

# Non-target Schadstoff-Screening von Schokolade

Schadstoffe mit planaren Bioassays entdecken

Max Haumann | Prof. Dr. Gertrud Morlock

Die hier vorgestellte Methode ermöglicht die parallele Untersuchung von bis zu 20 Proben hinsichtlich möglicher toxischer und östrogenartiger Substanzen. Im Gegensatz zu bisherigen Methoden erfolgt dabei nur eine minimale Probenaufarbeitung, sodass alle Inhaltsstoffe einer Probe erfasst werden können. Die Methode hat das Potential, die routinemäßige Analytik von fetthaltigen Proben zu revolutionieren und den Verbraucherschutz deutlich zu verbessern.

Schokolade zählt zu den beliebtesten Süßigkeiten der deutschen Bevölkerung. Allerdings werden in regelmäßigen Abständen Kontaminationen festgestellt, wie beispielsweise genotoxische Mineralölrückstände, die als potenziell krebserregend eingestuft werden und darüber hinaus weitere gesundheitsschädliche Auswirkungen haben können. [1,2] In der Regel erfolgt deren Analyse mittels gekoppelter HPLC–GC–FID-Methodik. Bei komplexen Proben wird oftmals ein SPE-Cleanup durchgeführt, um den Hauptanteil der Fette zu entfernen, die die Chromatographie beeinträchtigen. Zudem kann eine weitere Aufreinigung der Probe oder deren Aufkonzentration erforderlich sein. Für die insgesamt 2–3-stündige Analyse fallen gewisse Kosten pro Probe an.

Meist erfolgt eine Zielsubstanz (Target)-Analyse nach bekannten Kontaminanten, jedoch nicht eine Non-Target-Analyse nach sämtlichen gesundheitsschädlichen Bestandteilen einer komplexen Probe. Zur Letzteren werden in-vitro-Bioassays (z. B. Mikrotiterplattenassay) eingesetzt, wobei sich die Probenvorbereitung an der Target-Analyse orientiert. Lipophile Proben sind aufgrund der zum Assaymedium stark unterschiedlichen Löslichkeit schwieriger zu untersuchen. Durch deren Entfettung geraten schädlich wirkende lipophile Substanzen aus dem analytischen Fokus. [3] Auch können Spuren von sehr stark wirkenden lipophilen Substanzen an das Plastikmaterial der Mikrotiterplatten adsorbieren und dadurch übersehen werden. Zytotoxizität oder auch Fluoreszenzquenching des toxikologischen Endpunkt-Signals können den genotoxischen Summenparameter verfälschen. [4] Derzeit liegen die Kosten für die Untersuchung der Genotoxizität

mit dem in vitro SOS-Umu-C-Bioassay im hohen vierstelligen Bereich pro Probe.

Die Ermittlung der toxikologischen Eigenschaften der einzelnen Substanzen in einer komplexen Probe erfordert eine Kombination der beiden zuvor erwähnten Methodiken. Dies ist mit einem großen Anstieg des Aufwands und der Kosten verbunden. Wird eine Säulenchromatographie mit anschließender mehrstündiger in-vitro-Bioassay-Detektion durchgeführt, erfordert dies die Dosierung der eluierenden Substanzen als Mikrofraktionen in eine separate Mikrotiterplatte durch einen zusätzlichen genau dosierenden Nanosplitter. Es erfolgt dann der aufwendige Abgleich der Ergebnisse zwischen Mikrotiterplattenassay und Säulenchromatogramm.

Als vergleichsweise effizientere und kostengünstigere Alternative können planare Bioassays eingesetzt werden, deren Leistungsstärke, Zeit- und Kosteneffizienz bereits gezeigt wurde. [5–7] Hierbei erfolgt auf dergleichen Adsorbensoberfläche die Kombination einer planar-chromatographischen Trennung mit einer planaren Bioassay-Detektion. Es ist eine direkte Erkennung der biologischen Aktivität einzelner Substanzen möglich. In einem Zeitraum von wenigen Stunden können bis zu 20 Proben getrennt und die einzelnen Bestandteile auf ihre toxikologischen Eigenschaften hin untersucht werden. Die dabei anfallenden Kosten belaufen sich inklusive Verbrauchs- und Personalkosten auf ca. 5 € pro Probe. Da Schokolade kontaminiert sein kann, wurde ein Screening nach Bestandteilen mit Genotoxizität, Zytotoxizität und Neurotoxizität durchgeführt.

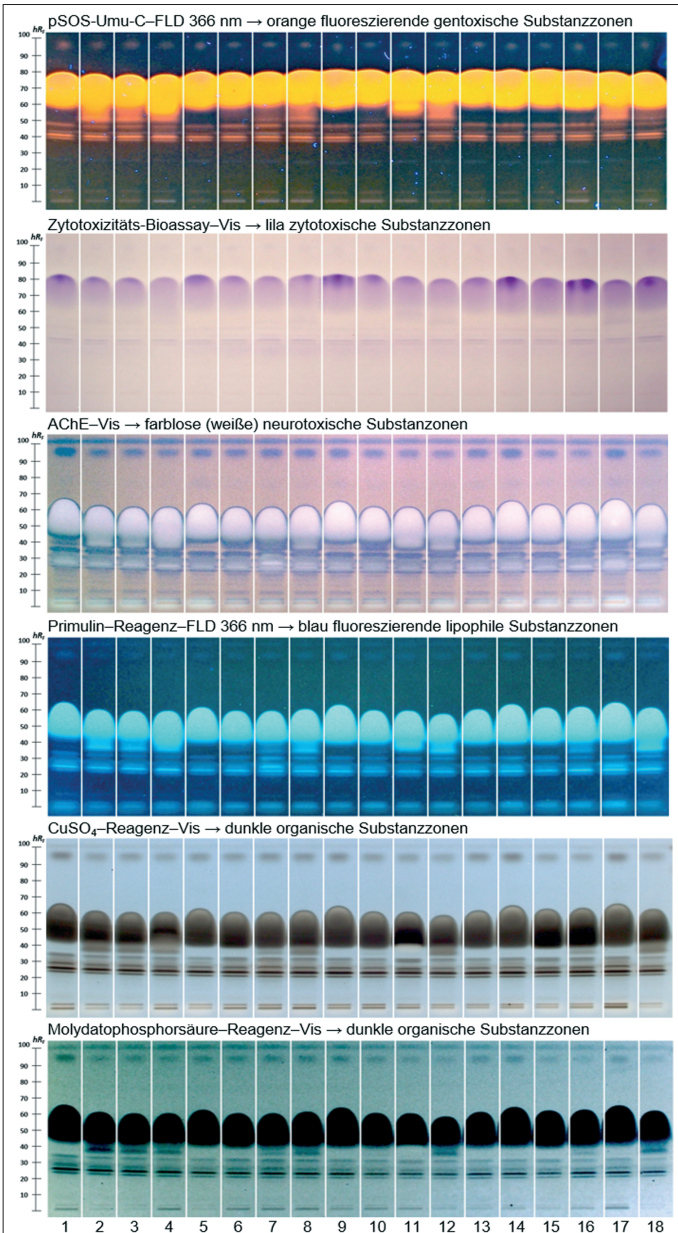


Abb 1: Toxizitäts-Screening von 18 unterschiedlichen Schokoladensorten: HPTLC-pSOS-UMU-C-Vis-Bioautogramm, HPTLC-Cytotox-Vis-Bioautogramm sowie HPTLC-AChE-Vis-Autogramm und Chromatogramme nach anschließender mehrfacher chemischer Derivatisierung (Reaktionssequenz auf derselben Platte) mit dem Primulin- (FLD), CuSO<sub>4</sub>- (Vis) und Molybdato-phosphorsäure-Reagenz (Vis).

- Im Gentoxizitäts-Bioassay mit dem Modelorganismus Salmonella TA1535/ pSK1002 wurden genetisch modifizierte Gram-negative Bakterien verwendet, die bei Kontakt mit genotoxischen Substanzen das Enzym  $\beta$ -Galactosidase produzieren. Dieses spaltet das danach aufgebraachte chromogene bzw. auch fluorogene Substrat. Der gebildete rosa Chromophor bzw. orange Fluorophor dient als messbarer Gentoxizitäts-Endpunkt. [4]
- Der Zytotoxizitäts-Bioassay wurde mit dem gleichen Salmonellenstamm bei gleicher Inkubationszeit durchgeführt, jedoch wurde Resazurin als Substrat hinzugegeben. Durch die Anwesenheit lebender Zellen erfolgt die Reduktion des violett gefärbten Resazurins zu rosafarbenem Resorufin und weiter zum farblosen Dihydroresorufin. Verbliebene violett gefärbte Resazurin-Zonen weisen auf Zytotoxizität hin.
- Im Neurotoxizitäts-Bioassays wurde Acetylcholinesterase auf die Adsorbensoberfläche mit den getrennten Proben aufgegeben, um die Enzymhemmung durch Probenbestandteile zu testen. Eine Gemischlösung von

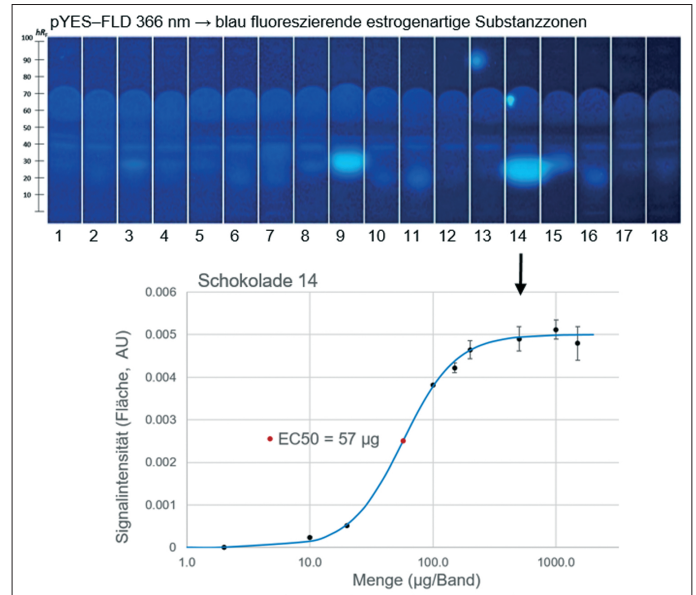


Abb 2: Screening von 18 unterschiedlichen Schokoladensorten nach östrogenartig wirkenden Substanzen (blau fluoreszierend) mit dem HPTLC-pYES-FLD-Bioassay und Dosis-Wirkungs-Kurve (n = 2) der Schokoladenprobe 14 mit einer ermittelten EC<sub>50</sub> von 57 µg.

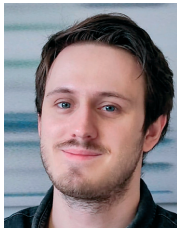
2-Naphthylacetat und Echtblau-Salz wurde als Substrat verwendet. Durch Inhibition der Acetylcholinesterase bildeten sich weiße Hemmzonen auf einem rosa gefärbten Plattenhintergrund.

Die Non-Target-Analyse der 18 unterschiedlichen Schokoladensorten auf Schadstoffe hat ergeben, dass sich in jeder Probe genotoxische, zytotoxische und neurotoxische Substanzen nachweisen ließen (Abb. 1). Diese sind nur in Spuren vorliegend, zeigen jedoch eine stark toxische Wirkung. Die stärkste genotoxische Wirkung (orange fluoreszierende Zonen) zeigten oxTAG und darüberliegend die Mineralölrückstände. Zudem lässt sich ein leichter Signalverlust durch Zytotoxizität (leicht violette oxTAG-Zonen) beobachten. Strukturelle Informationen können aus der nachfolgenden dreifachen Derivatisierungssequenz (auf demselben Bioautogramm) erhalten werden. Letztere erfolgt über das Primulin-, CuSO<sub>4</sub>- und Molybdato-phosphorsäure-Reagenz, die alle drei auf lipophile Strukturen hinweisen. Jedoch färbt das CuSO<sub>4</sub>-Reagenz bevorzugt einfach und doppelt ungesättigte Substanzen an, während das Molybdato-phosphorsäure-Reagenz organische Verbindungen anfärbt.

Schokolade kann auch Inhaltsstoffe oder Kontaminanten mit östrogenen Wirkung enthalten. [8-10] Daher wurde ein planarer Hefe-basierter Assay auf östrogenartige Substanzen (planar yeast estrogen screen, pYES)-Bioassay durchgeführt (Abb. 2). Der Reporterassay nutzt den humanen Östrogenrezeptor im gen-modifizierten Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* BJ1991. Bei Kontakt mit einer östrogenartig wirksamen Substanz wird das Enzym  $\beta$ -Galactosidase produziert. In der Folge wird das aufgebraachte fluorogene Substrat (4-Methylumbelliferon- $\beta$ -D-galactosid) durch das Enzym  $\beta$ -Galactosidase gespalten, wodurch ein blauer Fluorophor (4-Methylumbelliferon) freigesetzt wird (vor allem in Proben 9 und 14 zu sehen). Dieser steht in direktem Zusammenhang mit der Menge der östrogenartigen Substanz. Es können Dosis-Wirkungskurven erstellt sowie mittlere effektive Konzentrationen (EC<sub>50</sub>) bestimmt werden. Zum Beispiel zeigte Probe 14 eine EC<sub>50</sub> von 57 µg (Abb. 2). Der Pro-Kopf-Konsum von Schokolade in Deutschland beträgt ca. 24 g pro Tag, was der 421.000-fachen Menge der bestimmten EC<sub>50</sub> entspricht. [11] Der Konsum von Schokoladensorten wie 9 oder 14 könnte eine modulierende Wirkung auf den Hormonhaushalt haben.

## Literatur

- [1] Scientific Opinion on Mineral Oil Hydrocarbons in Food, EFS2 10, 2012.  
 [2] K. Grob, et al. Food Additives & Contaminants 8, 1991, 437–446.  
 [3] M. Biedermann, et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57, 2009, 8711–8721.  
 [4] G.E. Morlock, Chrom+food FORUM 8, 2023, 4–6.  
 [5] D. Meyer, et al. ALTEX 38, 2021, 387–397.  
 [6] G.E. Morlock, Anal. Chim. Acta 1180, 2021, 338644.  
 [7] A. Ronzheimer, et al. Phytomedicine 103, 2022, 154230.  
 [8] A. Vavrouš, et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry 67, 2019, 10968–10976.  
 [9] A. Czarnywojtek, et al. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 25, 2021, 4930–4940.  
 [10] K. Guenther, et al. Environ. Sci. Technol. 36, 2002, 1676–1680.  
 [11] CAOBISSCO, Pro-Kopf-Konsum von Schokoladenwaren in Europa nach Ländern im Jahr 2022, 2024.



Autoren | Kontakt

**Max Haumann | Prof. Dr. Gertrud Morlock**

Justus-Liebig-Universität Gießen | Professur für Lebensmittelwissenschaften  
 Heinrich-Buff-Ring 26-32 | 35392 Gießen | [www.uni-giessen.de/food](http://www.uni-giessen.de/food)

# ISC 2024

## 34th International Symposium on Chromatography

Liverpool, UK

6. – 10. Oktober 2024