

Analytik von Phytoestrogenen in Bier und Hopfen mittels einer bioautographischen HPTLC-Methode

Einleitung

Mit dem Begriff Phytoestrogene werden Substanzen pflanzlichen Ursprungs bezeichnet, die an die humanen Estrogenrezeptoren (hER α und hER β) binden. Diese sekundären Pflanzeninhaltsstoffe, zu denen Flavonoide, Lignane, Coumestane und Stilbene zählen, haben sowohl agonistische als auch antagonistische Wirkung. Bei der Extraktion von Hopfen finden sich unter anderem die Polyphenole Xanthohumol (XN), Isoxanthohumol (IXN), Desmethylxanthohumol (DMX) und die prenylierten Naringenine 6-Prenylnaringenin (6-PN) und 8-Prenylnaringenin (8-PN). XN zeigt keine Estrogenität, IXN, DMX und 6-PN verfügen über eine geringe estrogene Aktivität und 8-PN gilt als das bisher bekannte stärkste Phytoestrogen [1,2]. Für 8-PN sind eine Reihe von positiven, estrogenmodulierten Eigenschaften bekannt. So wirkt die *in vivo* Gabe von 8-PN reduzierend auf den Serumspiegel von Cholesterin sowie Lipoproteinen niedriger Dichte (low-density lipoprotein, LDL) von Ratten [3] und kann den Abbau der Knochendichte bei ovariectomierten Ratten verhindern [4].

Ergebnisse und Diskussion

Die Übertragung eines flüssigen Bioassays (liquid yeast estrogen screen, L-YES) auf einen planaren Träger (DC-Schicht) wurde bereits vor über 10 Jahren gezeigt [5]. Ein gravierender Nachteil dieser bioautographischen Methode war die starke Diffusion der Substanzzonen durch die Inkubation der DC-Platte mit dem wässrigen Zellkulturmedium [6-8]. Durch die Verwendung von wasserbenetzbaren HPTLC-Umkehrphasen (RP-18W) und die Anpassung der Kultivierungsbedingungen der Mikroorganismen auf die veränderte Oberfläche, konnte diese Diffusion unterbunden werden. Durch den stark veränderten pYES-Arbeitsablauf war es nun möglich, endokrin wirksame Substanzen in Standardmixturen zu trennen und als scharf begrenzte, blau fluoreszierende Zonen darzustellen (Abb. 1) [9]. Dieses optimierte *Non target*-Verfahren bietet die Möglichkeit, einzelne bioaktive Wirkstoffe in komplexen Proben gezielt über die zusätzliche HPTLC-MS-Kopplung zu identifizieren und ebenso zu quantifizieren [10].

Bioautographischer Arbeitsablauf

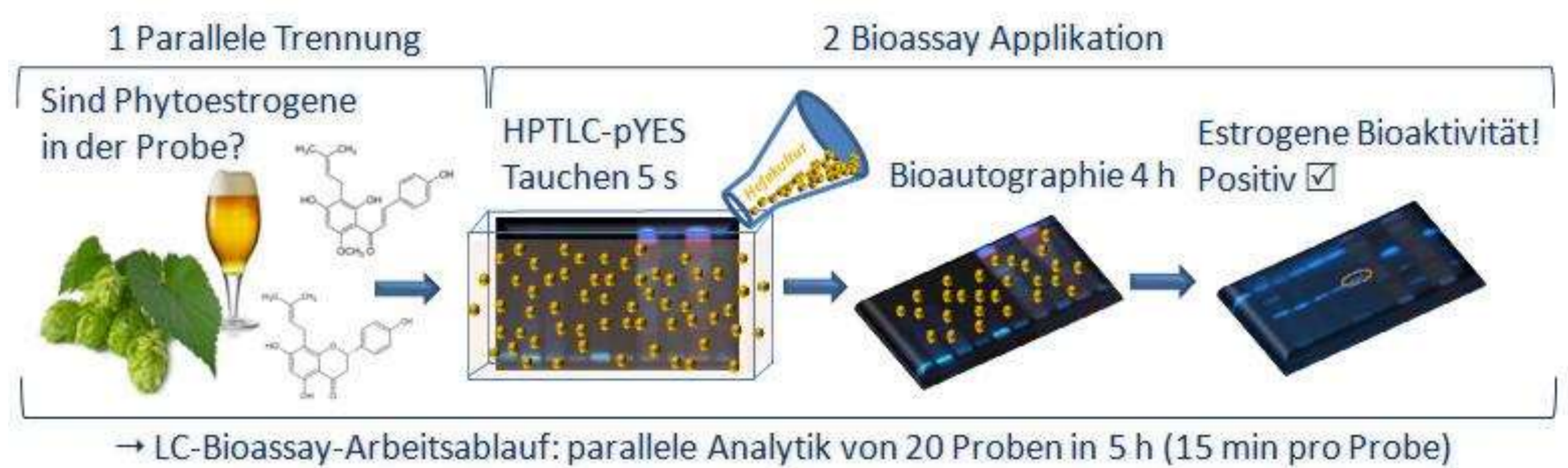


Abb 1. Bioautographischer Arbeitsablauf auf HPTLC-Platten RP-18W

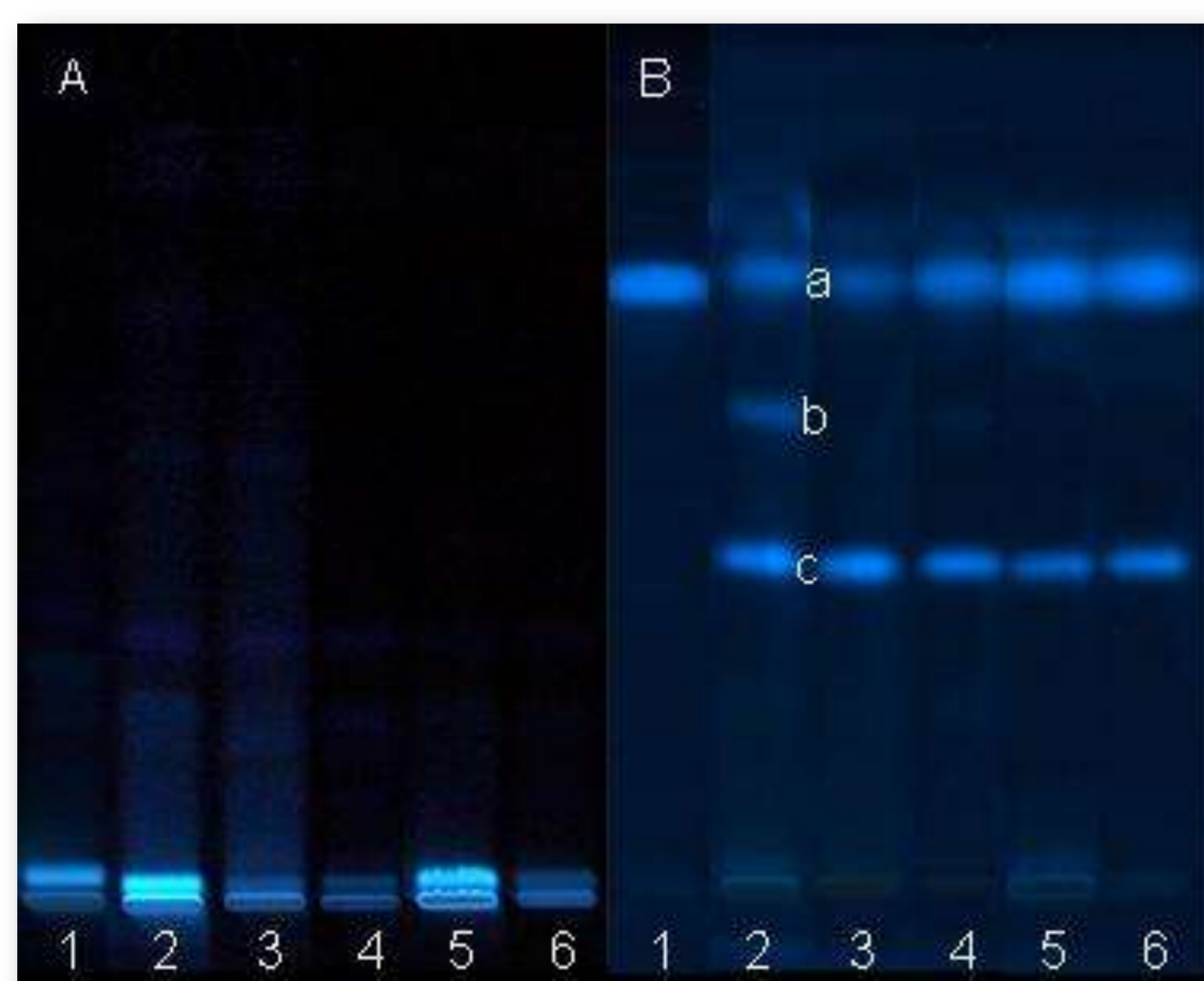


Abb. 2 Chromatogramme der Bierextrakte 1 bis 6 bei UV 366 nm: (A) native Fluoreszenz und (B) nach pYES Methylumbelliferon-blau fluoreszierende, bioaktive Zonen a bis c

Die Bierproben wurden mit Diethylether extrahiert, zentrifugiert und der Überstand wurde bis zur Trockene im Stickstoffstrom eingedunstet. Der Rückstand wurde in Methanol gelöst. Nach dem Auftragen auf HPTLC-Platten RP-18W erfolgte die Trennung mit einem Fließmittelgemisch aus *n*-Hexan, Ethylacetat und Toluol. Die Pellets des Hollertauer Aroma- und Bitterhopfens wurden gemörsert, extrahiert (Ethanol/Methanol/Aceton, 60 °C) und anschließend wurde das Chlorophyll mit Petrolether abgetrennt. Die je obere und untere Phase der Flüssig/Flüssig-Extraktion wurde analog zu den Bierproben chromatographiert. Nach der Trennung und der direkten Bioautographie zeigten sich für die Bierproben 1 bis 3 Zonen (Abb. 2 a-c) und für den Aroma- und Bitterhopfen 3 Zonen mit Estrogenität (Abb. 3 a-c).

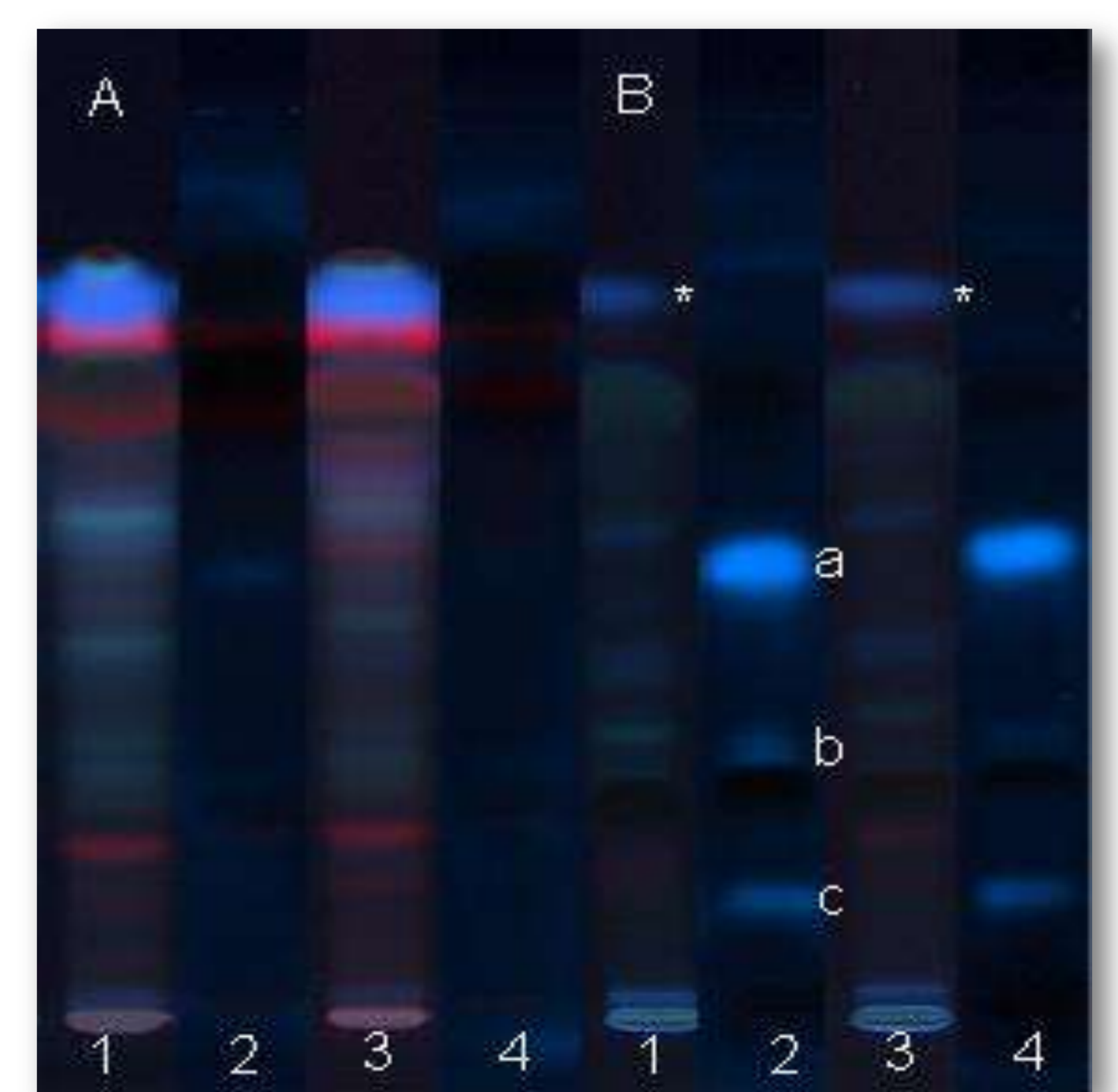


Abb. 3 Chromatogramme der Hopfenextrakte bei UV 366 nm: (A) native Fluoreszenz von Aromahopfen (1 obere und 2 untere Phase) und Bitterhopfen (3 obere und 4 untere Phase) sowie (B) nach pYES Methylumbelliferon-blau fluoreszierende, bioaktive Zonen a bis c (*stammt von starker nativer Fluoreszenz)

Fazit

Das *Non target*-Verfahren zeigt die Möglichkeit auf, nach geringer Probenaufarbeitung Estrogen-aktive Substanzen in Hopfen und Bier zu detektieren. Nachfolgend können gezielt diese bioaktiven Zonen mittels HPTLC-MS-Kopplung identifiziert und durch geeignete Standardsubstanzen quantifiziert werden.

Literatur [1] K. Effenberger, Dissertation, Universität Hamburg, 2004. [2] S.R. Milligan *et al.* J. Clin. Endocrinol. Metab. 83 (1999) 2249-2252. [3] M. Böttcher *et al.* J. Endocrinol. (2008) 395-401. [4] M. Hümpel *et al.* J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 97 (2005) 299-305. [5] M.B. Mueller *et al.* Chromatographia 60 (2004) 207-211. [6] S. Buchinger *et al.* Anal. Chem. 85 (2013) 7248-7256. [7] D. Spira *et al.* J. Planar Chromatogr. 26 (2013) 395-401. [8] A. Schönborn, A. Grimmer J. Planar Chromatogr. 26 (2013) 402-408. [9] I. Klingelhöfer, G.E. Morlock J. Chromatogr. A 1360 (2014) 288-295. [10] G.E. Morlock, I. Klingelhöfer Anal. Chem. 86 (2014) 8289-8295.

Dank an CAMAG, Muttenz, Schweiz und Merck, Darmstadt, für die Unterstützung mit Geräten und HPTLC-Platten.

