

**Square-wave Voltammetric Detection of Ergosterol as an Indicator of Fungal Contamination of Foodstuff**  
**(Square-wave voltametrická detekce ergosterolu jako indikátoru kontaminace potravin plísněmi)**

Barbora Martínková <sup>a</sup>, Gylxhane Kastrati <sup>a</sup>, Iveta Brožková <sup>a</sup>, Tomáš Mikysek <sup>b</sup>, Zuzana Bílková <sup>a</sup> and Lucie Korecká <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Biological and Biochemical Sciences, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic, E-mail: lucie.korecka@upce.cz

<sup>b</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic

**Abstract**

Ergosterol is a fungal-specific membrane sterol, whose amount correlates with fungal growth. Therefore, it could be used as biochemical marker of fungal contamination of food raw materials or products. This work aimed at implementation and optimization of square-wave voltammetric method for detection of ergosterol as simple screening method instead of time-consuming microbiological methods or liquid chromatography. Three different working electrodes, glassy carbon electrode, boron doped diamond electrode and screen-printed boron doped diamond electrode, were used and compared. Conditions of electrochemical detection were optimized. Finally, real samples represented by fungal mycelium and grain were analyzed.

**Keywords:** Ergosterol, Square-wave voltammetry, Glassy carbon electrode, Fungal contamination, Boron-doped diamond electrode, Screen printed electrode.

**Úvod**

Ergosterol (provitamin D<sub>2</sub>, ergosta-5,7,22-trien-3β-ol) je hojně rozšířenou látkou, strukturně podobnou cholesterolu <sup>1</sup>. Je přítomný v buněčných membránách, kde reguluje její permeabilitu <sup>2</sup>. Jeho název byl odvozen od ergotismu, mykotoxikózy vyvolané obvykle kontaminovanými potravinami <sup>3</sup>. Typický je výskyt ergosterolu v buňkách hub a plísní <sup>2</sup>. Ty jsou častými kontaminanty obilí, ořechů, sušených a dalších potravin, což vede nejen ke snížení kvality potravin, ale vzhledem k produkci sekundárních metabolitů (mykotoxinů), k riziku zdraví nebezpečných otrav <sup>4-6</sup>.

Mikrobiologické metody stanovení přítomnosti plísní a mykotoxinů v potravinách jsou časově náročné. Proto je snaha hledat jednodušší a rychlejší screeningové metody stanovení kontaminace potravin. Bylo prokázáno, že existuje korelace množství produkovaného ergosterolu s růstem dané plísně <sup>7,8</sup>. Proto může být ergosterol biochemickým markerem kontaminace plísněmi.

Ergosterol lze, vedle běžně využívaných metod, kterými jsou zejména vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) <sup>9,10</sup>, plynová chromatografie (GC) <sup>11</sup>, nebo pro vzorky potravin e-nose <sup>12</sup>, stanovit elektrochemicky. Z detekčních metod lze využít diferenčně pulzní voltametrii (DPV) nebo square-wave voltametrie, jako pracovní elektrody jsou v literatuře zmiňovány elektroda ze skelného uhlíku (GCE) nebo borem dopovaná elektroda (BDDE) <sup>13-15</sup>.

Cílem naší práce bylo optimalizovat parametry elektrochemické detekce a porovnat využitelnost tištěných tříelektrodových senzorů s pracovní borem dopovanou diamantovou elektrodou (SPE-BDDE) s GCE a BDDE. Po optimalizaci metody byl proveden pilotní

experiment se vzorky známého množství směsi plísni.

## Experimentální část

### *Chemikálie*

Ergosterol (3 $\beta$ -Hydroxy-5,7,22-ergostatriene), chloristan lithný (LiCLO<sub>4</sub>), Tetrabutylamonium hexafluorofosfát (Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub>), acetonitril bezvodý, methanol bezvodý, ethanol, izopropanol, dichlormethan (DCM) a *N,N*-dimethylformamid byly zakoupeny od firmy Merckgroup (Darmstadt, Německo). Ostatní chemikálie byly čistoty p.a (PENTA, Chrudim, ČR).

### *Přístroje*

Pro elektrochemická měření byl používán kompaktní potenciostat PalSens2 se software PSTrace5 (PalmSens BV, Houten, Nizozemsko). Měření probíhala v tříelektrodovém uspořádání, kdy jako pracovní elektroda byla použita elektroda ze skelného uhlíku (GCE) (Metrohm, Herrisau, Švýcarsko) nebo borem dopovaná diamantová elektroda BDDE (Windsor Scientific, Velká Británie), jako referentní argentchloridová (Metrohm, Herrisau, Švýcarsko) a jako pomocná platinová (Elektrochemické detektory, ČR). Vedle toho byla použita i tištěná elektroda (SPE-BDDE) s pracovní BDDE elektrodou, referentní stříbrnou a pomocnou uhlíkovou elektrodou (Metrohm, Herrisau, Švýcarsko). GCE elektroda byla před měřením leštěna suspenzí Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> prášku.

### *Podmínky elektrochemické detekce*

Měření probíhalo v roztoku elektrolytu (0,1 M ACN/LiCLO<sub>4</sub>). BDDE elektroda byla před měřením aktivována proměřením 10 cyklických voltamogramů v rozsahu potenciálu od -1,5 do +1,6 V. Měření probíhalo za optimalizovaných podmínek: potenciálové okno od +0,4 do +1,2 V, potenciálový krok 5 mV, depoziční čas 150 s, depoziční potenciál +0,6 V, ekvilibrační čas 8 s, amplituda pulzu 45 mV, frekvence pulzu 10 Hz. Oxidační pík ergosterolu byl odečítán v maximu píku (+0,92 V)

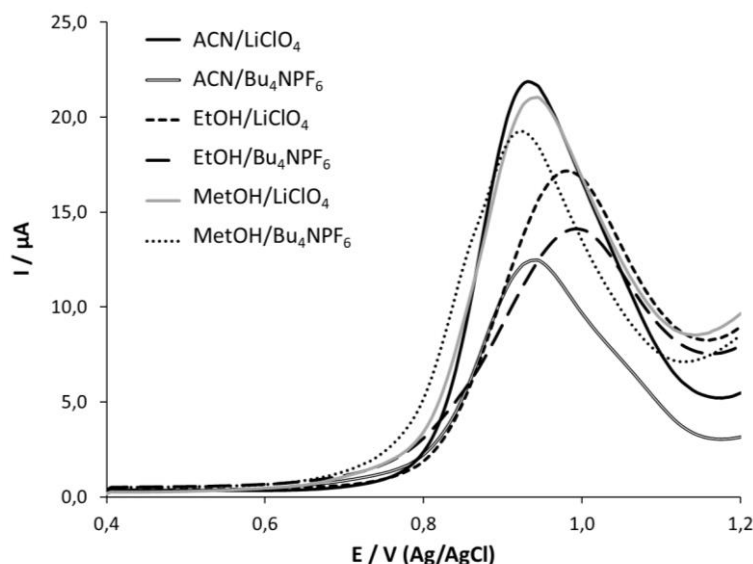
## Výsledky a diskuse

Pro stanovení ergosterolu byla jako detekční metoda zvolena square-wave voltametrie SWV a pro měření byly testovány tři typy elektrod, dvě běžné elektrody, konkrétně elektroda ze skelného uhlíku (GCE, Windsor Scientific, Velká Británie) a borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE, Metrohm, Švýcarsko), Vedle toho byly testovány i komerční tištěné tříelektrodové senzory s borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou (SPE-BDDE, Metrohm, Švýcarsko). Tištěné elektrody byly vybrány s ohledem na zamýšlenou využitelnost dané metody jako screeningové metody pro detekci kontaminace potravinových surovin plísněmi.

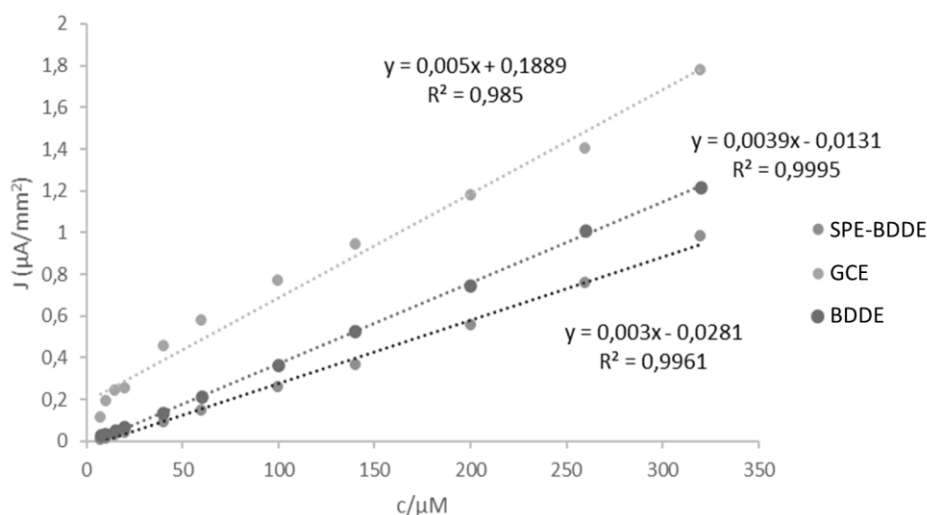
Měření probíhala v prostředí organických rozpouštědel s přidavkem chloristanu lithného (LiCLO<sub>4</sub>) nebo Tetrabutylamonium hexafluorofosfátu (Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub>). Byly testovány: bezvodý acetonitril, methanol, ethanol, izopropanol a *N,N*-dimethylformamid. S ohledem na cenu SPE byly analýzy provedeny s GCE a BDDE elektrodami. Nejlepších výsledků bylo dosaženo měřením v prostředí acetonitrilu, methanolu. V prostředí ethanolu došlo k posunu oxidačního píku k pozitivnějšímu potenciálu. Nejlepší výsledky byly získány ve směsi ACN/LiCLO<sub>4</sub> jako elektrolytu, a to pro oba typy elektrod (výsledky měřené s BDDE jsou uvedeny na obrázku 1). V dalších experimentech byly optimalizovány parametry SWV, depoziční čas, amplituda pulzu a frekvence pulzu. Optimalizované podmínky jsou uvedeny v experimentální části. Následně byly porovnány všechny tři výše uvedené elektrody proměřením kalibračních závislostí standardu ergosterolu v rozmezí koncentrací 7,5 – 320  $\mu$ M. Výsledky jsou uvedeny na obrázku

2. Bylo opakovaně ověřeno, že v případě SPE-BDDE lze jednu elektrodu použít pro přibližně 4 měření. Pro všechny tři elektrody byl kalkulován limit detekce (LOD) mez stanovitelnosti (LOQ), kde nižších hodnot bylo dosaženo pro BDDE a SPE-BDDE v porovnání s GCE.

Pro ověření praktické využitelnosti metody byl analyzován reálný vzorek obsahující známé množství ( $2,6 \times 10^1$  cfu/g) plísní rodu *Mucor*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus brasiliensis* a *Penicillium*. Ergosterol byl ze vzorku extrahován směsí MetOH/DCM (75:25, v/v), poměr pevné a kapalné fáze činil 1:25 (w/w). Extrakce byla opakována 3x s následným odpařením frakcí a rozpuštěním v elektrolytu (ACN/LiClO<sub>4</sub>). Při měření byl zaznamenán oxidační pík ergosterolu na GCE a SPE-BDDE. Nejvyšší proudová odezva byla získána na GCE. Na BDDE byla na hraně hodnotitelnosti v porovnání se signálem čistého elektrolytu. V případě reálného vzorku se jedná o první experimenty, kde způsob extrakce vycházel z literatury<sup>15</sup>. Bude následovat úprava podmínek extrakce ergosterolu ze vzorku pro dosažení vyšší účinnosti.



**Obr. 1.** SW voltamogram ergosterolu (500  $\mu\text{M}$ ) v různých elektrolytech (Acetonitril (ACN)/LiClO<sub>4</sub>; Acetonitril (ACN)/Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub>; Ethanol (EtOH)/ LiClO<sub>4</sub>; Ethanol (EtOH)/Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub>; Methanol (MetOH)/LiClO<sub>4</sub>; Methanol (MetOH)/Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub>. BDDE elektroda.



**Obr. 2.** Kalibrační závislosti proudové hustoty na koncentraci ergosterolu naměřené na elektrodách: BDDE – borem dopovaná diamantová elektroda (windsor Scientific); GCE – elektroda ze skelného uhlíku (Metrohm); SP-BDDE – tištěná borem dopovaná diamantová elektroda (Metrohm).

### Závěr

V rámci experimentů byly pro stanovení ergosterolu testovány tři typy elektrod a optimalizovány podmínky elektrochemického stanovení. Jako nejvhodnější elektrolyt pro všechny tři typy elektrod byl zvolen acetonitril s přísadou LiClO<sub>4</sub>. V prvních experimentech s reálným vzorkem, který byl tvořen směsí plísni, byl zaznamenán pík ergosterolu. Metoda se jeví jako využitelná pro screening kontaminace vzorků potravin, a to i s využitím SPE-BDDE, nicméně je nutné nalézt nejvhodnější způsob extrakce ergosterolu pro zvýšení citlivosti stanovení.

### Acknowledgements

Project of Czech Science Foundation (No. 20-01589S), financial support from the Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice project No. SGS-2021-005 and OP RDE project „Strengthening interdisciplinary cooperation in research of nanomaterials and their effects on living organisms“, reg. no. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17\_048/0007421 are gratefully acknowledged.

### References

1. Vazirian M., Faramarzi M. A., Ebrahimi S. E. S., et al.: *Int. J. Med. Mush.* 16, 77-84 (2014).
2. Dohnal V., Ježková A., Skládanka J.: *Ergosterol: klíčový steroid hub*. Kontakt 2, 449-454 (2008).
3. Vandamme E. J.: *Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors*. Elsevier Applied Science, New York, 1989.
4. Kadakal Ç., Tepe T. K.: *Food. Rev. Int.* 35, 1-9 (2018)
5. Günaydin Ş., Karaca H.: *Akademik Gıda*, 13, 173-182 (2015)
6. Tanner M. E.: *Natur. Prod. Rep.* 32, 88-101 (2015)
7. Ekinci R., Otağ M., Kadakal Ç.: *Food. Chem.* 150, 17-21 (2014)
8. Yassihüyük N., Kadakal Ç., Otağ M. 5, 379-384 (2014)
9. Lohr D., Woeck Ch., Meinken E.: *Eur. J. Hort. Sci.* 82, 3-11 (2017)
10. Ito M., Ishimaru M., Shibata T., Hatate H., et al.: *Food Anal. Method*, 10, 2692-2699 (2017)
11. Zhou J., Guan W., Liang C., Yang F., et al.: *Anal. Let.* 48, 241-247 (2015).
12. Gancarz M., Wawrzyniak J., Gawrysiak-Witulska M., Wiącek D., et al.: *Int. Agrophys.* 31, 317-325 (2017).
13. Luong J. H. T., Male K. B., Glennon J. D.: *Analyst*, 134, 1965-1979 (2009).
14. Suljkanović M., Grabarczyk M., Wardak C., Adamczyk M., et al.: *Environment. Eng.* 6, 1-6 (2019).
15. Vukojević V., Djurdjić S., Švorc L., Veličković T. Č., et al.: *Food Anal. Met.* 11, 2590-2596 (2018).