

Ich sehe was, was Du nicht siehst!

Was leistet die Hochleistungs-dünnschichtchromatographie gekoppelt mit wirkungsbezogener Analytik und Massenspektrometrie?

Autoren:

Wolfgang Schwack, Gertrud E. Morlock, Justus-Liebig-Universität Gießen,
Lehrstuhl für Lebensmittelwissenschaften, und Interdisziplinäres Forschungszentrum (IFZ),
Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen

Ein non target-Screening mittels schneller Flüssigkeitschromatographie gekoppelt an hochauflösende Massenspektrometrie (z. B. UH-PLC-HRMS) liefert für Umweltproben wie Oberflächengewässer und Grundwasser und besonders für Lebensmittel Tausende von Peaks, die kaum einer chemischen Struktur zugeordnet werden können. Datenbankbasiert gelingt die Suche nach den so genannten „known unknowns“, wie beim Screening nach Pflanzenschutzmittelrückständen in Obst und Gemüse oder Pestizidkontaminationen in Trinkwasser. Übrig bleiben immer noch Tausende von Substanzen, deren Struktur und biologische Wirkung erst einmal unbekannt sind. Eine ähnliche Situation begegnet uns bei Migrationsexperimenten in der Bedarfsgegenstände-Analytik mit einer Vielzahl von „intentionally“ und „non-intentionally added substances“ (NIAS). Und was ist mit den Substanzen, die das Massenspektrometer mangels erfolgreicher Ionisierung gar nicht sieht?

Wir kennen nur wenige der vielen Inhaltsstoffe in Lebensmitteln, Nahrungsergänzungsmitteln oder Pflanzenextrakten, die auch als Zutaten für kosmetische Mittel zunehmend eingesetzt werden. Pflanzliche Rohstoffe sind komplexe Naturstoffgemische aus einer Fülle von Substanzen, deren Bioaktivitäten mit wenigen Ausnahmen meist un-

bekannt sind. Viele werden auf rein empirischer Grundlage als Arzneimittel in der traditionellen Medizin eingesetzt. Intensiv wird mit mühsamen Methoden im Phyto- und Mikrobiom nach neuen Leitstrukturen für Antibiotika gesucht, um das große Problem mit multiresistenten Keimen in den Griff zu bekommen. Hinzu kommt die Suche nach Rück-

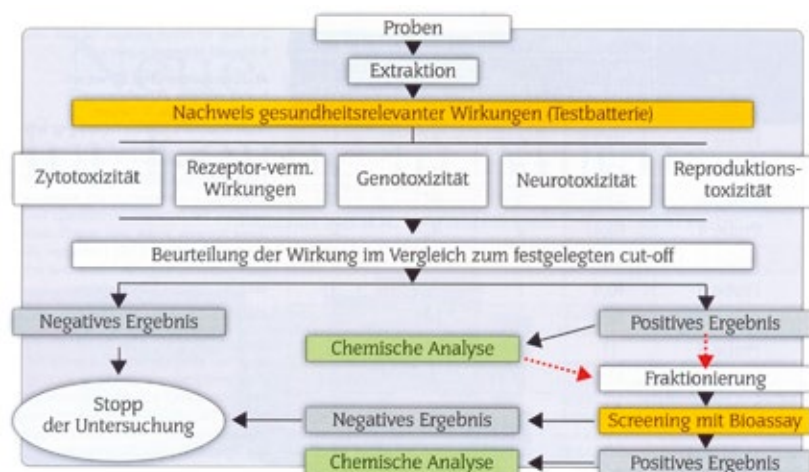


Abb. 1: Testbatterie und Abläufe der wirkungsbezogenen Analytik (Food Lab 2, 2011, 32-34).

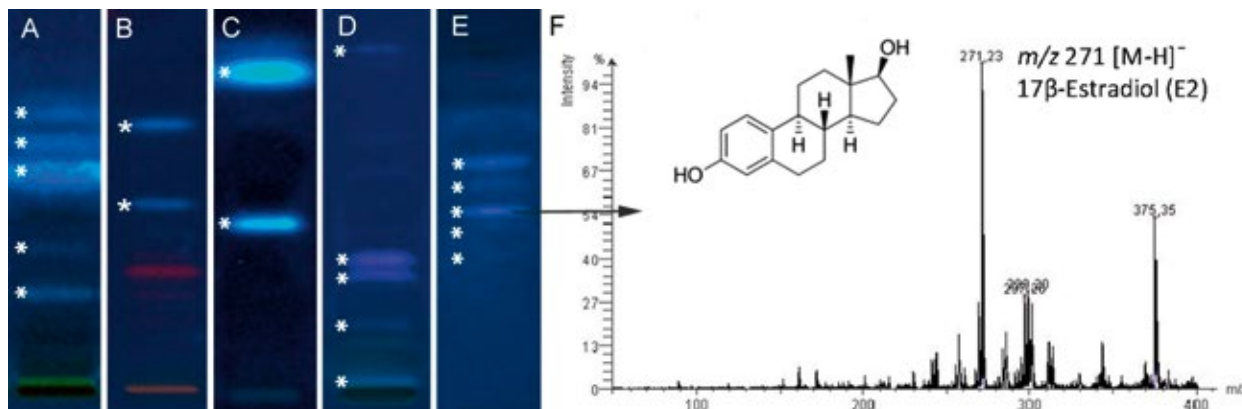


Abb. 2: Der direkte Link zur wirkenden Verbindung: HPTLC-pYES findet estrogenartig wirkende Verbindungen (*blaue Zone) in Propolisprodukt (A), Gewürz (B), Bier (C), Wein (D) und Gießener Abwasser (E) sowie HPTLC-MS der estrogenartig-wirkenden Zone im Abwasser (F) ^[4-6].

ständen, Kontaminanten und unbekannten Abbauprodukten.

Erste Ansätze

Dieser Frust hat im Bereich der Ökotoxikologie dazu geführt, die Unbekannten wirkungsbezogen einzugrenzen. Die wirkungsbezogene Analytik (effect-directed analysis)

wurde zu Anfang dieses Jahrhunderts eingeführt. Das Target ist eine gesundheitsrelevante Wirkung, d. h. eine biochemische oder biologische Wirkung: Zytotoxizität, Genotoxizität oder Neurotoxizität, die mit einer Testbatterie abgeprüft werden (Abb. 1). Im Falle einer positiven Testantwort gilt es, den Verursacher

zu identifizieren. Dazu wird die Probe mittels HPLC fraktioniert und der Wirkungstest mit den Fraktionen wiederholt, um die verantwortlich Substanz einzukreisen und schließlich zu identifizieren, ein äußerst mühsames und langwieriges Unterfangen. Wirkungsbezogene Analytik eignet sich auch als Screening-Test,

Anzeige

-ebro-
a xylem brand

HACCP

WAR NOCH NIE SO EINFACH

Einhaltung der Hygiene-Vorgaben mit dem ebro® HACCP-System

- Dokumentation der Temperatur-Messdaten
- Effiziente Qualitätssicherung
- Kosten- und Aufwandssenkung
- Drahtlose Datenübertragung dank Bluetooth Low Energy
- Erkennung von Benutzern und Orten dank NFC-Reader
- Drahtlos ladbarer Akku
- Ablesen auch im Dunkeln dank beleuchtetem Display
- Display kann „Kopf stehen“: Ablesen aus beiden Richtungen möglich

www.ebro.com

Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, ebro · Peringerstr. 10 · 85055 Ingolstadt · Tel: +49 841 954780 · Fax: +49 841 95478-80 · E-Mail: ebro@xylem-inc.com

um nur die wenigen verdächtigen Proben einer aufwändigen Chromatographie-Massenspektrometrie zuzuführen. Ein gut etabliertes Beispiel liefert hier der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-Test, ein Beispiel für eine Rezeptor-vermittelte Wirkung. Dioxine und verwandte Substanzen binden an den Ah-Rezeptor in Ratten-Leberkrebszellen, gefolgt von einer stabilen mehrtägigen Expression von CYP1A1 aus der P450-Familie, das 7-Ethoxyresorufin zum stark fluoreszierenden Resorufin oxidativ desalkyliert. Mit dem EROD-Test hat die wirkungsbezogene Analytik Einzug in die Lebensmittelkontrolle genommen [1–3].

Die elegante Lösung

In allen genannten Bereichen muss es das Ziel sein, unbekannte Wirkungen einfach und schnell zu entdecken [4]. Das kann die Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) leisten, die im Unterschied zur HPLC direkt mit einem Bioassay gekoppelt werden kann (Bioautographie), da die mobile Phase (organische Lösungsmittel) nach der Chromatographie einfach abdampft und so keinen biologischen oder enzymatischen Assay stört, während die wirkenden Substanzen auf der HPTLC-Platte

liegenbleiben. Lange Zeit wurden für die Bioautographie Normalphasen-Kieselgelplatten eingesetzt, die aus Kosten- und Flexibilitätsgründen weitverbreitete Standardplatte. Wässrige Systeme und längere Inkubationen bei hoher Luftfeuchtigkeit, notwendig für den Bioassay, bewirken jedoch eine starke Diffusion der zuvor scharf getrennten Substanzen, zu Lasten der Empfindlichkeit und der Trennschärfe. Dieses Problem konnte kürzlich durch Einsatz wasserbenetzbarer Umkehrphasen (RP18-W) behoben werden, um eine neue Ära der quantitativen wirkungsbezogenen non-target Analyse einzuleiten [5–7].

Beispiel 1: Entdeckung estrogenartiger Wirkstoffe

Ein schönes Beispiel für eine Rezeptor-vermittelte Wirkung, das sich elegant im Sinne einer Bioautographie realisieren lässt, liefert der planare yeast estrogen screen (pYES), der ansonsten in Mikrotiterplatten durchgeführt wird. Eine gentechnisch modifizierte Hefe verfügt über einen humanen Estrogenrezeptor sowie über ein Reportergen, das z. B. für β -D-Galactosidase codiert. Wird der Rezeptor durch eine estrogen-

wirksame Substanz aktiviert, lässt sich die exprimierte β -Galactosidase durch ein geeignetes Substrat, wie 4-Methylumbelliferyl- β -D-galactosid, nachweisen und über eine Dosis-Wirkungsbeziehung auch quantifizieren. So konnten mit dieser optimierten direkten Bioautographie estrogenartig wirkende Inhaltsstoffe von Propolisproben (Kapseln, Tinkturen, Lutschtabletten) nachgewiesen werden, die meisten unbekannt (Abb. 2). Ein vergleichbares Szenario lieferten Gewürz-, Bier- und Weinproben (Abb. 2). Hopfeninhaltsstoffe (Prenylflavanone) sind als estrogenaktive Verbindungen bekannt und wurden für menstruelle Störungen bei Hopfenpflückerinnen verantwortlich gemacht. Beim Brauprozess (Würzekochen) werden diese offensichtlich vermehrt aus inaktiven Vorstufen gebildet [8]. Auch Gießener Abwasser- und Flußwasserproben wiesen Spuren Estrogenrezeptor-aktiver Verbindungen auf [6].

Da die Kopplung der HPTLC mit der (hochauflösenden) Massenspektrometrie inzwischen auch sehr einfach durchführbar ist, bietet sich dies für die Strukturaufklärung an, um im nächsten Schritt die bioaktiven Substanzen zu charakterisieren bzw. zu identifizieren (Abb. 2).

Beispiel 2: Entdeckung antimikrobieller Wirkstoffe

Andere gut etablierte Beispiele für die wirkungsbezogene Analytik mittels Planarchromatographie liefert der Leuchtbakterientest (*Aliivibrio fischeri*) oder der Bioassay mit *Bacillus subtilis*.

Der Bioassay mit Leuchtbakterien (Gram-negativ), als Küvettentest zur Beurteilung der allgemeinen Zytotoxizität in der Wasseranalytik etabliert, ist auf der HPTLC-Platte sehr einfach und schnell durchzuführen, da die Antwort der Leuchtbakterien spontan ist. Substanzen, die in ihren Energiestoffwechsel eingreifen, verhindern die Biolumineszenz mit dem Ergebnis dunkler HPTLC-Zonen auf grün leuchtendem Hintergrund (Abb. 3, Bahn als Grauwertbild dargestellt). *B. subtilis* (Gram-positiv) wird daneben

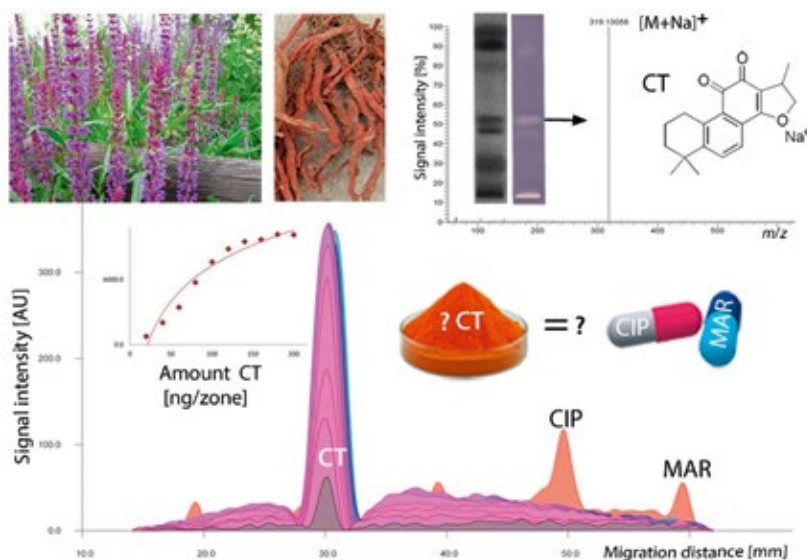


Abb. 3: Effektives Bioprofiling von pflanzlichen Extrakten läßt natürliche Antibiotika entdecken (Cryptotanshinon, CT), die ähnliche antibakterielle Wirkungen haben wie synthetische Antibiotika (Marbofloxacin, MAR, und Ciprofloxacin, CIP). Nachdruck mit freundlicher Genehmigung aus [9]

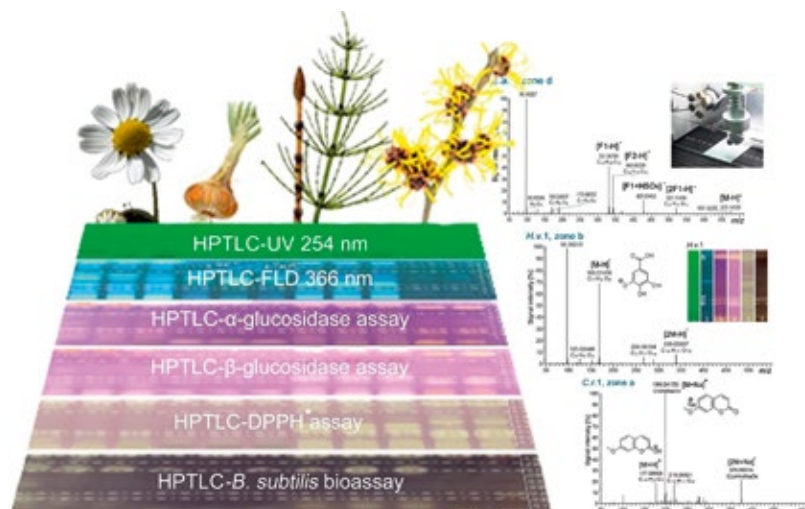


Abb. 4: Effektives Bioprofiling entdeckt Wirkstoffe. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung aus ^[12]

eingesetzt, um natürliche Antibiotika zu entdecken; lebende, stoffwechselaktive Zellen liefern einen violetten Hintergrund, während antibiotisch wirksame Substanzen helle Zonen liefern (Abb. 3) ^[9].

Beispiel 2: Entdeckung enzymhemmender Wirkstoffe

Das Screening nach Hemmstoffen für Cholinesterasen, ein altbekannter Assay in der Planarchromatographie ^[10], der ebenfalls als Küvettentest aus der Wasseranalytik kommt ^[11], spricht typischerweise auf entsprechend wirksame Neurotoxine (z. B. Organophosphorsäureester) an, ist aber auch interessant bei der Suche nach Wirkstoffen zur Behandlung der Alzheimer-Erkrankung. Hemmstoffe für α/β -Glucosidasen sind einerseits interessant für Diabetiker, andererseits als antivirale Wirkstoffe. Auch dieses Hemmstoffscreening lässt sich erfolgreich mit der HPTLC koppeln (Abb. 4, ^[12]).

Interesse an Weiterbildung?

Mit der Erweiterung der Batterie von Bioassays auf der leistungsstarken HPTLC-Platte z. B. auch hinsichtlich genotoxischer Assays wird in naher Zukunft ein umfangreiches Werkzeug verfügbar, um pflanzliche, tierische oder mikrobielle Rohstoffe, Lebensmittel und Lebensmittelkon-

taktmaterialien elegant, effizient, gezielt und wirkungsbezogen zu untersuchen, ob im positiven oder negativen Sinne ^[13]. Um die Gießener Studierenden an diese Analysetechnik heranzuführen, wurde ein neues Wahlmodul geschaffen, das im Wintersemester angeboten wird. Neben den Studierenden ist dieses Modul aber auch offen für Analytikerinnen und Analytiker aus der Praxis, die diese effiziente Analysetechnik kennenlernen möchten ^[14].

Referenzen

- ^[1] G. Böhmler, *Wirkungsbezogene Analytik - Ein neuer Weg in der amtlichen Lebensmittelüberwachung*, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 12 (2004) 491–498.
- ^[2] G. Böhmler, W. Brack, M. Gareis, R. Goerlich, *Von der Wirkung zur Substanz: Wirkungsbezogene Analytik als neue Untersuchungsstrategie in der Lebensmittelkontrolle*, *J. Verbr. Lebensm.* 1 (2006) 294–300.
- ^[3] R. Goerlich, *Wirkungsbezogene Analytik: Schnelles Dioxin-Screening*, *Food-Lab* (2) (2011) 32–34.
- ^[4] A. Klöppel, W. Gasse, F. Brümmer, G. Morlock, *HPTLC Coupled with Bioluminescence and Mass Spectrometry for Bioactivity-Based Analysis of Secondary Metabolites in Marine Sponges*, *J. Planar Chromatogr.* 21 (2008) 431–436.
- ^[5] I. Klingelhöfer, G.E. Morlock, *Sharp-bounded zones link to the effect in planar chromatography-bioassay-mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A* 1360 (2014) 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.07.083>.
- ^[6] I. Klingelhöfer, G.E. Morlock, *Bioprofiling of Surface/Wastewater and Bioquantitation of Discovered Endocrine-Active Compounds by Streamlined Direct Bioautography*, *Anal. Chem.* 87 (21) (2015) 11098–11104. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03233>.
- ^[7] G.E. Morlock, I. Klingelhöfer, *Liquid chromatography-bioassay-mass spectrometry for profiling of physiologically active food*, *Anal. Chem.* 86 (16) (2014) 8289–8295. <https://doi.org/10.1021/ac501723j>.
- ^[8] D. Schick, W. Schwack, *Detection of estrogen active compounds in hops by planar yeast estrogen screen*, *J. Chromatogr. A* 1532 (2018) 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.11.069>.
- ^[9] M. Jamshidi-Aidji, G.E. Morlock, *From Bioprofiling and Characterization to Bioquantification of Natural Antibiotics by Direct Bioautography Linked to High-Resolution Mass Spectrometry: Exemplarily Shown for Salvia miltiorrhiza Root*, *Anal. Chem.* 88 (22) (2016) 10979–10986. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02648>.
- ^[10] H. Ackermann, *Enzymatischer Nachweis phosphororganischer Insektizide nach dünn-schicht-chromatographischer Trennung*, *Nahrung* 19 (1966) 273–274. <https://doi.org/10.1002/food.19660100308>.
- ^[11] Deutsches Institut für Normung (DIN), DIN 38415-1:1995-02, *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Suborganismische Testverfahren (Gruppe T) - Teil 1: Bestimmung von Cholinesterase-hemmenden Organophosphat- und Carbamat-Pestiziden (Cholinesterase-Hemmtest) (T 1)*, Beuth, Berlin, 1995.