo výzkumy, které se zabývají studiem a možným uplatněním alternativních metod stanovení ergosterolu (*Vukojević et al., 2018*). Další možností jsou elektrochemické metody stanovení ergosterolu, které se vyznačují především svou nízkou cenou a prostorovou nenáročností. Zároveň se jedná o metody poměrně citlivé a přesné. Experimentální část práce je zaměřena právě na elektrochemické stanovení, a proto mu budou věnovány následující kapitoly.

3.1 Elektrochemické metody

Elektrochemické metody jsou nedílnou součástí analytické chemie a základního fyzikálně-chemického výzkumu. K identifikaci látek a jejich stanovení se v elektrochemii využívá vztahu mezi měřenou elektrickou veličinou a chemickými vlastnostmi analyzovaného roztoku. Příkladem měřených elektrických veličin může být elektrodový potenciál, elektrický náboj, proudová odezva, elektrický odpor a jiné. Na rozdíl od jiných analytických metod, elektrochemie měří na rozhraní mezi roztokem a elektrodou (*Francis et al., 2022*).

Pro využití elektrochemických metod je nutné, aby měřená látka byla schopna přenášet elektrický náboj. Hlavním principem elektrochemie je totiž přenos elektronů v rámci redoxní reakce na povrchu elektrody. Měřený analyt je oxidován nebo redukován za specifického potenciálu. Získaná proudová odezva je úměrná koncentraci analytu v měřeném roztoku. Mezi metody řadíme konduktometrii, potenciometrii, voltometrii, ampérometrii, coulometrii a elektrogravimetrii (*O'Mullane, 2013*).

Elektrochemické metody umožňují citlivou a selektivní detekci elektrochemicky aktivních látek. Právě díky těmto vlastnostem je možné říci, že jsou levnější alternativou mnoha separačních a spektrofotometrických metod. Mezi výhody patří nejenom nízká pořizovací cena vybavení potřebného k měření, ale také velikost a mnohem menší náklady na následný provoz (*Vukojević et al., 2018*).

Metody měření dělíme na rovnovážné a dynamické. Mezi rovnovážné řadíme takové metody, které využívají studia látek za rovnovážných podmínek. Jako příklad lze uvést potenciometrické metody. Naopak při dynamických měřeních nejsou v systému rovnovážné podmínky a tím pádem se měří buď za konstantního potenciálu, čehož využívají potenciostatické metody, nebo za konstantního proudu, což je využito v galvanostatických metodách (*Suljkanović et al., 2019*).

Zmíněné typy měření vyžadují ke svému fungování nejméně dvě elektrody ponořené ve vodivém roztoku (elektrolytu) s analyzovanou látkou. (*O'Mullane, 2013*).

3.2 Voltametrie

Voltametrie je elektrochemická metoda, při které jsou sledovány změny v proudové odezvě v závislosti na měnícím se potenciálu. Vyjádřením závislosti mezi těmito veličinami je voltametrická křivka (voltamogram), která nám poskytuje informace o zkoumaném analytu. Pod voltametrické metody patří cyklická voltametrie, stejnosměrná voltametrie a obdobné elektrochemické techniky, mezi které řadíme například staircase voltametrii, square-wave voltametrii a fast-scan voltametrii. Ve všech případech se využívá tříelektrodeového systému, který bude blíže popsán v následujících kapitolách společně s druhy voltametrie, které byly součástí praktické části práce (*Hussam, 2006*).

3.2.1 Cyklická voltametrie

Jedná se o metodu, která je založena na dopředném, tzv. forward skenu a zpětném tzv. reverse skenu. Výsledný graf tedy vypadá jako série trojúhelníkových potenciálových cyklů, kdy je každý cyklus složen ze dvou skenů. Cyklická voltametrie je v praxi hojně využívána pro zkoumání termodynamiky redoxních procesů, energetických hladin elektrolytu a kinetice elektron-transferových reakcí (*Francis et al., 2022*).

Při průběhu cyklické voltametrie je využíváno potenciostatu, který vkládá do systému potenciál mezi pracovní a referentní elektrodu. Jakmile potenciostat dojde ke svému přednastavenému limitu, začne vkládat potenciál opačný. Tento způsob vkládání vede ke charakteristickému grafu zaznamenaných proudových změn, který má tvar kachny (duck-shaped plot) a je označován jako cyklický voltamogram. Zjednodušenou verzí je voltametrie s lineárním skenem (linear sweep voltammetry), která obsahuje pouze jeden ze skenů, na základě toho, jestli daná látka oxiduje nebo redukuje na pracovní elektrodě. Tato metoda je velmi užitečná v případě ireversibilních systémů, u kterých by opačný sken neposkytl žádné nové informace (*Azam, 2022*).

3.2.2 *Square-wave voltametrie (SWV)*

Square-wave voltametrie je jednou z nejrychlejších a nejvíce citlivých metod pulzní voltametrie. Její detekční limity mohou být přirovnány ke chromatografickým a spektroskopickým metodám. Za typický tvar SWV mohou aplikace potenciálů o různé výšce (pulzní amplitudě), která je závislá na potenciálovém kroku (E_{step}) a času (t). Proud je měřen na konci každého pulzu a do grafu je zaznamenán rozdíl dvou po sobě změřených hodnot. Potenciál vkládaný na elektrodu je modulován střídavým napětím pravoúhlého tvaru. Kromě amplitudy a potenciálového kroku je měření významně ovlivněno frekvencí. Výsledný graf má podobu píku. Mezi výhody SWV patří malý nabíjecí proud, rychlost měření a možnost optimalizace mnoha parametrů (*Simões et al., 2017*).

4 TYPY PRACOVNÍCH ELEKTROD

Pro elektrochemická měření jsou používány různé typy elektrod. Mezi nejčastěji používané patří elektrody ze skelného uhlíku. Jako další lze jmenovat borem dopované diamantové elektrody, nebo kovové elektrody. Do své vlastní kategorie spadají pastové elektrody, které lze namíchat přímo v laboratoři. V současnosti jsou velmi oblíbené tištěné elektrody vzhledem ke své miniaturní velikosti a skladnosti. V následujících kapitolách budou podrobně popsány pracovní elektrody, které byly posléze využity v rámci praktické části diplomové práce.

4.1 Elektroda ze skelného uhlíku (GCE)

Elektroda ze skelného uhlíku patří mezi nejčastěji používané uhlíkové elektrody. Uhlík, ze kterého je vyrobena má vlastnosti podobné sklu, to znamená, že není propustný pro většinu kapalin a plynů. Skelný uhlík tohoto typu vzniká za extrémních podmínek (1000 °C pod tlakem) z negrafitického uhlíku a to pyrolýzou vhodného polymeru jakou je např. fenolová pryskyřice. GCE je v praxi používána pro svoji tvrdost, široký potenciálový rozsah, dobrou vodivost a nízký elektrický odpor (*Youngmi Yi, 2017*).

Elektroda je před měřením aktivována mechanickým leštěním, které může být také použito v průběhu měření pro odstranění adsorbovaných látek na povrchu elektrody. Při čištění se obvykle využívá n-hexan nebo destilovaná voda, ve spojení s leštící ploškou, na které je nasypáno malé množství oxidu hlinitého (*Lü et al., 1999*).

V roce 2018 byla elektroda ze skelného uhlíku použita pro měření cholekalciferolu v čistém acetonitrilu a směsi ethanolu s vodou. Cílem práce bylo sledování oxidačního mechanismu látky. Bylo využito diferenčně pulzní voltametrie. Detekční limit získaných výsledků byl $8,0 \times 10^{-7} \text{ M}$. Práce dospěla k závěru, že GCE je vhodným nástrojem pro analýzu potravin a léků (*Nallbani et al., 2018*).

4.2 Borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE)

Diamant je ve své podstatě nejtvrdší přírodní krystalickou formu uhlíku. Jeho struktura je uspořádána v krychlové mřížce, která je tvořena sp^3 vázanými hybridizovanými uhlíky. Uspořádání propůjčuje diamantu vlastnosti, které jsou velmi žádané – chemická inertnost, odolnost vůči korozi, vysoká tepelná vodivost a optická transparentnost (*Stanković et al., 2017*).

Samotný diamant je obvykle dopován dalšími látkami, neboť sám o sobě je výborný izolátor, který má velmi vysoký elektrický odpor. Častou příměsí je bor, pro svou nízkou aktivační energii náboje. K výrobě borem dopovaného diamantu je obvykle použita plynná směs methanu a vodíku, ve které je zároveň přítomen oxid boritý nebo diboran jako zdroj boru. Na rozdíl od většiny ostatních elektrod dochází na povrchu BDDE k minimální adsorpci, což znamená, že elektrodu není třeba pravidelně leštit. Elektroda by ovšem měla projít určitým ošetřením před měřením (Pleskov, 2002).

V roce 2018 Vukojević a kol. stanovovali ergosterol s pomocí BDDE. Cílem jejich práce bylo optimalizovat podmínky elektrochemického stanovení ergosterolu a jeho porovnání se současnými spektrofotometrickými metodami. Práce stanovila jako nejvhodnější elektrolyt 0,1M směs acetonitrilu s hexafluorofosfátem tetrabutylamonným. Měření proběhlo za optimalizované amplitudy 70 mV a frekvence 110 Hz. Půlvalný potenciál se při měření pohyboval okolo 1,17 V s použitím bezvodé Ag/Ag⁺ referentní elektrody. V závěru práce byly porovnány výsledky získané pomocí elektrochemické metody square wave voltametrie a spektrofotometrické metody. Na obrázku 10 je patrné, že hodnoty byly skoro totožné, a proto bylo elektrochemické stanovení označeno za vhodnou alternativní metodu stanovení ergosterolu (Vukojević et al., 2018).

Sample	Developed method mg/kg	Spectrophotometric method mg/kg
1	1240 ± 22	1233
2	860 ± 15	850
3	400 ± 9	406

Obrázek 10: Výsledky získané při elektrochemickém a spektrofotometrickém stanovení ergosterolu ve třech odlišných houbových extraktech. Převzato z: (Vukojević et al., 2018)

4.3 Pastové elektrody

Pastové elektrody se poprvé objevily v roce 1958, kdy s nimi přišel americký elektroanalytik Ralph Norman Adams. Původní pastová elektroda je směsí uhlíkového prášku a ve vodě nerozpustných pojidel – olejů. Jako uhlíkový prášek může velmi dobře sloužit obyčejný grafitový prášek, prášek ze skelného uhlíku, shungitový prášek nebo prášek z uhlíkových nanotrubic. Pojidlem celé směsi je obvykle minerální nebo silikonový olej, ale můžeme se setkat i s vazelínou, parafinem a trikresylfosfátem. Obyčejná uhlíková pasta ovšem nevydrží organické prostředí. Nedávno proto vznikla studie, která upravuje původní pastové elektrody a přidává do nich povrchově aktivní látky, tenzidy, které do určité míry chrání povrch pasty před desintegrací. Mezi takové látky řadíme dodecylsulfát sodný (SDS), cetylpyridin chlorid, cetyltrimethyl amonný, bromid

didodecyldimethylamonný a další. Pasty jsou homogenizovány v třecí misce s tloučkem. Na základě zkušenosti autorů je doporučeno nejdříve smíchat povrchově aktivní látku s olejem a až poté do směsi přimíchat uhlíkový prášek. Když je pasta hotova, je umístěna do prázdného teflonového těla elektrody se závitovým vodivým pístem. Velikou výhodou těchto elektrod je možnost vytlačení kusu pasty po každém měření, což řeší možné problémy s adsorpcí analytu na povrch elektrody (*Jashari et al., 2022*).

V roce 2021 byla v rámci diplomové práce Mgr. Kateřiny Netíkové použita nevodná pastová elektroda pro elektrochemické stanovení cholekalciferolu s použitím diferenčně pulzní voltametrie. Anodický pík byl přítomen okolo potenciálu 1,14 V. Pro měření byla nastavena amplituda o velikosti 60 mV a potenciálový krok o velikosti $E_{\text{step}} = 2,5$ mV. Jako elektrolyt byl použit 0,1 M LiClO₄ v MeCN. Pastová elektroda byla porovnána s klasickou z elektrody ze skelného uhlíku. Na základě srovnání limitu detekce a kvantifikace, LOD pastové elektrody = 5,350 μM a LOQ = 17,834 μM a LOD skelné uhlíkové elektrody = 17,924 μM a LOQ = 59,747 μM, bylo v závěru práce určeno, že nevodná pastová elektroda je citlivější, než-li elektroda ze skelného uhlíku (*Netíková, 2021*).

4.4 Tištěné elektrody

Tištěné elektrody jsou mnohem menší než jejich protějšky. Jediná tištěná elektroda obvykle obsahuje celé tříelektrodové uspořádání, tedy pracovní, referenční i pomocnou elektrodu. Vzhledem k jejich velikosti je možné měřit i ve velmi malých objemech. Elektrody se mezi sebou liší svým složením, které předurčuje jejich vlastnosti a odolnost. Obvyklé komerčně používané tištěné elektrody jsou uhlíkové (screen-printed carbon electrodes). V roce 2018 byla vytvořena tištěná elektroda s použitím borem dopovaného diamantového prášku (BDDP). Tento prášek je možné připravit vrstvením borem dopované diamantové vrstvy na povrch komerčně prodáváného diamantového prášku. Vzhledem k tomu, že elektrodě mohou sloužit různé materiály jako substrátový podklad, je možné použít takové, které jsou lehké, levné a pružné. Tímto způsobem dostaneme elektrody, které jsou relativně snadno nahraditelné a zároveň disponují schopností vysoce citlivé elektrochemické detekce. V rámci studie bylo zjištěno, že BDDP tištěná elektroda je odolnější a vykazuje menší šum pozadí než obvyklá tištěná uhlíková elektroda (*Kondo et al., 2018*).

V roce 2022 Matvieiev a kol. měřili senzitivu tištěných borem dopovaných diamantových elektrod pro protizánětlivý lék zvaný Iornoxicam. Tyto elektrody byly vyrobeny pomocí mikrovlnného chemického depozičního systému. Elektrody poskytují velké potenciálové okno, minimální šum

pozadí a jsou velmi odolné vůči pasivaci. Zároveň se vyznačují svou nízkou cenou. Testování elektrod proběhlo s pomocí cyklické voltametrie a redoxních sond (Matvieiev et al., 2022).

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Seznam použitých přístrojů, pomůcek, chemikálií a pracovních roztoků

5.1.1 Chemikálie a roztoky

Pro přípravu elektrolytů a použitých standardů byly použity chemikálie s čistotou pro analytické účely. Pro elektrolyt o koncentraci 0,05M-0,5M byl použit bezvodý acetonitril (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a chlornan lithný LiClO₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Jako standard byl použit ergosterol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), ze kterého byly připraveny zásobní roztoky 2mM a 5mM) rozpuštěním v acetonitrilu. Pro extrakce byl použit bezvodý methanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a dichlormethan (J.T. Baker, Randor, Pensylvánie, USA). Ethanol (Lach-Ner s.r.o, Neratovice, Česká republika) byl použit pro oplachování měřící cely.

Pro přípravu tenzidových elektrod byl použit Sigradur G skelný uhlík (od HTW Hochtemperatur-Werkstoffe, Německo), jako surfaktant dodecylsulfát sodný (SDS od Aldrich Chemical Company, Inc., USA) a parafinový olej.

5.1.2 Použité přístroje a pomůcky

Seznam použitých přístrojů a pomůcek je uveden v následující tabulce (Tabulka 1) v abecedním uspořádání.

Tabulka 1: Přístroje a pomůcky použité v diplomové práci.

Přístroje a pomůcky	Výrobce		
AUTOLAB PGSTAT 30 – potenciostat	Metrohm Autolab	Utrecht	Nizozemí
HI 190M - magnetické míchadlo	Hanna Instruments	Smithfield	USA
Leštící set na elektrody	Metrohm	Herisau	Švýcarsko
Membránová vakuová pumpa	Vacuubrand	Wertheim	Německo
Měřící cely	Metrohm	Herisau	Švýcarsko
NOVA – software	Metrohm Autolab	Utrecht	Nizozemí
PalmSens2 – potenciostat	Palm Instrument	Eindhoven	Nizozemí
PSTrace – software	Palm Instrument	Eindhoven	Nizozemí
Rotina 420R – centrifuga	Schoelle Instruments s.r.o.	Praha	ČR
RVC 2-18 CDplus CHRIST – vakuový koncentrátor	Martin Christ		Německo
Scaltec SBC 32 - analytické váhy	Scaltec Instruments	Göttingen	Německo

5.1.3 Příprava standardu

V průběhu experimentů došlo ke zjištění, že ergosterol je nutné připravovat čerstvý vždy před každým měřením. Proto byly upraveny podmínky přípravy standardního roztoku. Zpočátku byl používán bezvodý 100 % acetonitril, a pro rozpuštění bylo potřeba zvýšené teploty a homogenizace v ultrazvukové lázni. Protože je ergosterol špatně rozpustný v acetonitrilu i za těchto podmínek, bylo zkoušeno rozpouštění ve směsi aceton/acetonitril 1:9 v/v. Ergosterol je rozpuštěn v acetonu a doplněn acetonitrilem. Tato metoda přípravy standardního roztoku se osvědčila, neboť zkrátila dobu přípravy standardního roztoku bez toho, že by narušila voltamogramy výsledné koncentrace ergosterolu.

5.1.4 Použité elektrody

Pro měření byly použity tištěné elektrody (Obrázek 10), konkrétně SP-BDDE s borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou, stříbrnou referentní elektrodou a pomocnou diamantovou elektrodou (plocha pracovní elektrody $7,07 \text{ mm}^2$) z Ústavu fotoniky a elektroniky (SP-BDDE Pt), Slovenské technické univerzity v Bratislavě, Slovensko, komerčně dostupné tištěné elektrody SP-BDDE s borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou, stříbrnou referentní elektrodou, ale pomocnou elektrodou uhlíkovou (plocha pracovní elektrody $10,18 \text{ mm}^2$) od firmy Metrohm, Herisau, Švýcarsko (SP-BDDE Metrohm).

V tříelektrodovém uspořádání s klasickými elektrodami byly použity: elektroda ze skelného uhlíku (GCE) s plochou pracovní elektrody $7,07 \text{ mm}^2$ (Metrohm, Herisau, Švýcarsko), borem dopovaná diamantová elektroda (BDD) s plochou $7,07 \text{ mm}^2$ (Windsor Scientific, Slough, UK). Jako pomocná elektroda byla použita platinová elektroda (Elektrochemické Detektory s.r.o., Trnov, Česká republika) a referentní argentchloridová Ag/AgCl (Metrohm, Herisau, Švýcarsko).

V neposlední řadě byly použity pastové elektrody s plochou $7,07 \text{ mm}^2$, které byly připraveny smícháním skelného uhlíku Sigradur G (HTW Hochtemperatur-Werkstoffe, Německo), parafínového oleje a tenzidu SDS (dodecylsulfát sodný, Aldrich Chemical Company, Inc., USA).

5.2 Podmínky elektrochemické detekce

5.2.1 Elektrochemické čištění (aktivace) cyklickou voltametrií

Při měření s GCE a nevodnými pastovými elektrodami bylo před vlastním měřením provedeno elektrochemické čištění v roztoku základního elektrolytu (0,1M LiClO₄ v bezvodém acetonitrilu 95 % v/v) pomocí cyklické voltametrie. Bylo provedeno deset skenů za podmínek uvedených v tabulce 2. Pastové elektrody prošly tolika skeny, dokud nebylo dosaženo reprodukovatelné odezvy. Pro tištěné elektrody nebylo elektrochemické čištění použito.

Tabulka 2: Podmínky elektrochemické aktivace

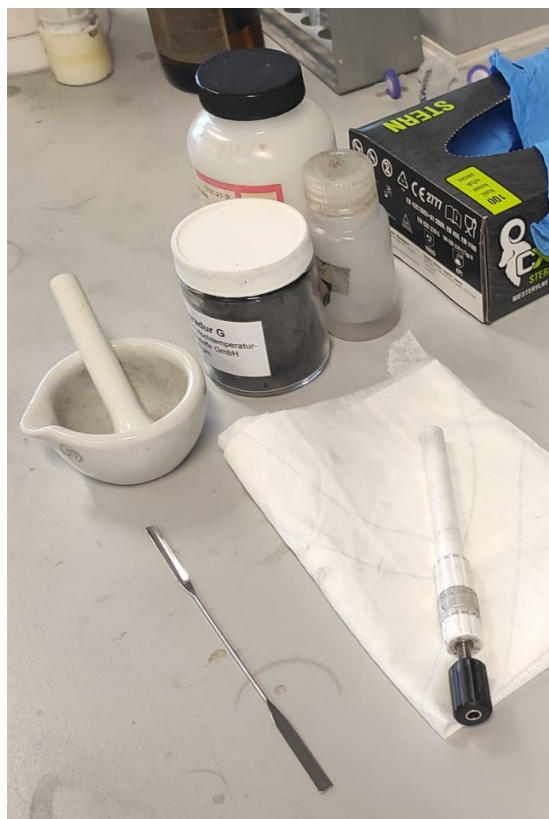
T_{ekv}	8 s
$E_{\text{poč}}$	0 V
$E_{\text{vertex 1}}$	0V
$E_{\text{vertex 2}}$	1,6V
E_{krok}	0,0025V
Rychlost skenu	0,1V/s
Počet skenů	10

GCE elektroda byla mezi jednotlivými kroky měření vždy leštěna práškem oxidu hlinitého za mokra. Tento krok nebyl prováděn pro BDDE elektrodu, neboť zde nedochází k pasivaci povrchu elektrody. SPE-BDDE byly v případě potřeby čištěny v ultrazvukové lázni v n-hexanu (1 min).

5.2.2 Příprava pastových elektrod

V našem případě byly připraveny nevodné pastové elektrody, a to smícháním uhlíkového prášku, oleje a tenzidu. Vzhledem ke zkušenostem pana doktora Sýse byl jako nejlepší hmotnostní poměr vybrán 7:2:1 w/w/w, skelný uhlík Sigradur G o velikosti částic 10-20 μm (HTW Hochtemperatur-Werkstoffe, Německo), parafinový olej a tenzid C12 SDS (dodecylsulfát sodný, Sigma-Aldrich, St. Luis, USA) Byly připraveny rozmělněním tenzidu v oleji a následným přidáním uhlíkového prášku. Připravená pasta byla homogenizována ve třecí misce, dokud směs neměla pastovitou strukturu. Následně byla pasta napěchována do teflonového držáku (průměr 3 mm) (*Obrázek 11*). Samotné měření bylo prováděno až druhý den, neboť čerstvé pasty nejsou elektrochemicky stabilní. Měření

probíhalo v tříelektrodovém uspořádání s argentschloridovou referentní elektrodou (Metrohm, Herisau, Švýcarsko) a pomocnou platinovou elektrodou (Elektrochemické Detektory s.r.o., Trnov, Česká republika). Pracovní elektroda byla mezi každým měřením vyleštěna jemným otočením pístu a vytlačení kousku pasty na filtrační papír.



Obrázek 11: Teflonové tělo elektrody, třecí miska, zásobní lahvičky s olejem, uhlíkem a tenzidem. (foto autorka)

5.2.3 Elektrochemická detekce square-wave voltametrií

Měřící cela byla naplněna 0,1M LiClO₄ v bezvodém acetonitrilu, který byl použit jako elektrolyt. Tento elektrolyt byl vybrán na základě výsledků předchozí diplomové práce. Měření probíhalo v objemu 10 nebo 15 ml pro klasické tříelektrodové uspořádání a v 5 ml pro tištěné elektrody. Do cely s elektrolytem byl přidáván zásobní roztok ergosterolu (5 mM nebo 2 mM) v objemu pro dosažení požadované koncentrace. Zásobní roztok ergosterolu byl udržován ve tmě kvůli stabilitě. Roztok byl před měřením míchán nejméně 60 s pomocí mechanického míchadla. Pro měření byl použit potenciostat PalmSens2 a software PStace, pro měření s tenzidovými elektrodami byl použit software 1.11 NOVA Autolab. Měření probíhalo square-wave voltametrií za podmínek uvedených v *Tabulce 3*.

Tabulka 3: Square-wave voltametrie – použité detekční podmínky

$E_{\text{kond.}}$	-0,15 V
$E_{\text{dep.}}$	0,6 V
$t_{\text{dep.}}$	150 s
$t_{\text{ekvil.}}$	8 s
$E_{\text{poč.}}$	0,4 V
$E_{\text{konc.}}$	1,2 V
E_{krok}	0,005 V
Amplituda	0,045 V
Frekvence	10 Hz

5.3 Obecný postup extrakce

Byly testovány a postupně upraveny čtyři odlišné extrakční postupy, které vycházely z informací uvedených v literatuře a byly upraveny pro naše podmínky. V první fázi byly vyzkoušeny výtěžnosti jednotlivých extrakcí za pomoci standardu ergosterolu o hmotnosti 2,1 a 2,3 mg, které byly rozpuštěny v 5 ml 10 % KOH v methanolu. Po vybrání dvou nejlepších extrakcí byly jejich pomocí zpracovány reálné vzorky čistých kultur plísní *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium tricinctum*, *Mucor racemosus*, *Cladosporium herbarum* a *Aspergillus brasiliensis* a vzorky pečiva naočkované stejnými kulturami plísní (Obrázky 14-18). U vzorků plísní na médiu bylo opatrně odsáto médium. Všechny vzorky plísně o hmotnosti 2 g byly homogenizovány v 10 ml 10 % KOH v methanolu.

První extrakční postup

Vzorek ve zkumavce byl rozpuštěn v 10 ml 10 % KOH v methanolu. 15 minut byl třepán při laboratorní teplotě a poté byl umístěn na 10 minut do ultrazvukové lázně. Poté k němu bylo přidáno 5 ml hexanu a zkumavka byla inkubována 15 minut při 60°C. Následně byly ke směsi přidány 2 ml deionizované vody a hexanová vrstva byla odebrána do čisté zkumavky. Hexan byl do směsi přidán celkem třikrát v průběhu celé extrakce. Odebrané hexanové frakce byly smíchány a odpařeny ve vakuovém koncentrátoru při 55 °C. Výsledný odparek byl rozpuštěn v elektrolytu (0,1M LiClO₄/95 % ACN v/v).

Druhý extrakční postup

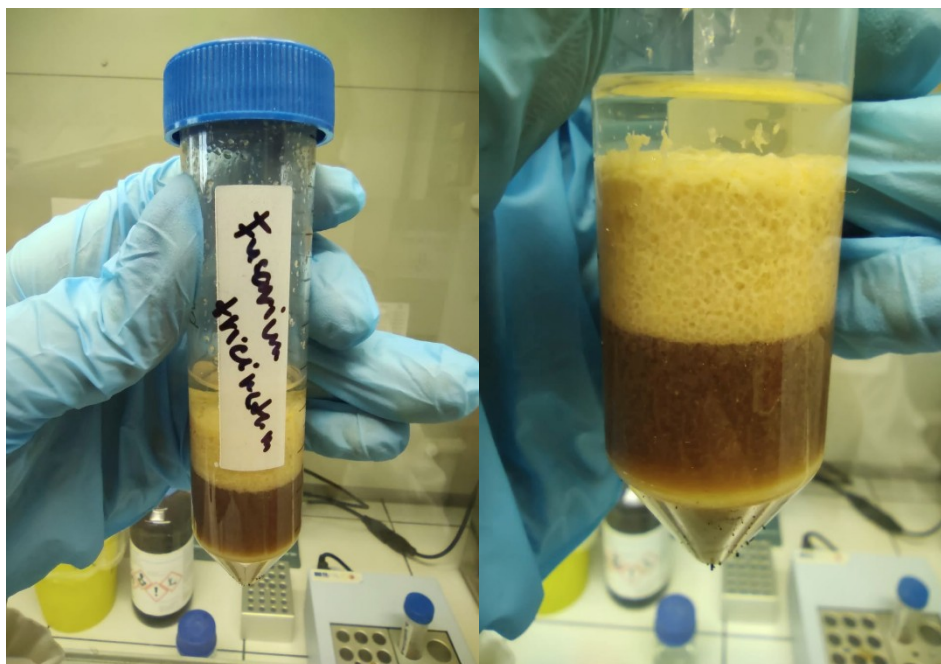
Ve druhé extrakci byla místo hexanu použita směs n-hexan/methanol v poměru 1:4 (v/v). Ergosterol byl rozpuštěn v 10 ml této směsi a 30 minut třepán. Po této době byly do zkumavky přidány 2 ml 10 % KOH a roztok byl znovu třepán (15 minut). Pak byly ke směsi přidány 2 ml ultračisté vody, směs byla ručně 30 sekund třepána. Po oddělení organické a vodné fáze byla organická vrstva odebrána do centrifugační zkumavky. Po odebrání organické frakce bylo do směsi znovu přidáno 5 ml n-hexan/methanol 1:4 (v/v) a byl opakován stejný postup do odebrání organické fáze. Tento postup byl zopakován v celém extrakčním postupu celkem třikrát. Odebrané hexanové frakce byly smíchány a odpařeny ve vakuovém koncentrátoru při 55 °C. Výsledný odparek byl rozpuštěn v elektrolytu (0,1M LiClO₄/95 % ACN v/v).

Třetí extrakční postup

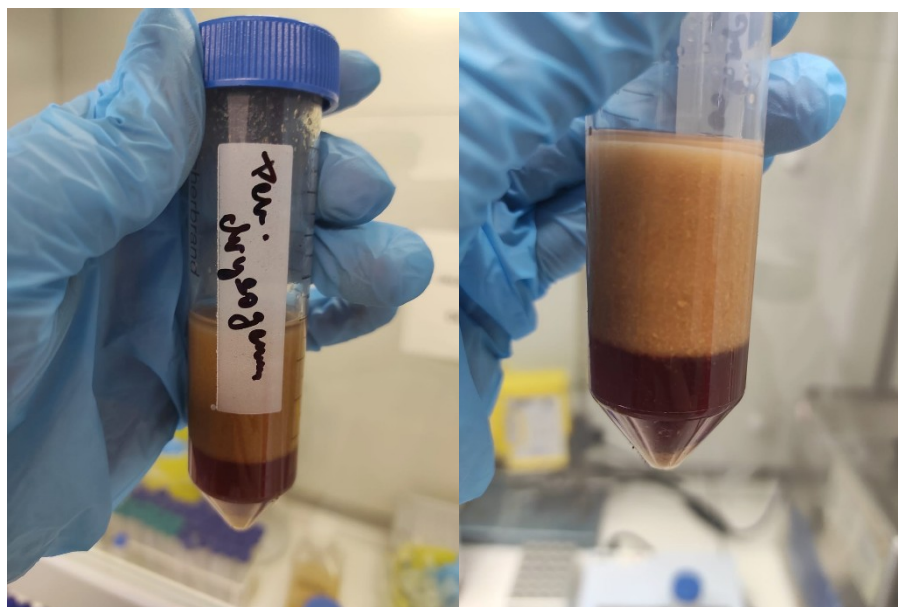
Vzorek byl rozpuštěn ve směsi methanol/dichlormethan (v/v). Směs byla vždy 30 minut třepána, pak do ní bylo znovu přidáno 5 ml směsi rozpouštědel. Tento postup byl třikrát zopakován. V závěru byla ze zkumavky odebrána organická frakce, která byla odpařena v koncentrátoru při 55 °C. Výsledný odparek byl rozpuštěn v elektrolytu (0,1M LiClO₄/95 % ACN v/v).

Čtvrtý extrakční postup

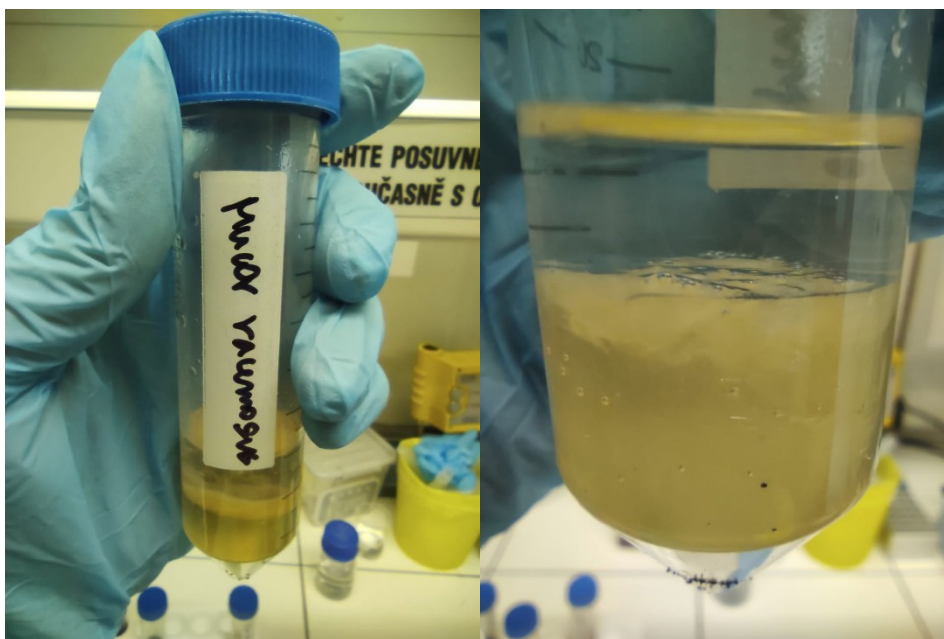
Vzorek byl rozpuštěn v 10 ml 10 % KOH v methanolu. Směs byla 30 sekund třepána a posléze inkubována 30 minut v 80 °C. Po ochlazení byl do zkumavky přidán 1 ml deionizované vody a 5 ml hexanu. Směs byla 30 sekund třepána v ruce. Po třepání byla směs ponechána v klidu, aby došlo k oddělení vodné a organické fáze. Hexanové frakce byly odebrány do samostatné zkumavky. Přídavek hexanu a následné třepání bylo takto opakováno v rámci celé extrakce třikrát. Získané hexanové frakce byly odpařeny na koncentrátoru při 55 °C. Výsledný odparek byl rozpuštěn v elektrolytu (0,1M LiClO₄/95 % ACN v/v).



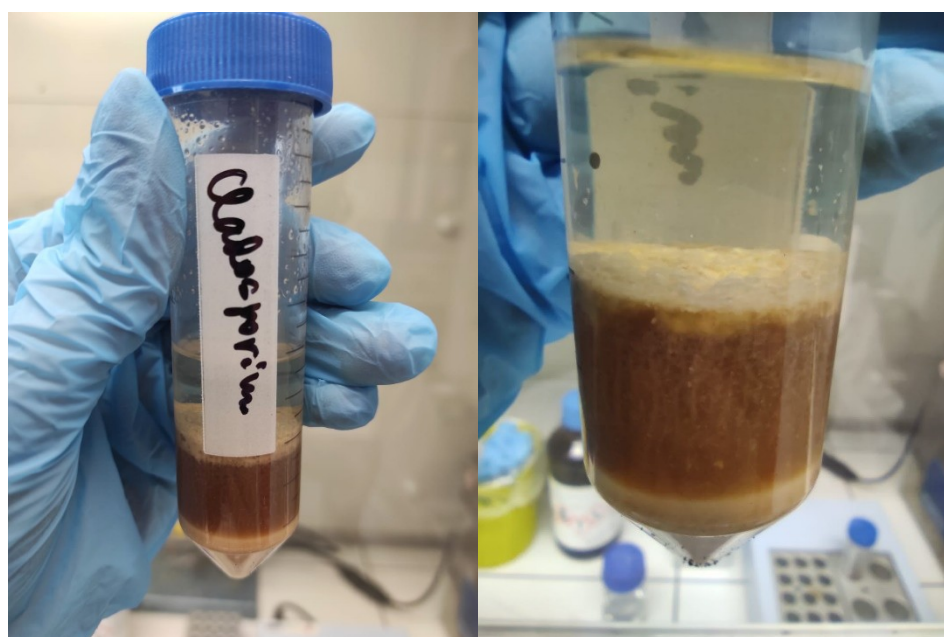
Obrázek 12: Reálný vzorek *Fusarium tricinctum*, narostlý na kontaminovaném pečivu, který byl homogenizován v 10 ml 10 % KOH v methanolu a byl k němu přidán 1 ml deionizované vody a 5 ml hexanu.
(foto autorka)



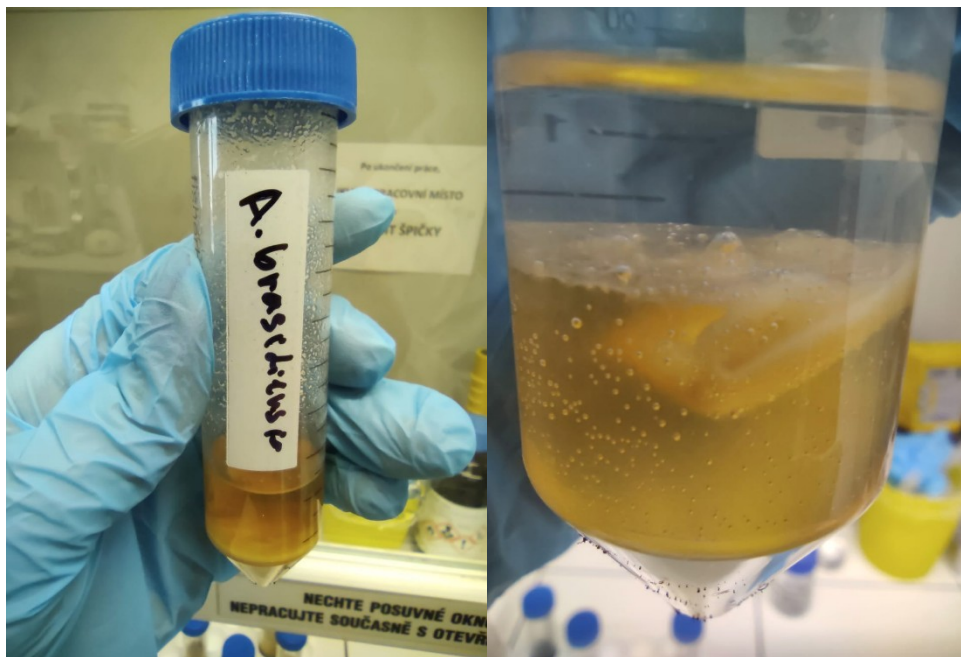
Obrázek 13: Reálný vzorek *Penicillium chrysogenum*, narostlý na kontaminovaném pečivu, který byl homogenizován v 10 ml 10 % KOH v methanolu a byl k němu přidán 1 ml deionizované vody a 5 ml hexanu. (foto autorka)



Obrázek 14: Reálný vzorek *Mucor racemosus* narostlý na médiu, který byl homogenizován v 10 ml 10 % KOH v methanolu a byl k němu přidán 1 ml deionizované vody a 5 ml hexanu. (foto autorka)



Obrázek 15: Reálný vzorek *Cladosporium herbarum*, narostlý na kontaminovaném pečivu, který byl homogenizován v 10 ml 10 % KOH v methanolu a byl k němu přidán 1 ml deionizované vody a 5 ml hexanu. (foto autorka)



Obrázek 16: Reálný vzorek *Aspergillus brasiliensis* narostlý na médiu, který byl homogenizován v 10 ml 10 % KOH v methanolu a byl k němu přidán 1 ml deionizované vody a 5 ml hexanu. (foto autorka)

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato diplomová práce se zabývala elektrochemickým stanovením ergosterolu ve vzorcích čistých kultur plísní a vzorků potravin uměle kontaminovaných vybranými plísněmi. Cílem bylo porovnat vybrané metody extrakce ergosterolu ze vzorků a optimalizovat podmínky přípravy vzorku. Pro měření byly také porovnávány různé pracovní elektrody.

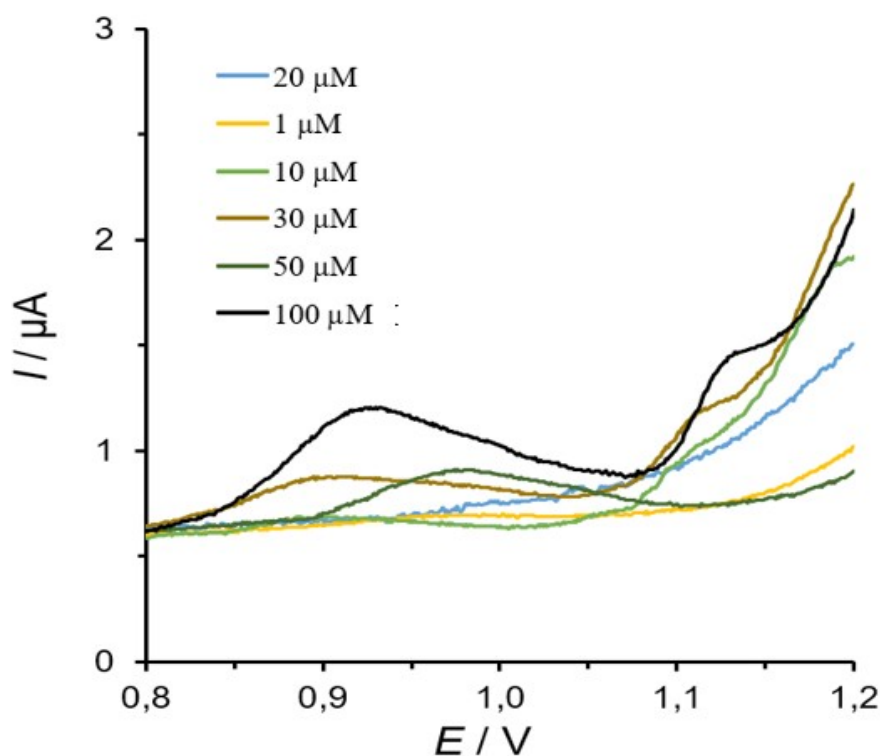
V práci bylo použito několik druhů pracovních elektrod, konkrétně elektroda ze skelného uhlíku (GCE, Metrohm, Herisau, Švýcarsko), borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE, Windsor Scientific, Velká Británie) a uhlíková pastová elektroda s příměsí tenzidu. Vedle klasických elektrod byly pro stanovení ergosterolu testovány i tištěné tříelektrodové senzory, konkrétně tištěné tříelektrodové senzory s borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou, referentní argentchloridovou a pomocnou diamantovou elektrodou, které byly poskytnuty z Fakulty Elektrotechniky a informatiky, Slovenské technické univerzity v Bratislavě (SP-BDDE, tým Dr. Mariána Vojse) a komerční tištěné tříelektrodové senzory s borem dopovanou diamantovou pracovní, referentní stříbrnou a uhlíkovou pomocnou elektrodou (SP-BDDE, Metrohm, Švýcarsko). Práce navazovala na předešlou diplomovou práci, proto byly pro měření použity již zavedené podmínky elektrochemické detekce ergosterolu. Výjimku tvořily nově použité uhlíkové pastové elektrody s příměsí tenzidu (tzv. nevodné pastové elektrody), pro které byla dodatečně optimalizována frekvence pulzu a amplituda. Zvolenou detekční metodou pro stanovení ergosterolu byla square-wave voltametrie.

Cílem experimentů bylo vybrat nejvhodnější z testovaných extrakčních postupů a s jeho pomocí zpracovat a proměřit reálné vzorky.

6.1 Tištěné tříelektrodové senzory s borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou

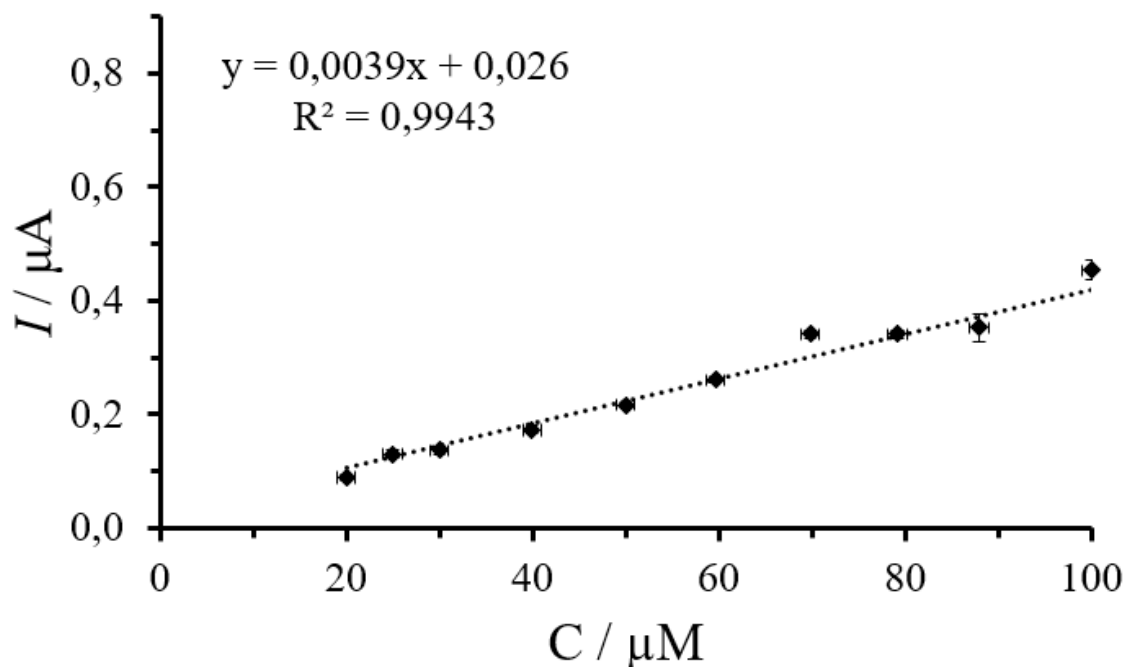
Mezi vyzkoušené tištěné tříelektrodové senzory patřily komerčně dostupně tištěné SP-BDD elektrody od firmy Metrohm (Švýcarsko), které obsahují borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodu, stříbrnou referentní elektrodu a uhlíkovou pomocnou elektrodu (dále označovány jako SP-BDDE Metrohm). Pro měření ergosterolu square-wave voltametrií byly použity podmínky uvedené v *Tabulce 3* kap. 5.2.3.

Voltamogram nemá standardní průběh (*Obrázek 19*). Je tomu tak zřejmě z důvodu uhlíkové pomocné elektrody, která není stabilní v prostředí organického rozpouštědla, ve kterém byla měření prováděna. Každá vyzkoušená komerční elektroda tohoto typu vydržela maximálně pět měření. Navíc, získané voltamogramy nebyly reprodukovatelné, docházelo k posunu potenciálu maxima píku, při kterém byla odečítána proudová odezva. Zároveň se při potenciálu 1,1 V začal objevovat parazitický pík, pravděpodobně způsobený poškozením referentní elektrody (*Obrázek 17*).



Obrázek 17: SW-voltamogram standardu ergosterolu v rozmezí 1-100 µM koncentrace
Měřeno na elektrodě SP-BDDE Metrohm. Měření probíhalo v 0,1M LiClO₄ ve 100%
bezvodém acetonitrilu.

I přes špatnou reprodukovatelnost byly výsledky zaznamenány a byla z nich vytvořena kalibrační křivka. Každá z hodnot byla naměřena třikrát a ze získaných průměrných hodnot byla sestavena kalibrační křivka (Obrázek 18).

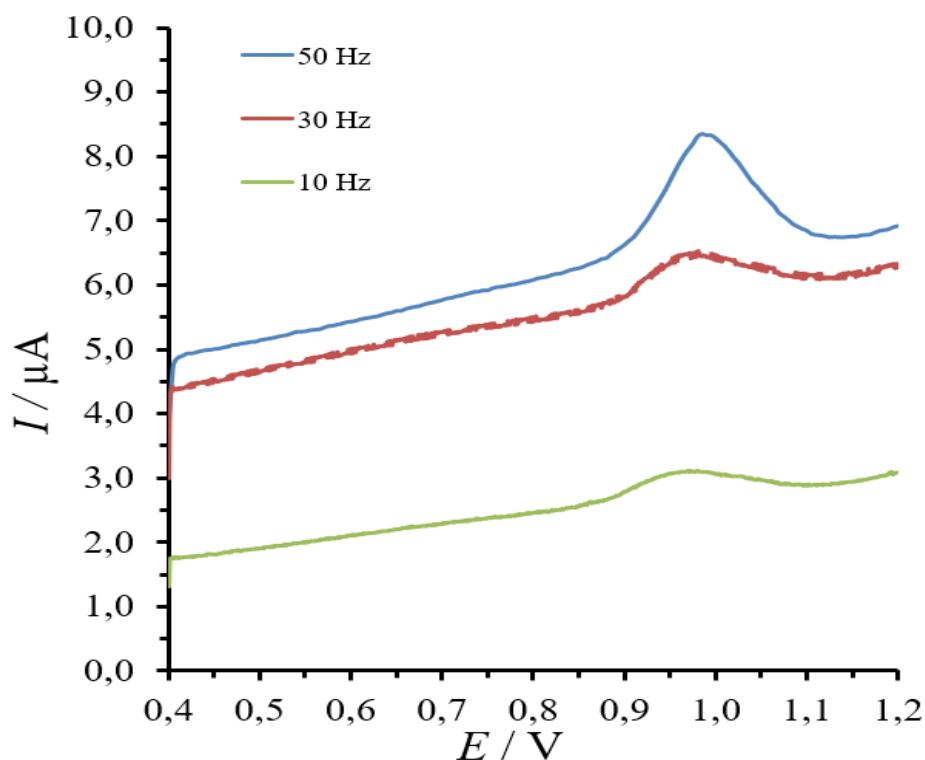


Obrázek 18: Kalibrační křivka závislosti proudové odezvy na koncentraci ergosterolu v roztoku.

Měřeno pro SP-BDDE Metrohm elektrodu. Použitý elektrolyt 0,1M LiClO₄ ve 100 % acetonitrilu. Hodnoty jsou průměrem tří měření.

Protože byla proudová odezva odečítána při rozdílných potenciálech, je křivka uvedena pouze pro úplnost. Elektrody nebyly dále používány ve striktně organickém prostředí.

Díky spolupráci se slovenským Ústavem fotoniky a elektroniky jsme měli k dispozici tříelektrodové tištěné senzory s borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou, stříbrnou referenční a pomocnou diamantovou elektrodou (dále označovány jako SP-BDDE Pt). Pro měření byly použity podmínky uvedené v kap. 2.5.3. Při měření jsme nastavili frekvenci na 50 Hz, neboť poskytovala lepší výsledky (Obrázek 19). Zároveň byl upraven depoziční čas na 10 s, u kterého byly totožné výsledky s časem 150 s. V následujících měřeních s těmito elektrodami byly používány takto upravené podmínky měření.

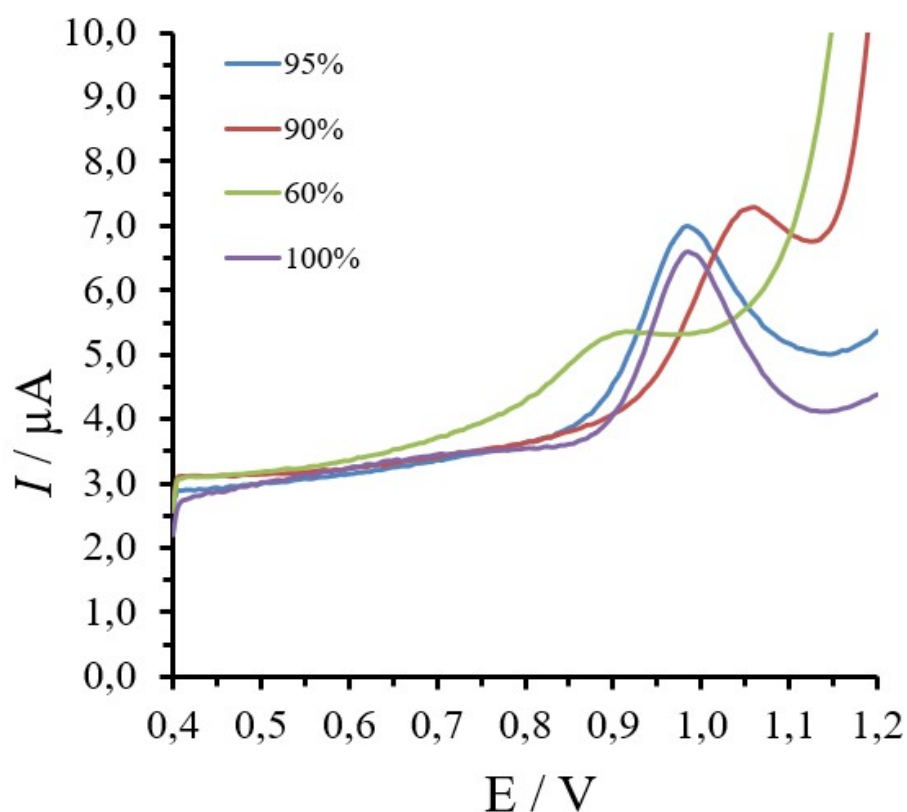


Obrázek 19: SW voltamogram pro optimalizaci frekvence.

Měřeno na SP-BDDE Pt. Použitý elektrolyt 0,1M LiClO₄ ve 100 % bezvodém acetonitrilu. Proudová odezva byla odečítána při potenciálu 0,95 V. Koncentrace ergosterolu v roztoku byla 50 µM

6.1.1 Optimalizace elektrolytu – příměs vody

Vzhledem k agresivitě organického prostředí, které silně poškozovalo používané komerční tištěné elektrody SP-BDDE Metrohm, jsme vyzkoušeli pozměnit používaný elektrolyt. Porovnány mezi sebou byly roztoky 0,1M LiClO₄ v 60 %, 90 %, 95 % a 100 % acetonitrilu (Obrázek 20).



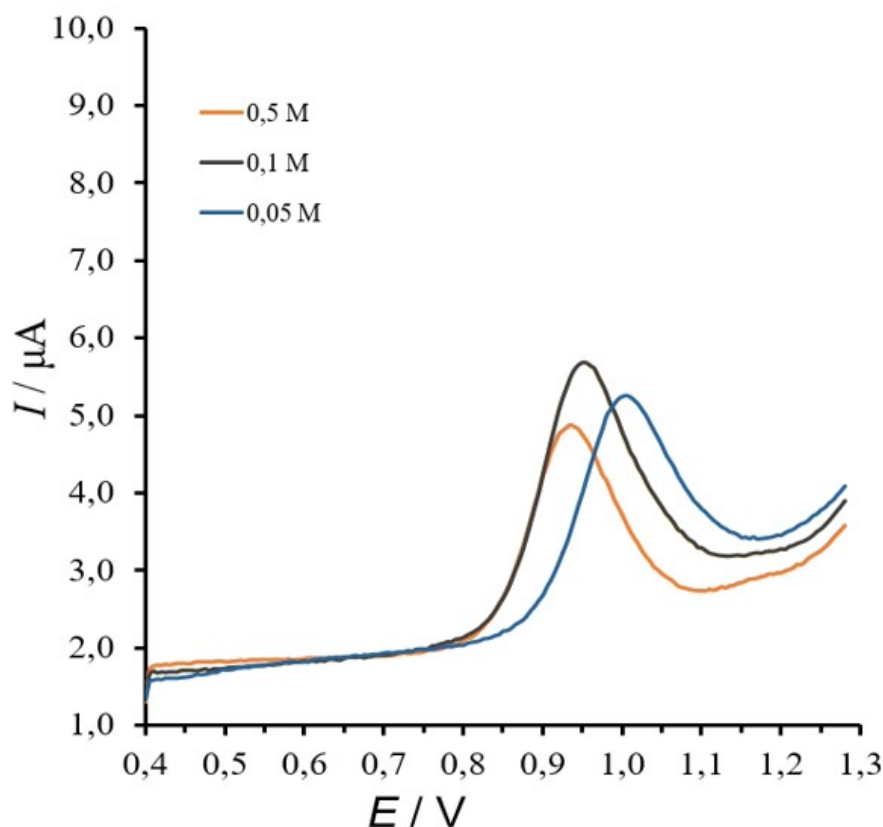
Obrázek 20: SW voltamogram závislosti proudové odezvy na potenciálu při použití odlišných poměrů acetonitrilu s destilovanou vodou.

*Měřeno na SP-BDDE Pt. Proudová odezva byla odečítána při potenciálu maxima píku.
Koncentrace ergosterolu v elektrolytu byla 50 μM.*

Rozdíly mezi elektrolytem s obsahem 95 % acetonitrilu a 100 % acetonitrilu nebyly pro proudovou odezvu příliš významné. Elektrolyt s příměsí vody byl ovšem mnohem šetrnější k tištěným elektrodám, a proto byl použit pro další měření.

6.1.2 Optimalizace elektrolytu – koncentrace chloristanu

V práci byly vyzkoušeny tři koncentrace chloristanu v používaném elektrolytu. Byly zkoušeny koncentrace 0,05 M, 0,1 M a 0,5 M LiClO₄ v acetonitrilu. Bylo zkoušeno, jestli jiné koncentrace nemohou pozitivně ovlivnit proudovou odezvu (Obrázek 21).



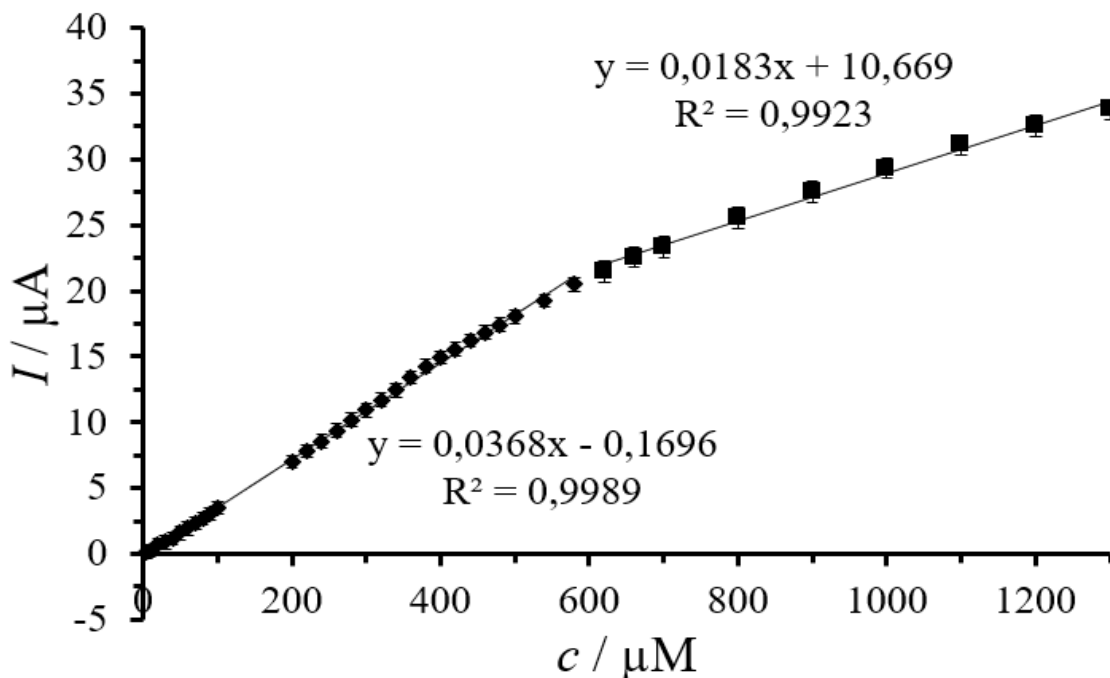
Obrázek 21: SW voltamogram pro koncentrace 0,05-0,5 M chloristanu lithného v 95 % acetonitrilu.

Měření bylo provedeno pro tři rozdílné koncentrace chloristanu a to pro 0,05M, 0,1M a 0,5M. Použitá koncentrace ergosterolu byla 100 μM. Jako elektroda byla využita SP-BDDE Pt.

Na základě výsledků bylo shledáno, že nižší i vyšší koncentrace chloristanu lithného v elektrolytu nemá pozitivní vliv na výsledný pík. Následující experimenty byly proto nadále prováděny s 0,1 M koncentrací chloristanu.

6.1.3 Kalibrační křivka pro kvantifikaci ergosterolu s SP-BDDE Pt

Po optimalizaci podmínek měření a přizpůsobení elektrolytu byla změřena koncentrace 0-1300 μM pro tištěnou SP-BDD Pt elektrodu. Měření bylo provedeno šestkrát pro každou koncentraci ergosterolu. U vysokých koncentrací docházelo ke zlomu kalibrační křivky a lze pozorovat dva lineární úseky (Obrázek 22).



Obrázek 22: Kalibrační závislost mezi proudovou odezvou a koncentrací ergosterolu 0-1300 μM .

Měřeno pomocí tištěné SP-BDDE Pt elektrody. Použitý elektrolyt 0,1 M LiClO_4 v 95 % acetonitrilu. Maxima píků byla zaznamenána při potenciálu 0,95 V.

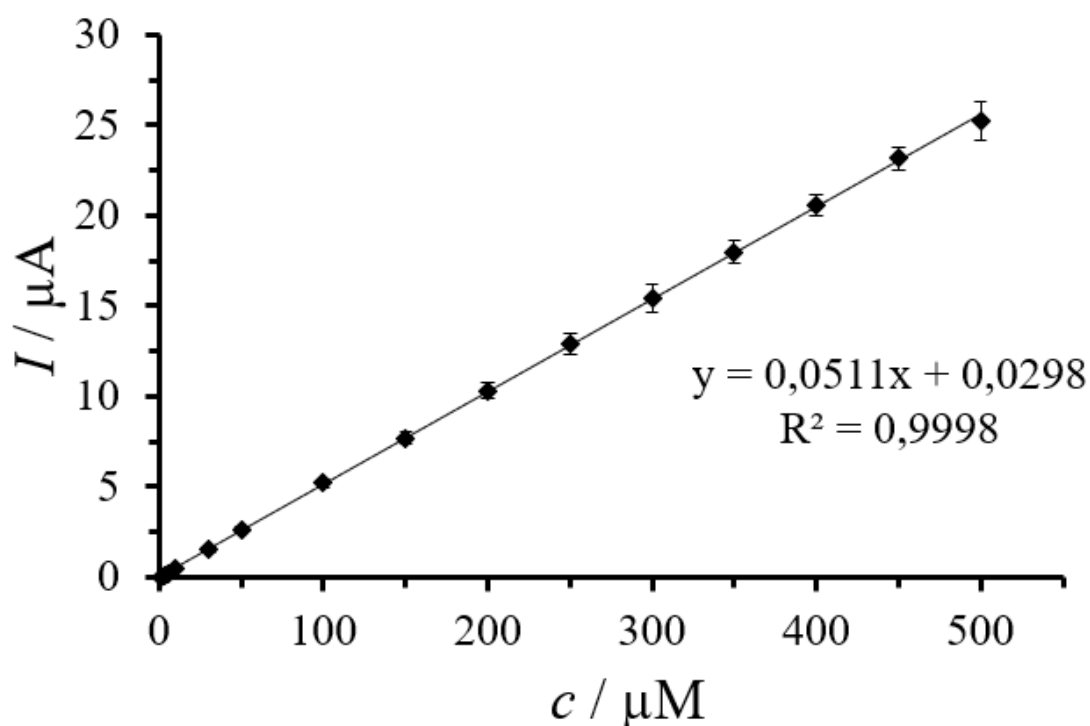
Protože reálné vzorky nepřesáhly hranici 500 μM , druhá spojnice trendu nebyla použita.

Měření bylo provedeno znovu pouze pro koncentrace 0-500 μM (Obrázek 23). Chybové úsečky byly vypočítány na základě studentova t-testu pro šest měření dle rovnice:

$$x \pm \frac{s * t_{0,05}}{\sqrt{n}}$$

kde x je průměrná hodnota, s směrodatná odchylka, $t_{0,05}$ 95% stupeň volnosti pro $n-1$ a n počet měření.

Při měření byly použity optimalizované podmínky z kap. 5.2.3, s upravenou frekvencí 50 Hz a depozičním časem 10 s. Pro měření byl připraven vždy čerstvý roztok ergosterolu ve směsi aceton/acetonitril 1:9 (v/v).



Obrázek 23: Kalibrační křivka závislosti proudové odezvy na koncentraci v rozmezí 0-500 μM koncentrace ergosterolu.

Měřeno na SP-BDDE Pt. Jedná se o závislost proudové odezvy na koncentraci ergosterolu. Použitý elektrolyt 0,1 M LiClO_4 v 95 % acetonitrilu. Maxima piků, která byla do této křivky zanesena se nacházela při potenciálu 0,95 V.

6.2 Nevodné pastové elektrody

Pro stanovení ergosterolu byly vedle obvykle používaných elektrod zkoušeny i uhlíkové pastové elektrody s přidavkem tenzidu, tzv. nevodné pastové elektrody. Výhodou těchto elektrod je obnovitelnost jejich povrchu a zcela upravitelné složení. Je možné připravit a upravit elektrodu podle konkrétních požadavků na měření. Nevodné pastové elektrody jsou složeny z tenzidu a uhlíkového prášku. Na základě publikace od Jashari a kol. byl použit hmotnostní poměr mezi uhlíkovým práškem, parafínovým olejem a tenzidem C12-SDS 7:2:1 (*Jashari et al., 2022*). Pro přípravu byl vyzkoušen silikonový a parafínový olej. Lepších výsledků bylo dosaženo s parafínovým olejem, který byl proto použit pro všechny další experimenty.

Tenzid obsažený v pastě chrání elektrodu před přímým působením organické fáze, která je použita jako elektrolyt, v našem případě 0,1M LiClO₄ v bezvodém acetonitrilu.

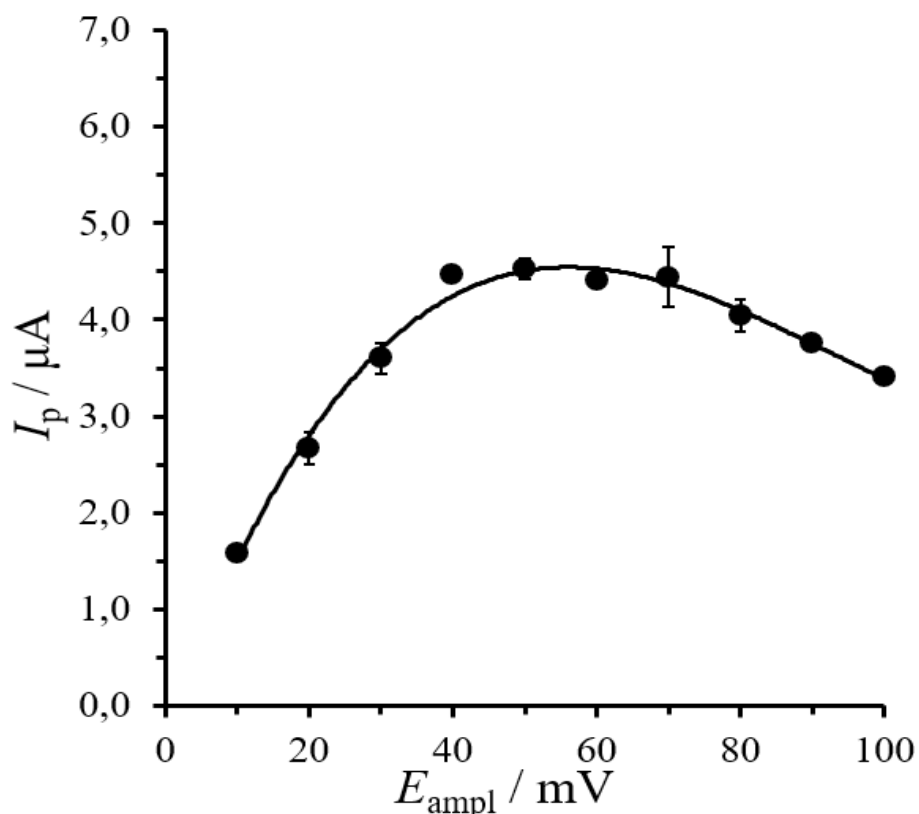
Bylo provedeno pět měření standardu ergosterolu o koncentraci 50 μM. Měření probíhalo nejprve s jednou elektrodou bez jejího čištění mezi jednotlivými měřeními. Protože postupně rostla proudová odezva, bylo potvrzeno, že povrch elektrody pasivuje a je potřeba jej obnovovat mezi jednotlivými měřeními (viz. *Tabulka 4*).

Tabulka 4: Porovnání pěti měření provedených pro neměněný a leštěný povrch elektrody.

	stejný povrch	vždy nový
<i>n</i>	<i>I_p</i> / μA	<i>I_p</i> / μA
1	2,800	2,800
2	3,416	2,926
3	3,605	2,789
4	3,695	2,986
5	3,890	3,092
6	3,962	3,182

6.2.1 Optimalizace amplitudy pro nevodnou pastovou elektrodu

Pro měření s nevodnými pastovými elektrodami byly optimalizovány parametry elektrochemické detekce, amplituda a frekvence. Ostatní parametry byly stejné (viz. Kap. 5.2.3.- *Tabulka 3*) pro všechny použité elektrody a vycházely z předešlé práce. Amplituda byla v každém měření měněna po 10 mV (*Obrázek 24*).



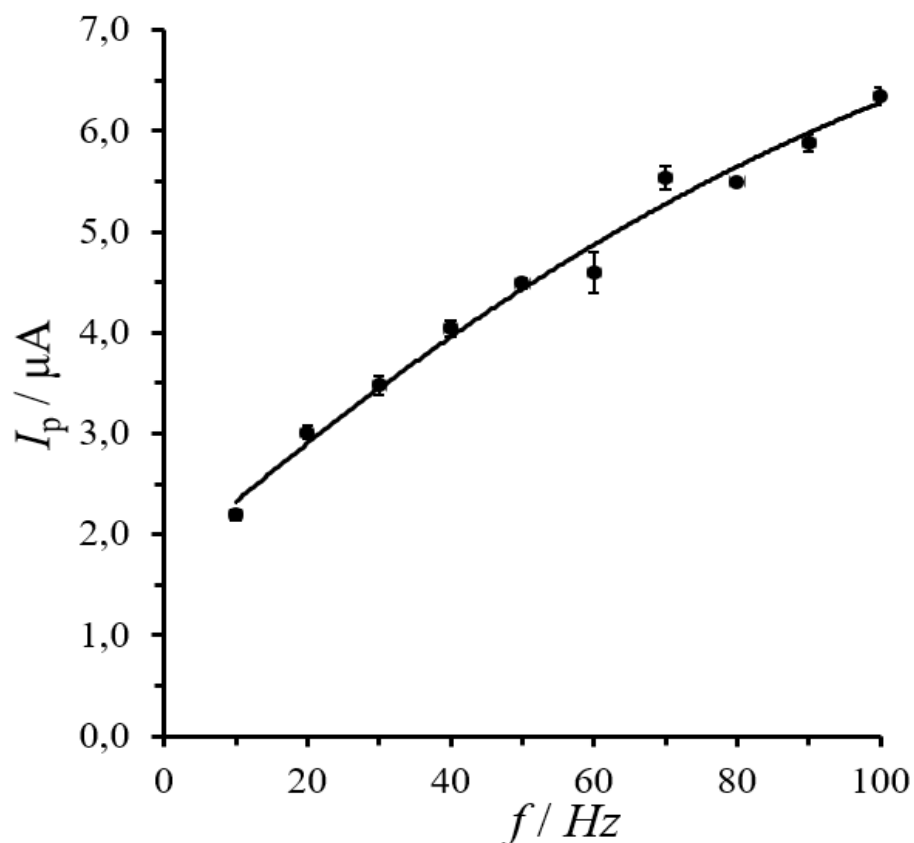
Obrázek 24: Určení optimální amplitudy pro nevodnou pastovou elektrodu.

Závislost proudové odezvy na amplitudě. Uvedené hodnoty jsou průměrem dvou měření. Použitý elektrolyt 0,1M LiClO₄ ve 100 % bezvodém acetonitrilu. Celková koncentrace ergosterolu v roztoku byla 50 μM.

Na základě výsledků měření byla jako optimální amplituda pro další měření s nevodnou pastovou elektrodou stanovena amplituda 40 mV.

6.2.2 Optimalizace frekvence pulzu nevodné pastové elektrody

Pro stanovení frekvence pulzu elektrody byla použita neměnná amplituda z předchozí optimalizace, tedy 40 mV. Jinak byly použity původní hodnoty (viz. Kap. 5.2.3 *Tabulka 3*). Frekvence byla zvyšována po 10 Hz.

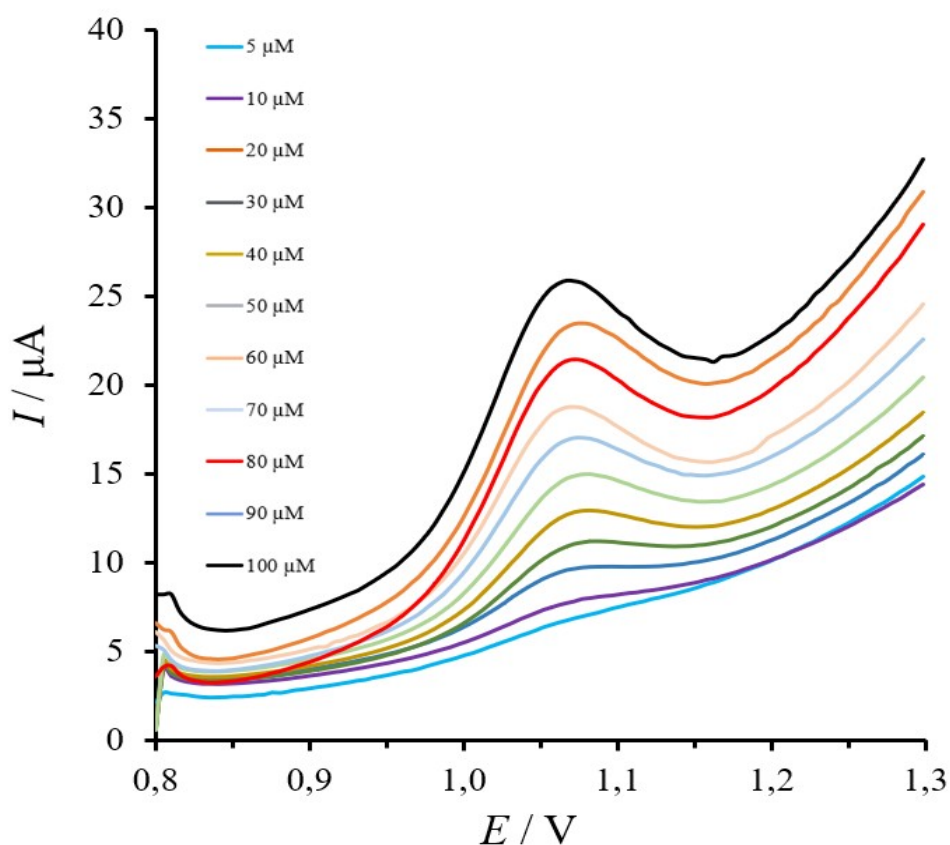


Obrázek 25: Určení optimální frekvence pulzu pro nevodnou pastovou elektrodu. Závislost proudové odezvy na frekvenci. Uvedené hodnoty jsou průměrem dvou měření. Elektrolyt 0,1M LiClO_4 ve 100% bezvodém acetonitrilu. Koncentrace ergosterolu v elektrolytu 50 μM .

Podle výsledků uvedených na *obrázku 25* se jako optimální frekvence jeví 80 Hz. Tato frekvence proto byla použita v následujících měřeních s nevodnou pastovou elektrodou.

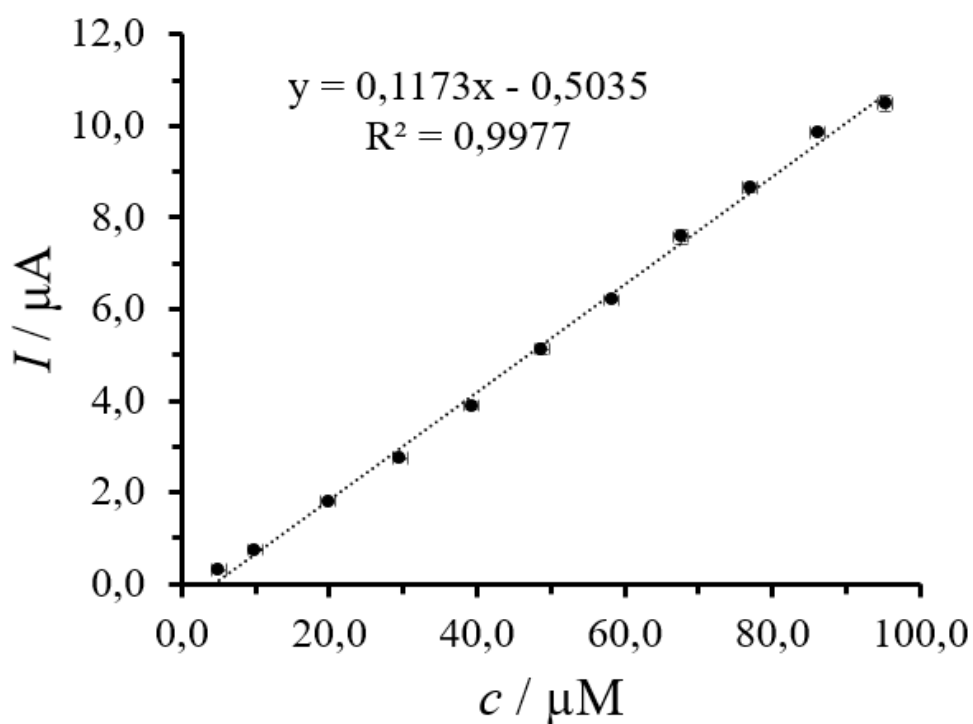
6.2.3 Kalibrační křivka pro kvantifikaci ergosterolu s nevodnou pastovou elektrodou

Za optimálních podmínek byla proměřena kalibrační řada standardu ergosterolu v koncentračním rozmezí 1-100 μM . Měření proběhlo v 0,1 M LiClO_4 ve 100 % bezvodém acetonitrilu. Pro každou koncentraci byla provedena dvě měření. Výsledný voltamogram je uveden na *obrázku 26*, na *obrázku 27* pak výsledná kalibrační závislost proudu na koncentraci ergosterolu. Hodnoty proudu byly odečítány při potenciálu maxima píku, tj. 1,075 V.



Obrázek 26: SW voltamogram závislosti proudové odezvy na potenciálu pro standard ergosterolu v rozmezí koncentrací 1–100 μM . Měření pro nevodnou pastovou elektrodu.

Použitý elektrolyt 0,1M LiClO_4 ve 100 % acetonitrilu. Maximum píku zaznamenáno při potenciálu 1,075 V. jako referentní byla použita argentchloridová elektroda s pomocnou platinovou elektrodou.



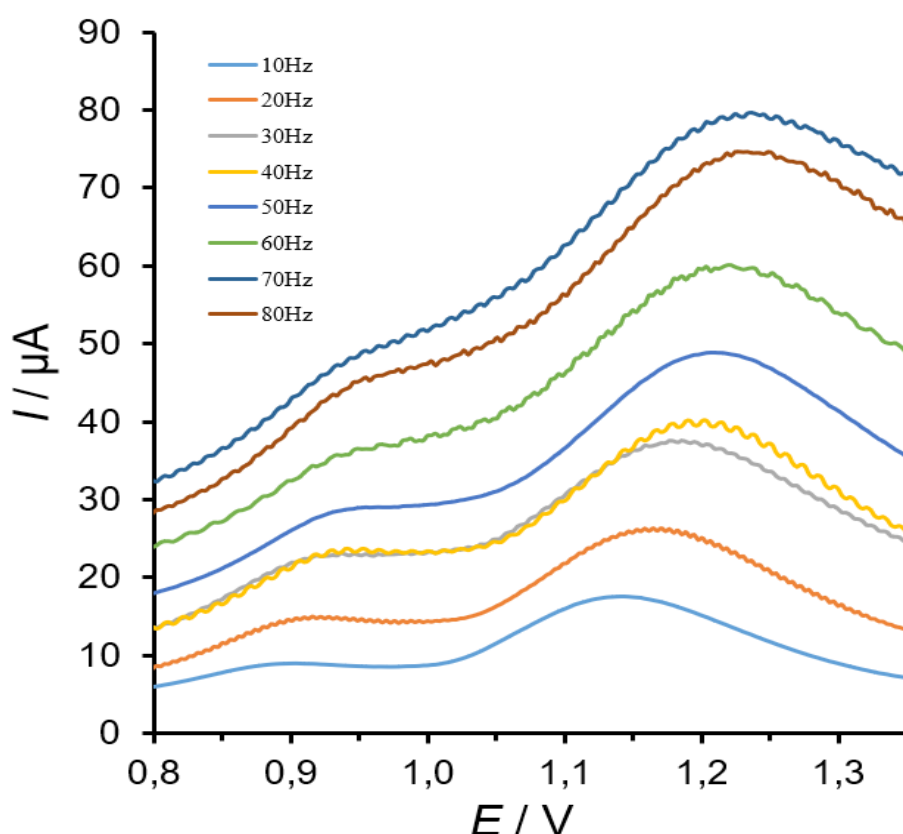
Obrázek 27: Kalibrační křivka závislosti proudové odezvy na koncentraci ergosterolu pro nevodnou pastovou elektrodu.

Použitý elektrolyt 0,1M LiClO₄ ve 100 % bezvodém acetonitrilu. Jedná se o průměr ze dvou měření, proudová odezva odečítána při potenciálu maxima píku, 1,075 V.

Při opakovaných měřeních bylo zjištěno, že je potřeba vždy připravovat čerstvý zásobní roztok standardu ergosterolu, protože při dlouhodobém skladování není měření reprodukovatelné, což je dáno omezenou stabilitou ergosterolu.

6.3 Elektroda ze skelného uhlíku a borem dopovaná diamantová elektroda

Měření s elektrodou ze skelného uhlíku a borem dopovanou diamantovou elektrodou probíhalo v tříelektrodovém zapojení. Jako referentní elektroda byla použita argentchloridová elektroda a platinová pomocná elektroda. Při měření byly použity optimalizované podmínky (viz. Kap. 5.2.3). Přesto byla znovu přeměřena frekvence pro skelnou uhlíkovou elektrodu (Obrázek 28), a nakonec bylo měřeno s frekvencí 50 Hz a depozičním časem 10 s.

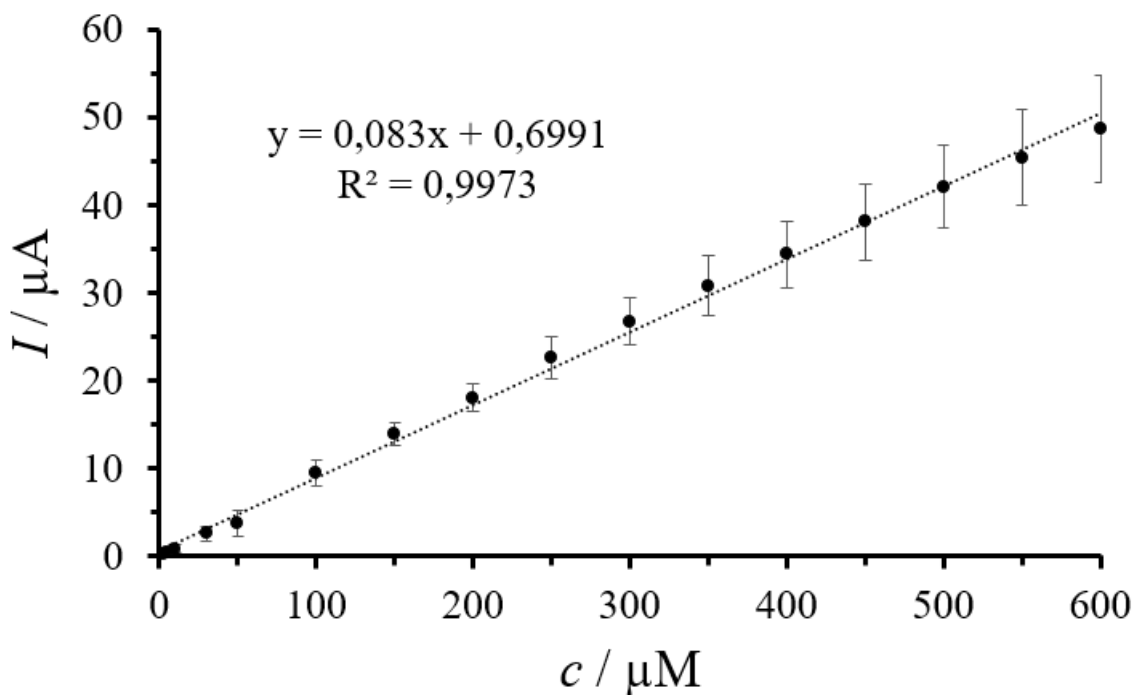


Obrázek 28: SW voltamogram optimalizace frekvence.

Měření bylo provedeno se skelnou uhlíkovou elektrodou ve spojení s referentní chloridostříbrnou elektrodou a pomocnou platinovou elektrodou. Maximum píku bylo zaznamenáno při potenciálu 1,2 V. Použitý elektrolyt byl 0,1M LiClO₄ ve 100 % bezvodém acetonitrilu.

6.3.1 Kalibrační křivka pro kvantifikaci ergosterolu pomocí elektrody ze skelného uhlíku

U skelné uhlíkové elektrody byla proměřena kalibrační řada koncentrace ergosterolu od 0-600 μM . Měření bylo provedeno celkem pětkrát. Z výsledných hodnot byla vynesena kalibrační závislost (Obrázek 29), do které byly zaneseny chybové úsečky, jejichž hodnoty byly vypočteny za pomoci studentova T-testu.



Obrázek 29: Kalibrační závislost mezi koncentrací ergosterolu 0-600 μM a proudovou odezvou.

Měřeno pro skelnou uhlíkovou elektrodu. Hodnoty byly získány jako průměr pěti měření. Jako referenční elektroda byla použita argentchloridová a jako pomocná platinová elektroda. Měření probíhalo v elektrolytu 0,1M LiClO_4 v 95 % acetonitrilu.

BDD elektroda nakonec byla testována pouze okrajově, neboť neposkytovala výsledky lepší než ostatní elektrody. Její citlivost byla velmi nízká a nebyla schopna zachytit menší koncentrace ergosterolu.

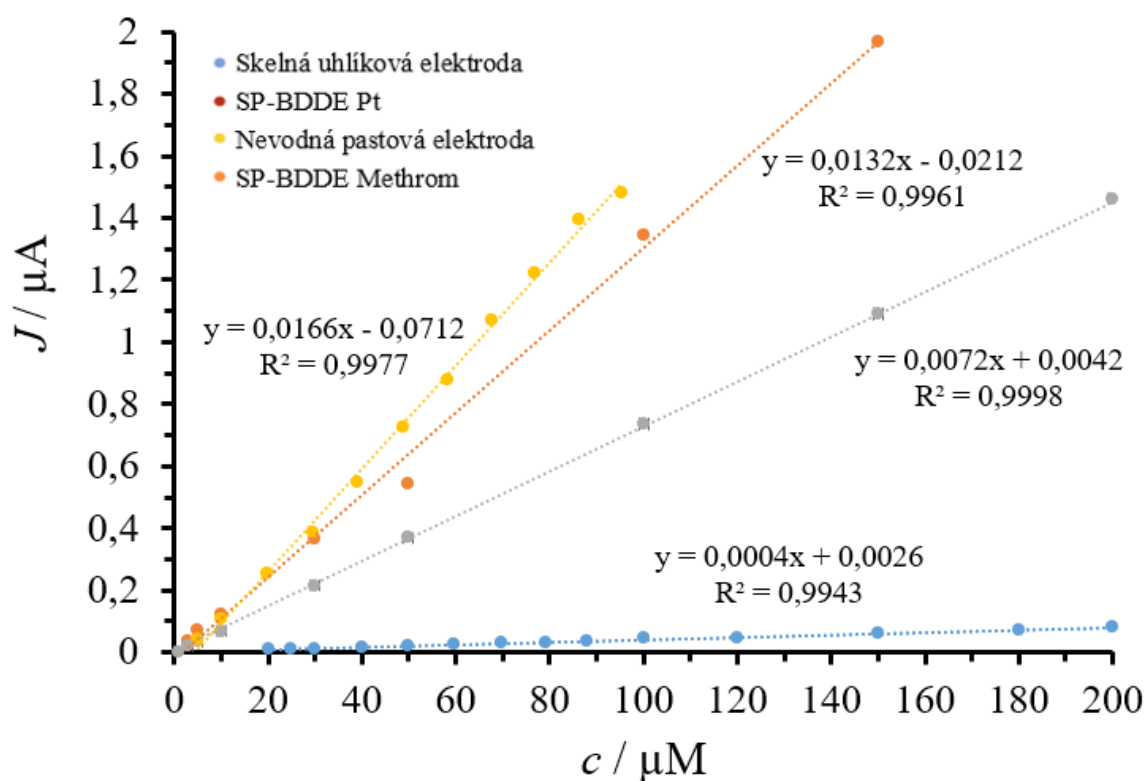
6.4 Proudová hustota

Zmíněné elektrody nemají stejnou geometrickou plochu. Aby je bylo možné porovnat, byla vypočítána proudová hustota na základě aktivní plochy elektrod a proudové odezvy. Jednotlivé geometrické plochy pro elektrody jsou uvedeny v kap. 5.1.3. Proudové hustoty byly vypočítány na základě rovnice:

$$J = \frac{I}{A}$$

kde J je proudová hustota, I proudová odezva a A aktivní plocha elektrody.

Na základě těchto hodnot byly sestaveny kalibrační závislosti, které byly zaneseny do stejného grafu (Obrázek 30).



Obrázek 30: Kalibrační závislost proudové hustoty a koncentrace ergosterolu 0-200 μM .

Měření bylo provedeno s elektrodou ze skelného uhlíku, nevodnou pastovou elektrodou, SP-BDDE Pt a komerční SP-BDDE Metrohm.

Na *obrázku 30* jsou vidět kalibrační závislosti jednotlivých elektrod. Nejlepších výsledků dosahuje nevodná pastová elektroda a druhou nejlepší je elektroda ze skelného uhlíku. Komerční SP-BDDE Metrohm nevykazuje kvalitní výsledky měření ve 100 % organickém prostředí.

6.5 Výpočet LOD a LOQ

Limit detekce a limit kvantifikace byly vypočítány na základě následujících vzorců:

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times \text{SMODCH}}{k}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \text{SMODCH}}{k}$$

kde LOD je limit detekce, SMODCH je směrodatná odchylka, k je směrnice přímky a LOQ je limit kvantifikace.

Pro vypočtení limitu detekce a kvantifikace bylo použito pět hodnot naměřených pro nejnižší měřitelnou koncentraci ergosterolu pro jednotlivé elektrody. V případě tenzidové elektrody se jednalo o 5 μM , pro tištěnou SP-BDDE Pt elektrodu se jednalo o 3 μM , u komerční SP-BDDE Metrohm to bylo 20 μM a pro elektrodu ze skelného uhlíku 3 μM . Výsledky byly zaznamenány do *Tabulky 5*.

Tabulka 5: Limit detekce a limit kvantifikace pro použité elektrody.

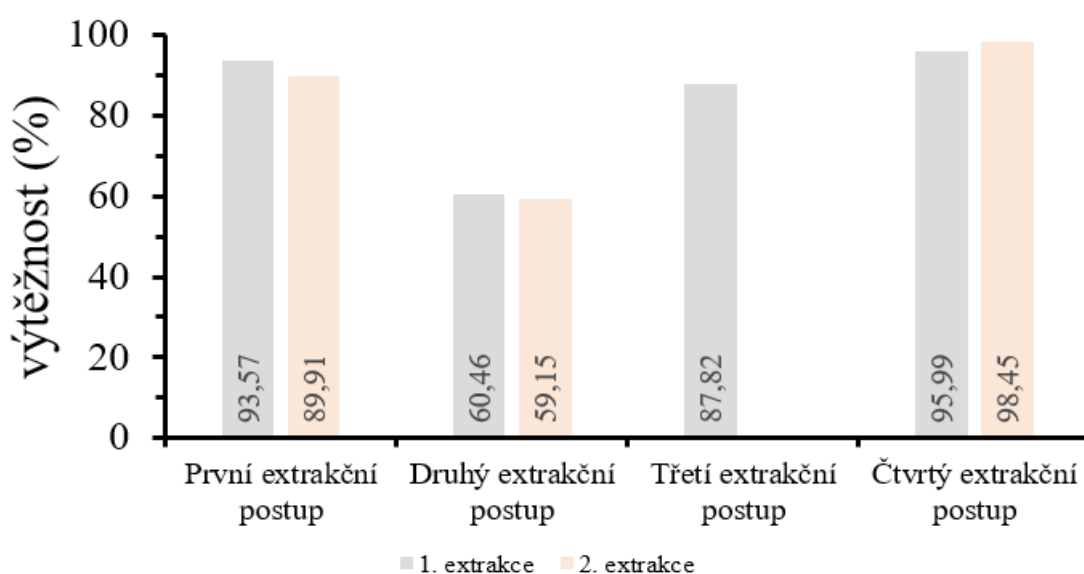
Měřeno se standardním roztokem ergosterolu.

	LOD (μM)	LOQ (μM)
Nevodná pastová	7,955	24,106
SP-BDDE Pt	0,678	2,054
SP-BDDE Metrohm	3,310	10,032
GCE	4,199	12,723

6.6 Extrakce ergosterolu

Pro ověření účinnosti extrakce byly nejprve všechny zvolené postupy použity pro extrakci s využitím standardu ergosterolu o koncentraci 50 μM . Postupy popsané v kap. 5.3 byly takto vyzkoušeny a modifikovány pro naše potřeby. Při extrakcích bylo použito rozpouštědlo n-hexan, směs methanol/n-hexan v poměru 1:4 (v/v) a směs methanol/dichlormethan (v/v). Zmíněná rozpouštědla byla kromě směsi methanol/dichlormethan (v/v) použita v kombinaci s 10 % KOH v methanolu. Pro měření výsledné koncentrace extrahovaných vzorků byla použita SP-BDDE Pt elektroda, neboť je nejcitlivější z porovnávaných elektrod.

Pro určení výtěžnosti modifikovaných extrakcí v kap. 5.3 jsme připravili samostatné vzorky, ve kterých bylo rozpuštěno 2,1 mg a 2,3 mg standardního ergosterolu a porovnali s výsledkem měření extrahovaného ergosterolu. Každý extrakční postup byl vyzkoušen celkem dvakrát. Pouze v případě třetího extrakčního postupu byl výsledek druhé extrakce kontaminován parazitickým píkem, který nebylo možné rozeznat od ergosterolu a proto není výsledek uveden.



Obrázek 31: Přehledový graf znázorňující jednotlivé výtěžnosti u všech čtyř vyzkoušených extrakcí s 2,1 mg a 2,3 mg standardního ergosterolu.

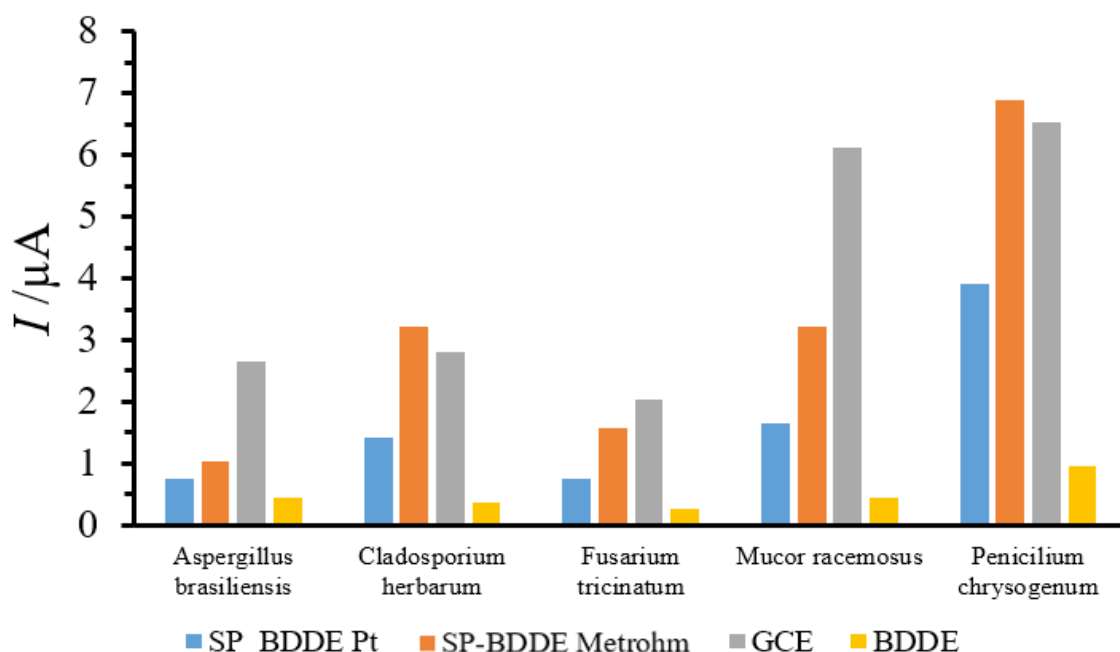
Měřeno pomocí SP-BDDE Pt.

Vzhledem k vysoké výtěžnosti prvního postupu bylo zvažováno jeho použití pro extrakci reálného vzorku.

Jako vybraný extrakční postup byl nakonec zvolen extrakční postup čtvrtý, který (jak vyplývá z obrázku 31) vykazoval největší výtěžnost.

6.7 Stanovení ergosterolu v reálných vzorcích

Použitelnost čtvrté extrakční metody byla vyzkoušena na reálných vzorcích čistých kultur *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium tricinctum*, *Mucor racemosus*, *Cladosporium herbarum* a *Aspergillus brasiliensis*. Kultury byly buď součástí média, nebo byly použity pro cílenou kontaminaci vzorku pečiva. Po extrakci byly sbírané hexanové frakce obsahující ergosterol odpařeny a pro měření byl odparek rozpuštěn v roztoku elektrolytu a analyzován s použitím BDDE, GCE a obou SP-BDDE elektrod. Výsledky jsou uvedeny na obrázku 32.



Obrázek 32: Sloupcový graf vyjadřující proudové odezvy jednotlivých elektrod u kultur narostlých na médiu, ze kterých byl ergosterol extrahován za pomoci čtvrtého extrakčního postupu.

Měření probíhalo v 0,1M LiClO₄ v 95% acetonitrilu v/v.

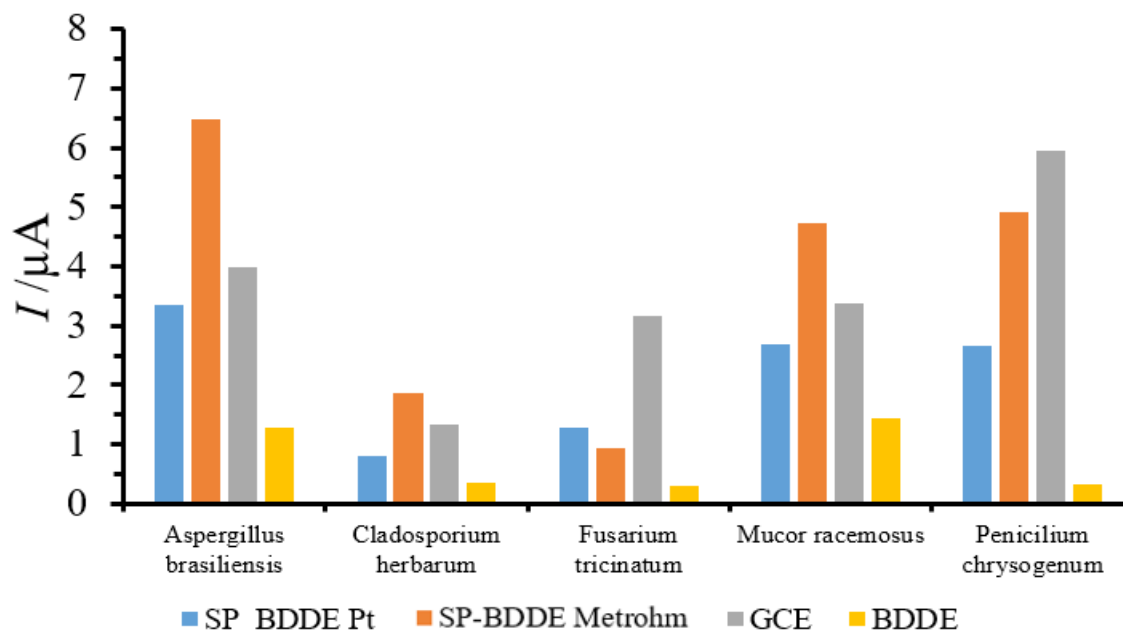
U Z výsledků je patrné, že každá kultura obsahovala jiné množství ergosterolu. Nejvíce ergosterolu obsahoval vzorek *Penicillium chrysogenum* a *Mucor racemosus*. Výsledky ukazují, že nejvyšší proudové odezvy byly získány z elektrody ze skelného uhlíku.

V tabulce 6 byly jednotlivé proudové odezvy pro GCE přepočítány do reálných koncentrací na základě kalibrační křivky v kap. 6.4.1.

Tabulka 6: Koncentrace ergosterolu u naočkovaného média, přepočítáno z rovnice kalibrační přímky pro elektrodu ze skelného uhlíku.

GCE	I / μA	c / μM
Aspergillus brasiliensis	2,666	23,70
Cladosporium herbarum	2,804	25,36
Fusarium tricinctum	2,027	16,00
Mucor racemosus	6,13	65,43
Penicilium chrysogenum	6,519	70,12

Kultury byly také extrahovány z uměle kontaminovaného pečiva, které bylo před extrakcí mechanicky homogenizováno v 10 ml 10 % KOH v methanolu.



Obrázek 33: Souhrnný graf proudových odezev pro jednotlivé elektrody u vzorků uměle kontaminovaného pečiva.

Měřeno v 0,1M LiClO₄ v 95 % acetonitrilu v/v.

Na obrázku 33 je viditelné, že největší množství ergosterolu obsahoval vzorek kontaminovaný *Aspergillus brasiliensis*. Rozdílná koncentrace ergosterolu u kultur narostlých na médiu a u kultur narostlých na kontaminovaném pečivu mohla být ovlivněna rozdílnou dobou růstu. Z časových důvodů se nepodařilo nastavit reálné vzorky tak, aby byly měřeny ve stejný den od naočkování.

Jako nejlepší elektroda vypadá SP-BDDE Pt a elektroda ze skelného uhlíku, které vykazují nejvyšší proudovou odezvu.

V *tabulce 7* byly jednotlivé proudové odezvy pro GCE přepočítány do reálných koncentrací na základě kalibrační křivky v kap. 6.4.1.

Tabulka 7: Koncentrace ergosterolu pro kontaminované pečivo, přepočítáno z rovnice kalibrační přímkou pro elektrodu ze skelného uhlíku.

GCE	I / μA	c / μM
Aspergillus brasiliensis	3,989	39,637
Cladosporium herbarum	1,329	7,589
Fusarium tricinctum	3,154	29,577
Mucor racemosus	3,374	32,228
Penicilium chrysogenum	5,956	63,336

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo stanovení ergosterolu pomocí elektrochemické detekce jako alternativní metoda k obvykle používaným metodám, jako je například HPLC. Zároveň byly vyzkoušeny a porovnány čtyři vybrané extrakce, s cílem najít nejvhodnější pro naše účely. Postupy byly v průběhu experimentů modifikovány do své konečné podoby, která byla vyzkoušena u reálných vzorků.

V průběhu práce bylo celkově vyzkoušeno pět typů elektrod. A to elektroda ze skelného uhlíku, borem dopovaná diamantová elektroda, vlastnoručně namíchaná nevodná pastová elektroda s poměrem látek 7:2:1 (uhlíkový prášek, parafinový olej, tenzid C12-SDS), komerční tištěná BDD elektroda s pomocnou uhlíkovou elektrodou, a nakonec tištěná BDD elektroda s diamantovou pomocnou elektrodou, která nám byla zapůjčena z Ústavu fotoniky a elektroniky v Bratislavě. Pro jednotlivé elektrody byly změřeny kalibrační závislosti standardu ergosterolu, porovnány z pohledu jejich citlivosti. Byly vypočítány limity detekce a kvantifikace. Jako elektrolyt byl použit 0,1M LiClO₄/ACN. V průběhu měření byl elektrolyt modifikován a byla do něj přidána příměs vody ACN/H₂O 95:5 v/v. Tento elektrolyt se ukázal jako šetrnější pro komerční tištěné SP-BDDE Metrohm elektrody, jejichž životnost byla v čistě organickém prostředí velmi nízká.

Pro měření byla použita metoda SWV. Pro nevodnou pastovou elektrodu byla optimalizována amplituda 40 mV a frekvence 80 Hz a pro tištěné SP-BDDE Pt elektrody byl optimalizován depoziční čas 10 s a frekvence 50 Hz. Zároveň byla upravena frekvence pro GCE, u které byla při 50 Hz zaznamenána lepší proudová odezva, než-li u původní použité frekvence.

Jako nejcitlivější se ukázala SP-BDDE Pt s diamantovou pomocnou elektrodou s LOD = 0,678 μM a LOQ = 2,054 μM.

V závěru byly provedeny a porovnány čtyři různé extrakce, ze kterých byla jako nejlepší vyhodnocena extrakce čtvrtá, ve které je ergosterol vytřepáván do hexanu, s průměrnou výtěžností 97 %. Za pomoci tohoto extrakčního postupu byly přeměřeny koncentrace ergosterolu u reálných plísňových vzorků *Aspergillus brasiliensis*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium tricinctum*, *Mucor racemosus* a *Penicillium chrysogenum* narostlé na čistém médiu a na uměle kontaminovaném pečivu. Měření probíhalo za optimalizovaných podmínek v 0,1M LiClO₄/ 95 % ACN, pomocí elektrody ze skelného uhlíku, SP-BDDE Pt, BDDE a SP-BDDE Metrohm. Pro reálné vzorky nejlepší proudovou odezvu vykazovala elektroda ze skelného uhlíku a SP-BDDE Pt.

Díky výsledkům jsme byli schopni ověřit, že metoda alternativního elektrochemického stanovení ergosterolu funguje a je možné ji použít pro reálné vzorky.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- Aguiló-Aguayo I.**, Walton J., Viñas I., Tiwari B. K. Ultrasound assisted extraction of polysaccharides from mushroom by-products. *LWT Food Science and Technology*, **2017**, *77*, 92–99.
- Ahn, B.-Y.** Optimization of Vitamin D₂ Production using enoki mushroom powder and the preparation of doenjang using the powder. *The Journal of the East Asian Society of Dietary Life*, **2018**, *28*(1), 88–100.
- Azam M. A.**, Mupi M. Chapter 2 - Carbon nanomaterial-based sensor: Synthesis and characterization, *Carbon Nanomaterials-Based Sensors, Elsevier*, **2022**, 15-28.
- Barba, F. J.**, Putnik, P., Kovacevic, D. B., Poojary, M. M., Roohinejad, S., Lorenzo, J. M., et al. Impact of conventional and non-conventional processing on prickly pear (*Opuntia* spp.) and their derived products: From preservation of beverages to valorization of by-products. *Trends in Food Science & Technology*, **2017**, *67*, 260–270.
- Battilani P.**, Pietri A. OTA in grapes and wine. *Eur. J. Plant. Pathol.*, **2002**, *108*, 639-643.
- Bernas E.**, Jaworska G. Culinary-Medicinal mushroom products as a potential source of vitamin D. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **2017**, *19*, 925–935.
- Bogialli S.**, Di Corcia A., Nazzari M., Chapter 9 - Extraction procedures, *Food Toxicants Analysis, Elsevier*, **2007**, 269-297.
- Carreón-Palau L.**, Sterol Composition of Sponges, Cnidarians, Arthropods, Mollusks, and Echinoderms from the Deep Northwest Atlantic: A Comparison with Shallow Coastal Gulf of Mexico. *Marine drugs*, **2020**, *18*:12, 598.
- Castro M.F.P.M.**, Bragagnolo N., Valentini S.R.D. The relationship between fungi growth and aflatoxin production with ergosterol content of corn grains. *Braz. J. Microbiol.*, **2002** *33*, 22–26
- Creppy E.E.** Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Lett.*, **2002**, *127*, 19-28.
- Dall’Asta C.**, Lindner J.D.D., Galaverna G., Dossena A., Neviani E., Marchelli R. The occurrence of ochratoxin A in blue cheese. *Food Chem.*, **2008**, *106*, 729-734.
- Dohnal V.**, Kaderová I., Ježková A., Skládanka J. Obsah ergosterolu u vybraných druhů trav na konci vegetačního období. *Acta Univ. Agric. Silv. Mendel. Brun*, **2007**, *4*, 9–14.

- Dohnal V.**, Ježková A., Skládanka J. Ergosterol: Klíčový steroid hub. *Kontakt*. 2009, **10**, 449-454.
- Ekwomadu T**, Mwanza M, Musekiwa A. Mycotoxin-Linked Mutations and Cancer Risk: A Global Health Issue. *Int J Environ Res Public Health*. **2022**;19(13):7754.
- Francis S.**, Koshy E.P., Mathew B, Chapter 7 - Electroanalytical techniques: a tool for nanomaterial characterization, In *Micro and Nano Technologies, Design, Fabrication, and Characterization of Multifunctional Nanomaterials*, Elsevier, **2022**, 163-175.
- Gąsecka M.**, Siwulski M., Magdziak Z., Budzyńska S., Stuper-Szablewska K., Niedzielski P., et al. The effect of drying temperature on bioactive compounds and antioxidant activity of *Leccinum scabrum* (Bull.) Gray and *Herichium erinaceus* (Bull.) Pers. *Journal of Food Science and Technology*, **2019**.
- 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**, 62(2), 415-419.
- Gil-Ramirez, A.**, Aldars-Garcia L., Palanisamy M., Jiverdeanu R. M., Ruiz-Rodriguez A., Marin F. R., et al. Sterol enriched fractions obtained from *Agaricus bisporus* fruiting bodies and by-products by compressed fluid technologies (PLE and SFE). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **2013**, 18, 101–107.
- Grzybowski A.**, Pawlikowska-Lagód K. et al. Ergotism and Saint Anthony's fire. *Clinics in Dermatology*, **2021**, 39(6), 1088–1094.
- Guan X. L.**, Souza C. M., Pichler H., Dewhurst G., Schaad O., Kentaro Kajiwara H. W., et al. Functional interactions between Sphingolipids and sterols in biological membranes regulating cell physiology. *Mol. Biol. Cell*, **2009**, 20, 2673–2683.
- Gupta R. C.**, Evans T. J., Nicholson S. S., Ergot and Fescue Toxicoses. In: *Veterinary Toxicology*. Elsevier, **2018**, 995–1001.
- Gutarowska, B.**, Skóra, J., Pielech-Przybylska, K. Evaluation of ergosterol content in the air of various environments. *Aerobiologia*, **2015**, 31, 33–44.
- Hartwig, M.**, S. Hartmann, and H. Steinhart. Bestimmung natürlich vorkommender steroidaler Sexualhormone (Androgene und Gestagene) in Rindfleisch. *Z. Lebensm. Unters. Forsch., in press*. **1995**.
- Hashim S.N.N.S.**, Schwarz L. J., Danylec B., Mitri K., Yang Y., Boysen R. I., Hearn M.T.W. Recovery of ergosterol from the medicinal mushroom, *Ganoderma tsugae* var. *Janniae*, with a

molecularly imprinted polymer derived from a cleavable monomer-template composite, *Journal of Chromatography A*, **2016**, 1468, 1-9.

He, X., Guo, X., Liu, N., Zhang, B. Ergosterol production from molasses by genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, **75(1)**, 55–60.

Heleno S. A., Diz P., Prieto M. A., Barros L., Rodrigues A., Barreiro M. F., et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycoesterols from *Agaricus bisporus* L. by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet extraction. *Food Chemistry*, **2016**, 197, 1054–1063.

Holick M. F. The vitamin D deficiency pandemic: A forgotten hormone important for health. *Public Health Rev.* **2010**, 32, 267–283.

Horwood C., Ionic liquids as electrolytes for electrochemistry, *Ionic Liquids in Analytical Chemistry*, Elsevier, **2022**, 329-342.

Hossain M.Z., Mari N., Goto T. The relationship between ergosterol and mycotoxin contamination in maize from various countries. *Mycotoxin Res*, 2015, **31**, 91–99.

Hu D., Chen W., Li X., Yue T., Zhang Z., Feng Z., et al. Ultraviolet irradiation increased the concentration of vitamin D₂ and decreased the concentration of ergosterol in shiitake mushroom (*lentinus edodes*) and oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) powder in ethanol suspension. *ACS Omega*. **2020**, 5, 7361–7368.

Chemat F., Vian M.A., Cravotto G. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences*. **2012**.

IARC. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: Working group on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. **1993**, 35.

Jashari G., Švancara I., Sýs M., Characterisation of carbon paste electrodes bulk-modified with surfactants for measurements in nonaqueous media, *Electrochimica Acta*, **2022**.

Jasinghe V.J., **Perera C.O.** Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D₂ by UV irradiation. *Food Chemistry*. **2005**, 92, 541–546.

Jiang Q., **Zhang M.**, **Mujumdar A. S.** UV induced conversion during drying of ergosterol to vitamin D in various mushrooms: Effect of different drying conditions. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, 105, 200–210.

Kadakal Ç., Artik N. A New Quality Parameter in Tomato and Tomato Products: Ergosterol, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2004**, 44:5, 349-351.

Kadakal Ç., Tepe T. K. Is ergosterol a new microbiological quality parameter in foods or not?, *Food Reviews International*, **2019**, 35:2, 155-165.

Kim S. Y.; Jeon S. W.; Lim W. J.; Oh K. S.; Shin D. W.; Cho S. J.; Park J. H.; Kin Y. H.; Shin Y. C. Vitamin D deficiency and suicidal ideation: A cross-sectional study of 157,211 healthy adults. *J. Psychosom. Res.* **2020**, 134.

Kondo T., Nakajima K., Osasa T., Kotsugai A., Shitanda I., Hoshi Y., Itagaki M., Effect of substrate size on the electrochemical properties of boron-doped diamond powders for screen-printed diamond electrode, *Chem. Lett.*, **2017**, 47

Larsen T., Axelsen J. and Weber Ravn H., Simplified and rapid method for extraction of ergosterol from natural samples and detection with quantitative and semi-quantitative methods using thin-layer chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1–2, 301–304

Lefrou C., Nogueira R. P., Huet F., Takenouti H., 1.02 - Electrochemistry, Shreir's Corrosion, *Elsevier*, **2010**, 13-51

Luchini A., Delhom R., Cristiglio V., Knecht W., Wacklin-Knecht H, Fragneto G., Effect of ergosterol on the interlamellar spacing of deuterated yeast phospholipid multilayers, *Chemistry and Physics of Lipids*, **2020**, 227.

Lü Y., Zhu Y., Cheng G., Dong S. Study of electrochemical behavior of ergosterol by in situ thin layer circular dichroic spectroelectrochemistry. *Electroanalysis*, **1999**, 11, 601-605.

Maeng J. H., Muhammad Shahbaz H., Ameer K., Jo Y., Kwon, J. H. Optimization of microwave-assisted extraction of bioactive compounds from *Coriolus versicolor* mushroom using response surface methodology. *Journal of Food Process Engineering*, **2017**, 40.

Matvieiev O., Šelešovská R., Vojs M., et al. Novel Screen-Printed Sensor with Chemically Deposited Boron-Doped Diamond Electrode: Preparation, Characterization, and Application. *Biosensors (Basel)*. **2022**;12(4):241.

Matyáš M., Stanovení ergosterolu v pivovarských surovinách [online]. Brno, 2010 [cit. 2023-05-10]. Dostupné z: <https://dspace.vutbr.cz/bitstream/handle/11012/3147/final-thesis.pdf>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Ing. Karolína Benešová, Ph.D.

Messaritakis I., Koulouridi A., Sfakianaki M., Vogiatzoglou K., Gouvas N., Athanasakis E., Tsiaoussis J., Xynos E., Mavroudis D., Tzardi M., Souglakos J. The role of vitamin D receptor gene polymorphisms in colorectal cancer risk. *Cancers* 2020, 12, 1379.

Mirzavandi F., Babaie S., Rahimpour S., Razmpoosh E., Talenezhad N., Zarch S. M. A., 24 - ELECTROCHEMISTRY, *Academic Press*, 1980, 744-764.

Mokhtar W. A., Fawzy A., Allam R. M., Amer R. M., Hamed M. S. Maternal vitamin D level and vitamin D receptor gene polymorphism as a risk factor for congenital heart diseases in offspring, An Egyptian case-control study. *Genes Dis.* 2019, 6, 193–200.

Morales, D., Gil-Ramirez, A., Smiderle, F. R., Piris, A. J., Ruiz-Rodriguez, A., Vitamin D-enriched extracts obtained from shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) by supercritical fluid extraction and UV-irradiation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2017, 41, 330–336.

Mozaffari-Khosravi H. The effect of high dose of intramuscular vitamin D supplement injections on depression in patients with type 2 diabetes and vitamin D deficiency: A randomized controlled clinical trial. *Obesity Medicine*, 2020, 17.

Nabizadeh S., Shariatifar, N., Shokoohi E. *et al.* Prevalence and probabilistic health risk assessment of aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ in Iranian edible oils. *Environ Sci Pollut Res*, 2018, 25, 35562–35570.

Nallbani A., Holubová J., Sýs M., Arbneshi T., Vytřas K., Voltammetric determination of cholecalciferol at glassy carbon electrode performed in water-ethanol mixture, *Slovak Journal of Food Sciences*, 2018, 166-172.

Netíková K., Elektrochemické vlastnosti uhlíkových pastových elektrod modifikovaných povrchově aktivními látkami [online]. Pardubice, 2021 [cit. 2023-05-10]. Dostupné z: https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/78629/Katerina_Netikova_diplomova_prace.pdf, Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Ing. Milan Sýs, Ph.D.

Newell, S. Y. Estimating fungal biomass and productivity in decomposing litter, The fungal community: its organization and role in the ecosystem, 1992, 521-561.

- Newell, S. Y.** Ecomethodology for organoosmotrophs: prokaryotic unicellular versus eukaryotic mycelial. *Microb. Ecol.* **1994**, 28:151–157.
- Nielsen K. F.**, Madsen J. Ø., Determination of ergosterol on mouldy building materials using isotope dilution and gas chromatography–tandem mass spektrometry, *Journal of Chromatography A*, **2000**, 898, 2:227–234
- Nizamlioglu, N. M.** Relationship between ergosterol and mycotoxins in tomato paste and tomato juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, **2022**.
- Nowak R.**, Nowacka-Jechalke N., Pietrzak W., Gawlik-Dziki U., A new look at edible and medicinal mushrooms as a source of ergosterol and ergosterol peroxide - UHPLC-MS/MS analysis, *Food Chemistry*, **2022**, 369.
- Nölle N.**, Argyropoulos D., Müller J., Biesalski H. K. Temperature stability of vitamin D₂ and color changes during drying of UVB-treated mushrooms. *Drying Technology*, **2018**, 36, 307–315.
- Oktay B. H. I.**, Baydemir P. G., Nergiz M., Zenger O. Determination of mold contamination using ergosterol imprinted particles. *Biotechnol Prog.* **2021**, 37(1).
- O'Mullane A.P.**, Electrochemistry, Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, *Elsevier*, **2013**.
- Ötles S.**, Kartal C. Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and Applications in Food Samples. *Acta Sci.Pol. Technol. Aliment.*, **2016**, 15 (1), 5-15.
- Pavlović N. M.**, Balkan endemic nephropathy—current status and future perspectives, *Clinical Kidney Journal*, **2013**, 3:6, 257–265.
- Papoutsis K.**, Grasso S., Menon S., Brunton A., Lyng N., Jacquier J., Bhuyan J., Deep Jyoti. Recovery of ergosterol and vitamin D₂ from mushroom waste – Potential valorization by food and pharmaceutical industries. *Trends in Food Science & Technology*. **2020**, 99. 351-366.
- Pattono D.**, Grosso A., Stocco P.P., Pazzi M., Zeppa G. Survey of the presence of patulin and ochratoxin A in traditional semi-hard cheeses. *Food Control*, **2013**, 33, 54-57.
- Perkowski J.**, Buško, M., Stuper, K. *et al.* Concentration of ergosterol in small-grained naturally contaminated and inoculated cereals. *Biologia*. **2008**, 63, 542–547.
- Pleskov Y.V.** Electrochemistry of diamond: A review. *Russian Journal of Electrochemistry*, **2002**, 38, 1275-1291.

- Pluscec, J.**, and S. Owies. Determination of vitamin D3 in liquid multivitamin preparation, using reverse phase, solid phase extraction liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1987**, 70:599–601
- Regner, S.**, Schnürer, J., Jonsson, A. Ergosterol content in relation to grain kernel weight. *Cereal Chem.*, **1994**. 71(1), 55–58.
- Roselló-Soto E.**, Parniakov O., Deng Q., Patras A., Koubaa M., Grimi N. et al. Application of non-conventional extraction methods: Toward a sustainable and green production of valuable compounds from mushrooms. *Food Engineering Reviews*, **2016**, 8, 214–234
- Seitz, L. M.**, Mohr H. E., Burroughs R., D. B. Sauer D. B. Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chem.* **1977**, 54, 1207–1217
- Sheppard A.J.**, O'Dell R.G., Pennington J.A.T., CHOLESTEROL | Properties and Determination, Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition), *Academic Press*, **2003**, 1220-1226.
- Schnürer J.**, Jonsson A. Ergosterol levels and mould colony forming units in Swedish grain of food and feed grade. *Acta Agric. Scan., Sect. B Soil Plant Sci*, **1992**, 42, 240–245.
- Schnürer, J.** Comparison of methods for estimating the biomass of three food-borne fungi with different growth patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, 59, 552–555.
- Simões F.R.**, Xavier M.G., 6 - Electrochemical Sensors, In Micro and Nano Technologies, Nanoscience and its Applications, *William Andrew Publishing*, **2017**, 155-178.
- Slawinska A.**, Fornal E., Radzki W., Skrzypczak K., Zalewska-Korona M., Michalak-Majewska M., et al Study on vitamin D(2) stability in dried mushrooms during drying and storage. *Food Chemistry*, **2016**, 199, 203–209.
- Skládanka J.**, Nedělník J., Adam V., Doležal P., Moravcová H., Dohnal V. Forage as a primary source of mycotoxins in animal diet. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. **2011**, 8, 37–50.
- Speijers G.J.A.**, Speijers M.H.M. Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicol Lett*, **2004**, 153, 91–98.
- Stanković DM.**, Kalcher K. The immunosuppressive drug-rapamycin-electroanalytical sensing using boron-doped diamond electrode. *Electrochimica Acta*, **2015**, 168, 76-81.

Stuper-Szablewska K. et al. "Level of contamination with mycobiota and contents of mycotoxins from the group of trichothecenes in grain of wheat, oats, barley, rye and triticale harvested in Poland in 2006–2008." *Ann Agric Environ Med.*, **2017**, 24, 49-55.

Suljkanović M., Grabarczyk M., Wardak C., Adamczyk M., et al. Electrochemical sensors as simple and cheap devices for rapid determination of various species in environmental samples. *Environmental Engineering - Inženjerstvo okoliša*, **2019**, 6, 1-6.

Taofiq, O., Correa, R. C. G., Barros, L., Prieto, M. A., Bracht, A., Peralta, R. M., et al. A comparative study between conventional and non-conventional extraction techniques for the recovery of ergosterol from *Agaricus blazei* Murrill. *Food Research International*, **2019**, 125.

Thammawong, Manasikan & Okadome, Hiroshi & Shiina, Takeo & Nakagawa, Hiroyuki & Nagashima, Hitoshi & Nakajima, Takashi & Kushiro, Masayo. Distinct Distribution of Deoxynivalenol, Nivalenol, and Ergosterol in *Fusarium*-infected Japanese Soft Red Winter Wheat Milling Fractions. *Mycopathologia*, **2011**, 172. 323-30.

Tian Y., Zhao Y., Huang J., Zeng H., Zheng B. Effects of different drying methods on the product quality and volatile compounds of whole shiitake mushrooms. *Food Chemistry*, **2016**, 197, 714–722.

Tothill, I.: Rapid and On-Line Instrumentation for Food Quality Assurance, *Woodhead Publishing limited*, **2003**, 150–157.

Troudt B.K., Rousseau C.R., Dong X.I.N., Anderson E.L., Bühlmann P. Recent progress in the development of improved reference electrodes for electrochemistry. *Anal Sci.*, **2022**, 38(1), 7183.

Vacek J., Masařík M., Paleček E., Fojta M., Elektrochemické metody v analýze nukleových kyselin a bílkovin, *Czech. J. Phys.*, **2014**, 56 (5), 293-304.

Vandamme E. J.: Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors, *Springer*, **1989**, 81–94.

Villares A., Mateo-Vivaracho L., García-Lafuente A., Guillamón E. Storage temperature and UV-irradiation influence on the ergosterol content in edible mushrooms. *Food chemistry*, **2014**, 147C, 252-256.

Weggler B. A., Gruber B., Teehan P., Jaramillo R., Dorman F. L., Chapter 5 - Inlets and sampling, Separation Science and Technology, *Academic Press*, **2020**, 12, 141-203.

Wilkes T., Ergosterol extraction: A comparison of methodologies. *Biomedicine*, **2023**, 67-69.

Won D. J., Kim S. Y., Jang C. H., Lee J. S., Ko J. A., Park H. J. Optimization of UV irradiation conditions for the vitamin D2-fortified shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) using response surface methodology. *Food Science and Biotechnology*, **2018**, 27, 417–424.

Wu Y. F., Cai Y., Liu M. Y., Zhu D. S., Guan Y. T. The potential immunoregulatory roles of vitamin D in neuromyelitis optica spectrum disorder. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **2020**, 43.

Yi Y., Weinberg G., Prenzel M., Greiner M., Electrochemical corrosion of a glassy carbon electrode. *Catalysis Today*, **2017**, 295, 32-40.

Zhang Q. Q., Wu Y. C., Lu Y., Fei X. Q. Role of vitamin D in risk factors of patients with type 2 diabetes mellitus. *Med. Clin.* **2020**, 154, 151–156.