

## **Závěrečná zpráva projektu specifického výzkumu - zakázka č. 2107**

**Název projektu: Analýza ergosterolu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s detekcí fluorescenčního záření.**

### **Specifikace řešitelského týmu.**

Odpovědný řešitel: doc. RNDr. Vlastimil Dohnal, Ph.D. et Ph.D.

Spoluřešitel: Ing. Karel Musil

### **Anotace:**

Cílem projektu je vývoj rychlejší, spolehlivější a levnější metody pro stanovení ergosterolu prostřednictvím vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí absorpce ve viditelné a ultrafialové oblasti a detekcí fluorescenčního záření. Práce se zaměří na možné směry derivatizace ergosterolu pro zajištění schopnosti výsledného produktu fluoreskovat. Detekce fluorescence ve srovnání s detekcí absorpce ve viditelné a ultrafialové oblasti má potenciál zvýšit citlivost metody. Rovněž úprava postupu analýzy má potenciál snížit časovou a finanční náročnost analýzy. Ergosterol je specifickým indikátorem přítomnosti plísní, jeho analýza tedy poskytuje možnost spolehlivé detekce zaplísnění v biologických vzorcích (siláže aj.).

**Celková částka požadované dotace (na celé období řešení projektu):**

**259763 Kč**

### **Cíle řešení a přínos projektu:**

Rychlejší, spolehlivější a levnější metoda pro stanovení ergosterolu prostřednictvím vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí absorpce ve viditelné a ultrafialové oblasti a detekcí fluorescenčního záření. Pokrok v detekci zaplísnění v biologických vzorcích (siláže aj.).

### **Stručný popis řešené problematiky včetně metodiky a časového plánu řešení:**

Ergosterol, též zvaný provitamín D<sub>2</sub>, patří mezi hlavní steroly produkované nižšími i vyššími houbami. Je složkou buněčných membrán hub a má podobnou funkci jako cholesterol v živočišných buňkách. Jeho výskyt v ostatních organismech je velmi omezený, pouze v některých bakteriích a kvasinkách byly nalezeny zanedbatelné koncentrace ergosterolu v sušině. Díky tomuto specifickému výskytu je prakticky možné spojit nález tohoto sterolu s přítomností plísní ve zkoumaném vzorku.

Toho se využívá při analytickém stanovení přítomnosti plísní a hub v biologických vzorcích, protože míra zaplísnění biologických vzorků podává důležitou informaci z hlediska kvality

biologického materiálu. Naprosto dominantními obory využitelnosti analýzy míry zaplísnění jsou potravinářství a zemědělství (siláže, senáže, píce, obilniny aj.).

Samotný ergosterol se působením ultrafialového záření transformuje na vitamín D<sub>2</sub>, neboli ergokalciferol, který je v játrech biotransformován na vitamín D. Vitamín D má vliv na metabolismus vápníku a ve vyšších dávkách je toxický.

Pro stanovení ergosterolu je používána celá řada zejména chromatografických metod, a to buď tenkovrstvá chromatografie, plynová chromatografie s hmotnostní detekcí nebo vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem či s detekcí v UV oblasti.

Nejčastěji se využívá právě vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Klasický postup stanovení ergosterolu naráží v prvním kroku na problém převodu ergosterolu vázaného v buněčné stěně plísní a hub do roztoku, který bude nastříknut jako vzorek do chromatografické kolony pro separaci před detekcí. To se provádí nejčastěji zmýdelněním 10% roztokem hydroxidu sodného v metanolu. Do metanolu uvolněný ergosterol je posléze extrahován do nepolárního rozpouštědla. Jelikož se separace na kapalinovém chromatografu provádí nejčastěji na obrácených fázích, je nutné toto rozpouštědlo odpařit a usazený zbytek rozpustit v rozpouštědle polárním. Teprve takový roztok vzorku je možné nastříknout do vysokoúčinného kapalinového chromatografu k separaci a následné detekci měřením úbytkem ultrafialového záření při vlnové délce 282 nm. Naměřené hodnoty absorbancí se posléze dosadí na křivku sestavenou z absorbancí kalibračních roztoků ergosterolu o známé koncentraci. Získané hodnoty představují koncentrace ergosterolu v roztocích vzorků. Ty jsou posléze přepočteny na hmotnosti ergosterolu v celkové hmotnosti pevných vzorků použitých k extrakci.

Tento projekt specifického výzkumu si klade v prvním kroku za cíl prozkoumat potenciální směry derivatizace ergosterolu ve fázi přípravy vzorku v autosampleru vysokoúčinného kapalinového chromatografu. Práce bude probíhat na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu Agilent 1260 Infinity se separací na obrácených fázích. Detekce bude pobíhat měřením absorpce ultrafialového záření v případě srovnávacích měření klasickým způsobem a paralelně i prostřednictvím měření fluorescenčního záření emitovaného derivatizovaným vzorkem. Pro práci s derivatizačními činidly a biologickými vzorky je nutné provést výměnu kovových částí kapalinového chromatografu za nekorodující a biologicky kompatibilní materiály (Biocompatibility Kit). Cílem je vyvinout citlivější metodu pro stanovení ergosterolu při zachování výše nákladů na měření.

V případě potvrzení derivatizačního potenciálu některých činidel bude dalším možným krokem vyvíjet metodu detekce ergosterolu přímou reakcí s derivatizačním činidlem bez nutnosti separace na koloně vysokoúčinného kapalinového chromatografu. Rovněž postup extrakce pro tuto metodu má potenciál být výrazně jednodušší a existují náznaky, že lze v následném výzkumu dosáhnout až in situ detekce přítomnosti zaplísnění obilnin prostřednictvím stanovení spór zachycených na filtrech ventilačních zařízení v silech. Tato potenciální metoda nenabízí možnost přesného určení koncentrace ergosterolu v siláži, avšak rychlou detekci přítomnosti plísně bez nutnosti provádění laboratorních měření.

Práce je plánována na jeden rok. Prvních šest měsíců je vyhrazených pro vývoj metody separace derivatizovaných vzorků na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu s detekcí měření fluorescenčního záření. Zbýlých šest měsíců bude vyhrazeno pro průzkum dalších potenciálních využití derivatizačních reakcí z hlediska možnosti snížení náročnosti extrakce, vynechání separace na koloně kapalinového chromatografu, nebo rychlých in situ detekcí.

#### Kontrolovatelné výsledky řešení.

Jako výstup byl plánován odborný článek v časopise s impakt faktorem. Vzhledem k rekonstrukci budovy C a nemožnosti experimentálně pracovat v období 6-10/2014 nebylo dosaženo předpokládaných výsledků. Byly provedeny pouze screeningové experimenty, na základě jejichž výsledků by mělo být pokračováno ve výzkumu. Výsledky jsou uvedeny v Příloze 1.

Do OBD nebyl zadán žádný záznam.

**Tab. 1 Sumář výstupů řešení projektu**

Typ výstupu	Plán 1. rok	Skutečnost	Poznámka
Počet dizertačních prací			
Počet diplomových prací			
Zařazeno do kategorie excelence			
Jimp - výstup v impaktovaném časopisu	1	0	
Jsc – výstup v databázi Scopus			
Jneimp – výstup v databázích Scopus a WOS			
Jrec – výstup v recenzovaném časopisu			
B – odborná kniha			
C – kapitola v odborné knize			
D – článek ve sborníku			
Počet výsledků celkem	1	0	

**Tab. 2 Čerpání finančních prostředků v Kč**

Položka	Plán	Žádost o změnu rozpočtu	Skutečnost
Počet členů řešitelského týmu čerpajících mzdové prostředky	0	0	0
Počet studentů čerpajících mzdové prostředky	0	0	0

Stipendia	0	0	0
Odměny a DPP, DPC	0	0	0
Zákonné zdravotní a sociální pojištění	0	0	0
<b>Celkem osobní náklady</b>	0	0	0
<b>Spotřeba materiálu celkem</b>	44404	79963	79960,38
<b>Drobný hmotný majetek</b>	35592	35592	28736,00
<b>Služby celkem</b>	0	0	0
<b>Cestovné celkem</b>	0	0	0
<b>Celkové náklady</b>	79 796,00	79 796,00	79 960,38

a) Investiční náklady

Hmotný majetek byl vysoutěžen v rámci DNS 21-2014 a 32-2014.

Multimetr pro měření pH/ISE/Cond včetně elektrod.

Vysoutěžená cena za pH metr 74 117,40 Kč bez DPH (ze SV hrazeno 69 967 Kč).

Tento přístroj umožní přímé měření uvedených veličin a on-line sběr dat do počítače tak, aby bylo možno díky nim řídit/monitorovat průběh analýz.

Přípravna ultračisté vody

Cena 140 000 Kč (ze SV hrazeno 110 000 Kč) – skutečná cena 110 727 Kč bez DPH.

Zdůvodnění: Pro některé velmi citlivé a stopové analýzy na moderních přístrojích HPLC již nestačí pro rozpouštění vzorků voda s vlastnostmi čistoty destilované nebo demineralizované vody. Je proto nezbytné destilovanou vodu podrobit druhému stupni přečištění.

Datum: 27.12.2014

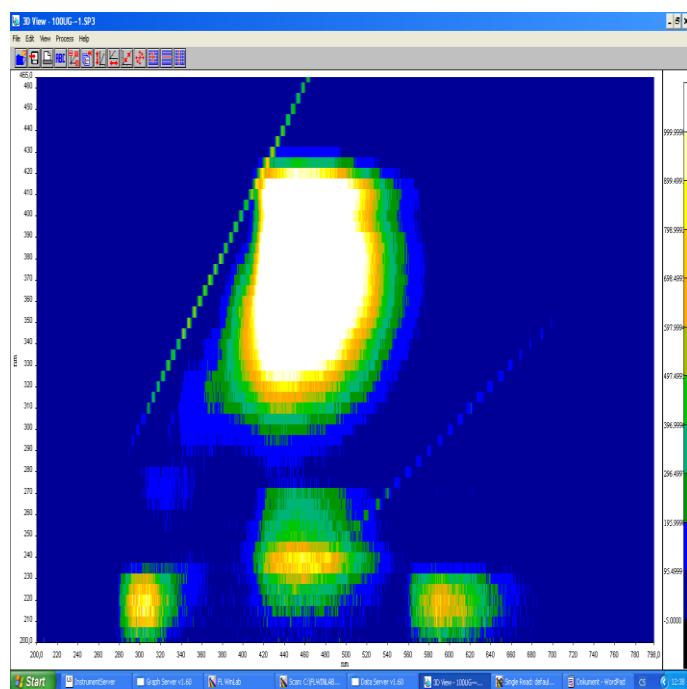
Podpis odpovědného řešitele

## Příloha 1. Výsledky screeningových experimentů

Zásadním faktorem ovlivňujícím kvalitu a úplnost výsledků screeningových experimentů bylo omezení efektivní laboratorní práce na projektu specifického výzkumu. Po doručení komponent zakoupených v rámci SV bylo nutné zakonzervovat laboratoře a přístroje instrumentální analýzy přesunout k uskladnění z důvodu rekonstrukce budovy Pedagogické fakulty. Po obnovení provozu laboratoře instrumentální analýzy byla zaznamenána porucha Fluorescenčního spektrofotometru pravděpodobně způsobená stěhováním. Porucha byla odstraněna servisním zásahem přivolaného technika po vybalení přístroje v prosinci roku 2014. Z výše uvedených důvodů byla doba reálné laboratorní práce na projektu značně omezena a úplnost získaných výsledků nedosahuje úrovně umožňující publikaci.

Samotné výsledky screeningových experimentů naznačují slibné tendence další progresu výzkumu. V plánovaném průzkumu derivatizačního potenciálu ergosterolu byla nalezena unikátní derivatizační reakce, jež dosud nebyla z hlediska analytického využití publikována. Reakce poskytuje derivatizovaný produkt ergosterolu s možností fluorescenční detekce. Obrázek č. 1 představuje 3D fluorescenční spektrum derivatizovaného ergosterolu. Pro měření bylo použito rozpětí vlnových délek 200 až 465 nm excitace a emise byla snímána v rozpětí 200 až 798 nm. V rozmezí excitace vlnových délek 300 až 430 nm a emise 380 až 560 nm je po 30 vteřinách reakce zaznamenána velmi výrazná fluorescence derivatizovaného produktu.

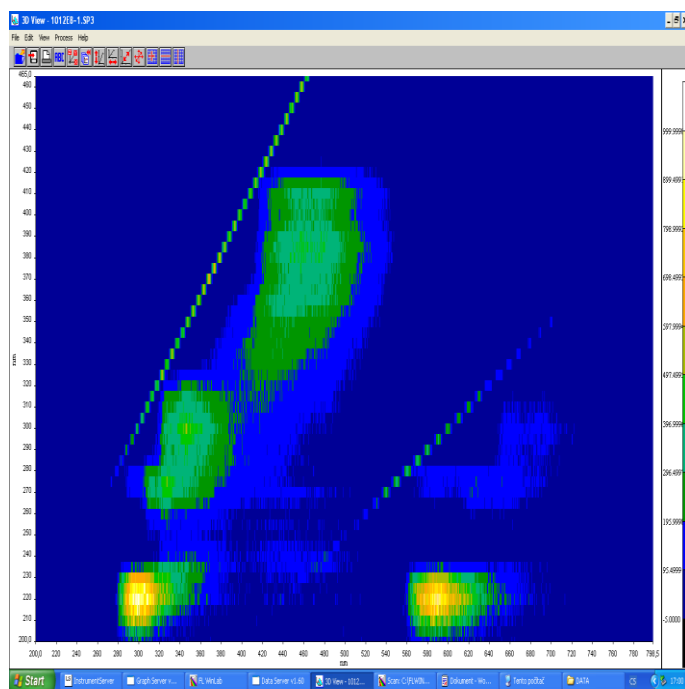
**Obrázek 1 3D Fluorescenční spektrum derivatizovaného ergosterolu (30 s)**



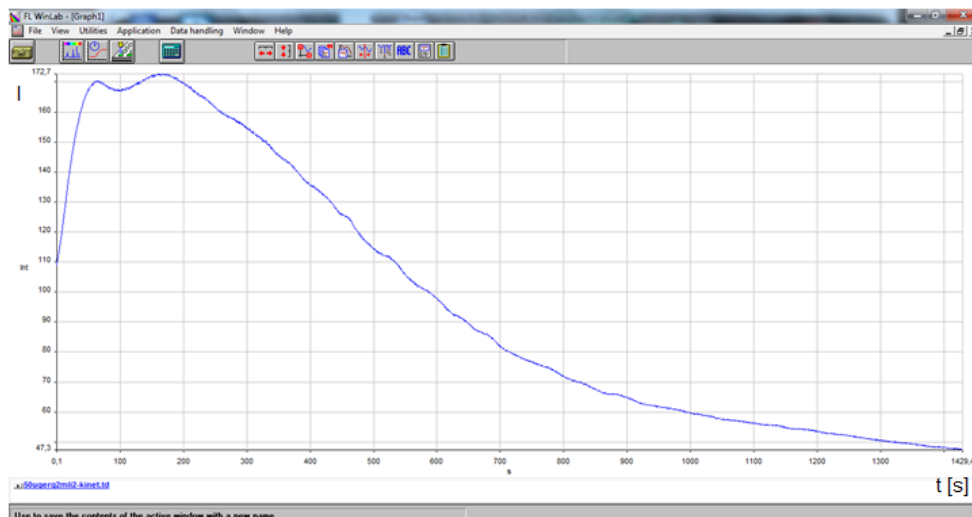
Výrazná intenzita fluorescence naznačuje velký potenciál citlivosti metody založené na prezentované derivatizační reakci ergosterolu. Předmětem dalšího výzkumu mohou být různé předpokládané směry dalšího zjednodušení instrumentace metody v porovnání s méně citlivou a nákladnější metodou analýzy HPLC.

Vývoj metody však nadále skrývá některá úskalí ve snaze o analytické využití, optimalizaci a zefektivnění reakce. Jednou z potvrzených vlastností reakce je proměnlivost produktu v závislosti na čase. Kinetika reakce má pravděpodobně nelineární průběh a po určitém čase intenzita fluorescence produktu klesá. Na obrázku č. 2 je vyobrazeno 3D fluorescenční spektrum shodné reakce s obrázkem č. 1 avšak po 20 minutách reakce. Na obrázku č. 3 je vynesena samotná křivka kinetiky reakce.

**Obrázek 2 3D Fluorescenční spektrum derivatizovaného ergosterolu (1200 s)**



**Obrázek 3 Křivka kinetiky derivatizační reakce**



Dalším úskalím metody se zdá být pravděpodobně nelineární závislost intenzity fluorescence a průběhu kinetiky reakce na poměrech ergosterolu a derivatizačního činidla a pravděpodobně i jejich koncentraci v rozpouštědle. Toto úskalí může představovat významnou překážku na cestě k analytickému využití reakce a bude vyžadovat podrobnější šetření v dalších fázích výzkumu.

## Příloha 2. Výsledovka z Magionu – vyúčtování dotace

Dne: 19.12.2014

Univerzita Hradec Králové

10:24:01

Strana 1

Výsledovka po účtech  
obratová

Období: 01 - 12 / 2014

Účet	Název účtu	Na poč. období	Má dáti	Dal	Zůstatek
Pracoviště:	*****	Všechny vybrané analytiky			
Činnost:	****	Všechny vybrané analytiky			
Fullcost:	*****	Všechny vybrané analytiky			
Zakázka:	*****	Všechny zakázky			
Podzakázka:	***	Všechny podzakázky			
50 00					
1 8	Spotřeba materiálu DHIM DU	0,00	28 736,00	0,00	28 736,00
50 09					
1 9	Spotřeba materiálu ostatní DU	0,00	51 224,38	0,00	51 224,38
501	Spotřeba materiálu	0,00	79 960,38	0,00	79 960,38
	Náklady celkem	0,00	79 960,38	0,00	79 960,38
69 00	Provoz.dotace věda MŠMTspecifický			79	
1 6	výzkum	0,00	0,00	796,00	79 796,00
				79	
691	Přijaté přís. mezi zúčt.mezi org.slož.	0,00	0,00	796,00	79 796,00
				79	
	Výnosy celkem	0,00	0,00	796,00	79 796,00
	<b>HOSPODÁŘSKÝ VÝSLEDEK:</b>				<b>-164,38</b>
	Celkem náklady za vybrané:	0,00	79 960,38	0,00	79 960,38
				79	
	Celkem výnosy za vybrané:	0,00	0,00	796,00	79 796,00
	<b>Hospodářský výsledek za vybrané:</b>				<b>-164,38</b>

Výběrová kritéria (omezení sestavy se řídí právy uživatele herrmma1 (uvedena v závorce))

Pracoviště: 04450 ( 0445\*|0447\* )

Činnost: ( \*\*\*|1210)

Fullcost:

Zakázka: 2107 ( \*|\* )

Podzakázka: