



# Direkte Bioautographie – eine neue Dimension der Non-target-Analytik

Was enthält unsere Nahrung wirklich?

Ines Klingelhöfer | Prof. Dr. habil. Gertrud Morlock

Bei der Aufnahme von Nahrung, Nahrungsergänzungsmitteln und der Verwendung von Kosmetika wissen wir häufig nicht, was wir alles zu uns nehmen. Der Cocktail aus Inhaltsstoffen kann sowohl positive als auch negative Einflüsse haben. Bioaktive Substanzen, die endokrine, bakterizide, antimykotische, virostatistische und sogar zytotoxische Wirkung haben, können so unerkannt dem Organismus zugeführt werden. Es gibt eine Reihe von Bioassays, die in der Planar-Chromatographie Anwendung finden und die Vorteile der Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie (HPTLC) mit wirkungsorientierten Mikroorganismen koppeln.

Ein solches Verfahren ist der planare Yeast Estrogen Screen (pYES). Ein gravierender Nachteil der bioautographischen Methode ist die starke Diffusion der Substanzzonen [1] durch die Inkubation der HPTLC-Platte mit dem wässrigen Zellkulturmedium. Durch die Umstellung auf wasserbenetzbare Umkehrphasen und einen stark veränderten pYES-Arbeitsablauf konnte diese Diffusion nun unterbunden werden (Abb. 1) und die Trennung von endokrin wirksamen Substanzen in Standardmixturen als scharf begrenzte, blau fluoreszierende Zonen erreicht werden (Abb. 2). Mit diesem optimierten Verfahren ist es zum ersten Mal möglich, einzelne bioaktive Wirkstoffe in komplexen Naturstoffen, als Non-target-Methode, präzise zu qualifizieren und sogar zu quantifizieren [2]. Dieses Ergebnis ist von allgemeinem Interesse für alle wässrigen Bioassay-Anwendungen in Verbindung mit der Planar-Chromatographie. Es hat Einfluss auf den gesamten Bereich der direkten Bioautographie, die nun eine attraktive und effektive Methode für Mediziner, Pharmazeuten, Biologen, Biotechnologen, Lebensmitteltechnologien, Lebensmittelchemiker und Umweltwissenschaftler ist.

Naturstoffe enthalten eine Vielzahl von Inhaltsstoffen, deren bioaktive Wirkung bis heute nur aufwändig zu untersuchen war und womöglich noch nicht erkannt wurde. Als Beispiel für einen solchen komplexen Naturstoff

wurde Propolis analysiert. Bei der Untersuchung von sieben handelsüblichen Propolisproben (Tinkturen, Kapseln und Lutschtabletten) konnten sechs endokrin wirksame Substanzen detektiert werden (Abb. 3) [3]. Die Tinkturen wurden direkt oder allenfalls verdünnt auf die HPTLC-Platte aufgetragen, die Kapseln und Tabletten wurden mit Ethanol extrahiert. Die Identifizierung der bioaktiven Substanzen konnte sowohl durch eine chromatographische Methode (Standardaddition mit nur teilweise überlappend aufgetragener Standard-/Probephase) als auch durch Kopplung mit der Massenspektrometrie via Elutionskopf-basiertem TLC-MS Interface [4] parallel zur Bioautographie durchgeführt werden (Abb. 4). Mit dem grundlegend überarbeiteten und optimierten pYES-Assay ist es erstmalig möglich, aufgrund der scharf begrenzten Zonen, einzelne Inhaltsstoffe in einem Probenmisch zu quantifizieren (Abb. 5). Dieses direkte bioautographische Verfahren kann innerhalb von fünf Stunden 20 Proben auf die Anwesenheit von estrogen wirksamen Stoffen parallel analysieren. Ohne separate Anreicherungsschritte liegt die Nachweisgrenze für Estrogene, wie 17 $\beta$ -Estradiol (E2) und 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol (EE2), im ng/L-Bereich, da beispielsweise E2 noch in einer Menge von 0,5 pg pro Zone auf der HPTLC-Platte detektiert werden kann. Der Nachweis kann somit in einem pharmakologisch relevanten Bereich geführt werden.

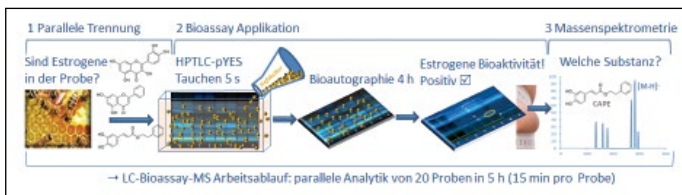


Abb. 1: Schematische Darstellung des optimierten pYES-MS-Arbeitsablaufes [3]

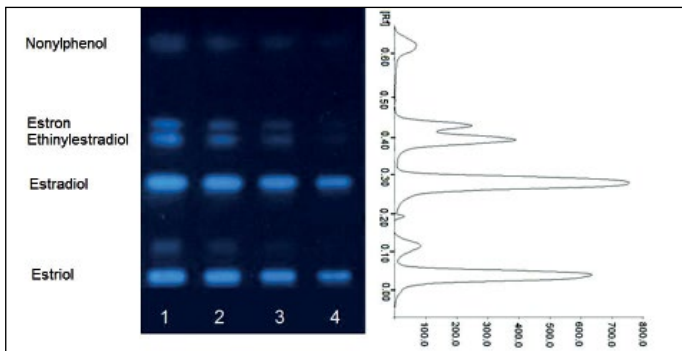


Abb. 2: Scharf begrenzte, blau fluoreszierende Zonen nach 4 h Inkubation in wässrigem Medium [3]

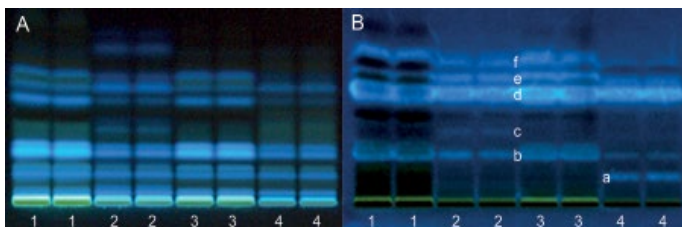


Abb. 3: Vier Propolisproben (Doppelbestimmung) mit nativ fluoreszierenden Zonen nach Chromatographie (A) sowie Methylumbelliferon-blau fluoreszierenden Zonen nach direkter Bioautographie (B) [3]

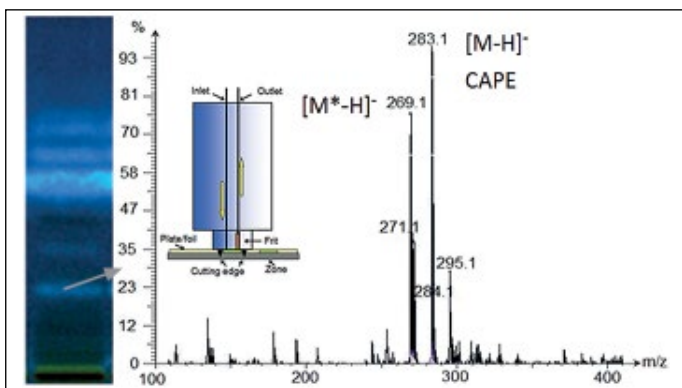


Abb. 4: Nachweis einer endokrinen Substanz mittels HPTLC-ESI-MS via TLC-MS Interface [3]

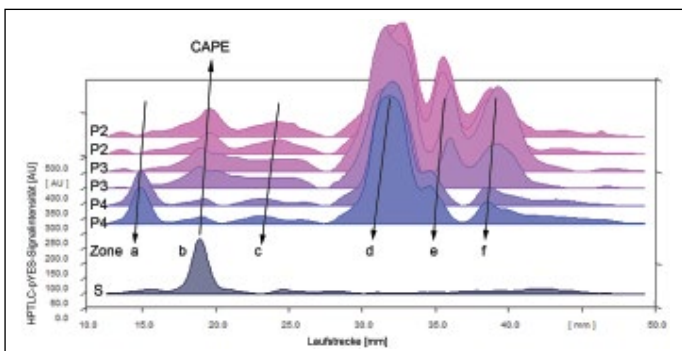


Abb. 5: Densitogramm zur Quantifizierung von im Handel erhältlichen Propolisproben nach direkter Bioautographie (Fluoreszenzmessung bei UV 366/>400 nm) [3]

Propolis werden bakterizide, antimykotische, virostatistische und auch zytotoxische Effekte zugeschrieben. Doch welche Inhaltsstoffe bewirken diese pharmakologischen Beobachtungen? Diese Frage lässt sich in Zukunft mit der Non-target-HPTLC-Bioassay-Methode durch den gezielten Einsatz spezifischer Mikroorganismen beantworten, ohne selektive Probenaufbereitung und unabhängig von eventuell hoher Matrixlast. Die Aussage „Propolis zeigt antibakterielle Wirkung“ kann z.B. mit *Bacillus subtilis* als eingesetzte Mikroorganismen [5] verifiziert werden. Im gleichen Analysenverfahren können die entdeckten, bioaktiven Komponenten über die HPTLC-MS-Kopplung weitergehend charakterisiert werden.

Ist dies vielleicht ein Weg, neue Antibiotika-Stoffklassen zu identifizieren? Oder ist es eine Möglichkeit den Wirkmechanismen von Heilkräutern der traditionellen Medizin auf die Spur zu kommen? Die professionelle direkte Bioautographie besitzt die Kapazität dazu. Mit den für die Fragestellungen geeigneten Mikroorganismen und einer kreativen Anpassung der Kultivierung auf der HPTLC-Platte, steht die HPTLC-Bioassay-MS-Methode erst am Anfang eines umfangreichen Einsatz- bzw. Wirkungsspektrums.

[1] Müller, M.B., et al. *Chromatographia* 60 (2004) 207-211  
 [2] Klingelhöfer, I., Morlock, G.E. *J Chrom A*, in Druck  
 [3] Morlock, G.E., Klingelhöfer, I. *Anal Chem*, in Druck  
 [4] Morlock, G.E., Schwack, W. *Trends Anal Chem* 29 (2010) 1157-1171  
 [5] Jamshidi, M., Morlock, G.E. Posterbeitrag, International Symposium for HPTLC, Lyon, 2014, www.hptlc.com



Autoren | Kontakt

**Ines Klingelhöfer | Prof. Dr. Gertrud Morlock**

Justus-Liebig-Universität Gießen  
 Institut für Ernährungswissenschaften IFZ  
 Heinrich-Buff-Ring 26–32 | 35392 Gießen  
 www.uni-giessen.de/cms/food