

# Schadstoff-Screening von Lebensmitteln und Kosmetika

## Schadstoffe mit planaren Bioassays entdecken

Prof. Dr. Gertrud Morlock

### Die Kombination der drei Disziplinen Chemie, Biologie und Open-source-Technologien ermöglicht eine analytische Strategie zur Priorisierung wichtiger Schadstoffe in komplexen Proben.

Komplexe Proben wie Lebensmittel und Kosmetika werden kaum insgesamt auf Schadstoffe untersucht – bereits bekannte Schadstoffe hat man jedoch im Fokus. In ungerichteten (non-target) Analysen mittels in vitro Mikrotiterplatten-Assays erhält man einen Summenwert für schädliche Effekte in komplexen Proben. Ein solcher Mischwert ermöglicht aber keine Differenzierung der biologischen Endpunkte und ist, wenn überhaupt, nur sehr eingeschränkt für komplexe Proben aussagekräftig. Im Arbeitsablauf wird am Anfang oft entfettet. Dieser Probenteil wird dann verworfen und ist außerhalb des Radars. Zudem ist die Löslichkeit lipophiler Proben im polaren Bioassay sehr problematisch bzw. nicht möglich. Lipophile Probenbestandteile können an Mikrotiterplatten-Plastikmaterialien adsorbieren und geraten aus dem Fokus. Die tatsächlich für die Zellen verfügbare Konzentration wird bei lipophilen Proben oftmals nicht analytisch abgesichert. Zeigen komplexe Proben zudem Zytotoxizität (dies wird als separater Assay nur bedingt in der Praxis mitgetestet), muss die komplexe Probe verdünnt werden, womöglich so stark, daß der Mikrotiterplatten-Assay nicht mehr anspricht, da man unter dessen Detektionsgrenze rutscht. Man könnte nun die Fraktionierung der komplexen Lebensmittel- und Kosmetikproben durchführen und jede Fraktion mit dem Mikrotiterplatten-Assay testen und die zytotoxische Fraktion ausschließen, die den eigentlichen Schadstoff-Assay, z. B. auf endokrine oder genotoxische Substanzen, stört. Dieser immense Aufwand und vor allem auch die Kosten machen ein Screening von komplexen Proben auf unbekannte Schadstoffe in der Routine unmöglich.

Will man dennoch kostengünstig und schnell unbekannte Schadstoffe in komplexen Proben finden, kann man planare Bioassays einsetzen. Die Aussagekraft ist hier erhöht, da auf derselben Oberfläche eine chromatographische Trennung mit einer wirkungsbezogenen Detektion verbunden ist [1,2]. Je nach gewähltem Assay dauert das planare Bioassay-Screening 5–20 min pro Probe und generiert Verbrauchskosten von 0,50-1,00 € pro

Probe. Das erhaltene Bildformat faßt die Ergebnisse eines Screenings zusammen (Abb. 1). Die Eignung der Technik in der Routine wurde vielfach nachgewiesen [3-5].

Es können auch unterschiedliche Wirkungen differenziert werden (Abb. 2), wenn vor dem Bioassay gewisse Substanz-Streifen entlang jeder Probe aufgetragen werden. Der erste Agoniststreifen (fluoresziert erst nach dem Assay) detektiert antagonistische Substanzen durch Fluoreszenzsignal-Reduktion. Der zweite Endproduktstreifen (fluoresziert direkt, da es der Fluorophor ist, der sich am Ende des Assays durch die Enzym-Substrat-Reaktion bildet) detektiert falsch-positive Antagonisten durch Signallöschung (rein physiko-chemisches Fluoreszenzquenching; keine biologisch-induzierte Signalreduktion). Solch ein planarer Multiplex-Assay kann demnach differenzieren zwischen agonistischen, antagonistischen und falsch-positiv antagonistischen Wirkungen. Synergistische Effekte wurden auch beobachtet – vor allem wurde die estrogenen Aktivität [6,8], nicht jedoch die androgenen Aktivität [7,8], durch erstaunlich viele Pflanzenextrakte verstärkt.

Der Response des entstandenen biologischen Endpunkt-Signals ist quantitativ, d. h. je mehr Schadstoffmenge, desto stärker der Response. Dosis-Wirkungs-Kurven sowie Wirkdosen (EC50, IC50, etc.) können über die digitale Bildauswertung berechnet werden (Abb. 3).

Open-source-Entwicklungen sind zum Selbstbau frei verfügbar. Sowohl der Hardware-Blueprint als auch der Quellcode von Software und Firmware sind offen (nicht patentgeschützt). Dies befähigt Modifizierungen und Anpassungen am Gerät jederzeit selbst durchzuführen. Das kompakte 2LabsToGo-System (ca. 7 kg, 31 cm x 26 cm x 34 cm) umfasst alle relevanten Schritte, die normalerweise in einem Chemie- und Biologielabor durchgeführt werden [9,10]. Die instrumentellen Funktionen sowie die gewonnenen

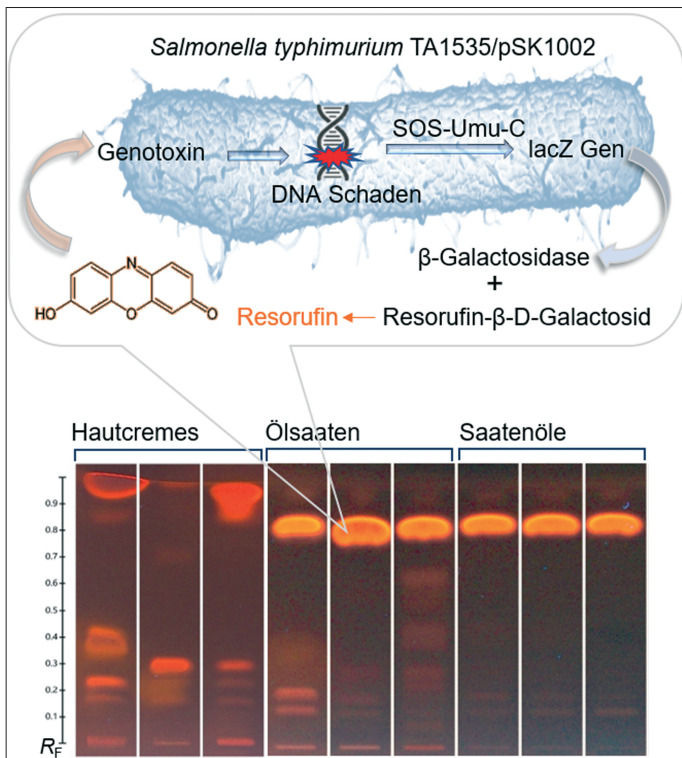


Abb. 1: Screening von Lebensmitteln und Kosmetika mit dem planaren Genotoxizitäts-Bioassay: HPTLC-FLD-pSOS-Umu-C Bioautogramm mit Genotoxinen als orange fluoreszierende Substanzen

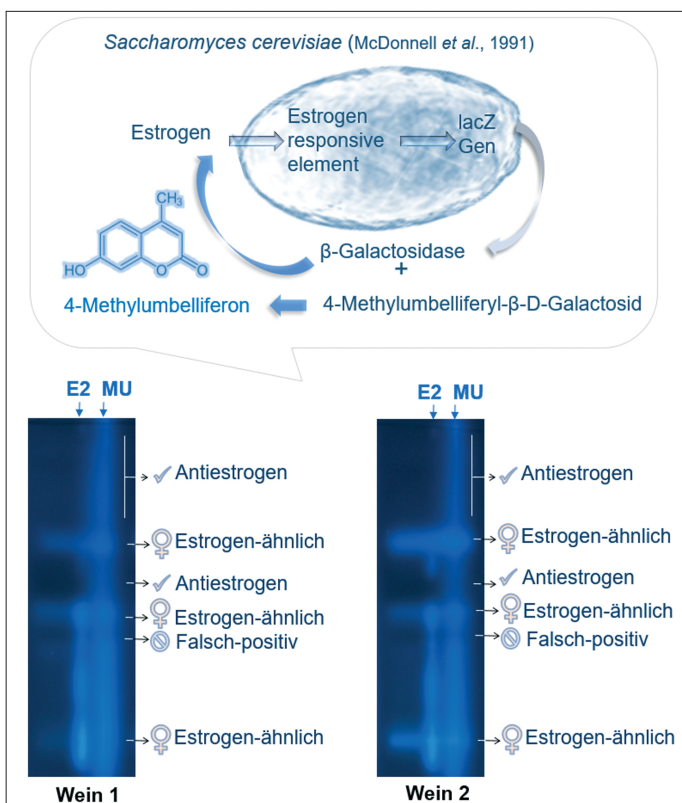


Abb. 2: Screening von Rotweinproben mit dem planaren multiplex Bioassay: HPTLC-FLD-pYAVES Bioautogramm mit blau fluoreszierende endokrin aktive Substanzzonen; die beiden Streifen sind 17β-Estradiol-Agonist (E2) und 4-Methylumbelliferon-Endprodukt (MU).

Daten und Ergebnisse sind nachweislich vergleichbar mit denen herkömmlicher Analytikgeräte, die zwei Labors ausfüllen. Die nachhaltig und minimalistisch umgesetzte automatisierte Probenauftragung, chromatographische Trennung, Multi-Imaging und wirkungsbezogene Detektion

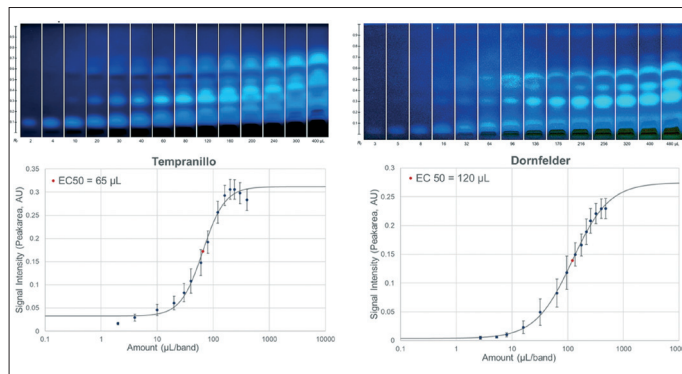


Abb. 3: Bioautogramme zur estrogenen Wirkung zweier Rotweinproben und daraus erhaltene Dosis-Wirkungs-Kurven und EC<sub>50</sub> (n = 3) von 65 µL (Tempranillo) und 120 µL (Dornfelder)

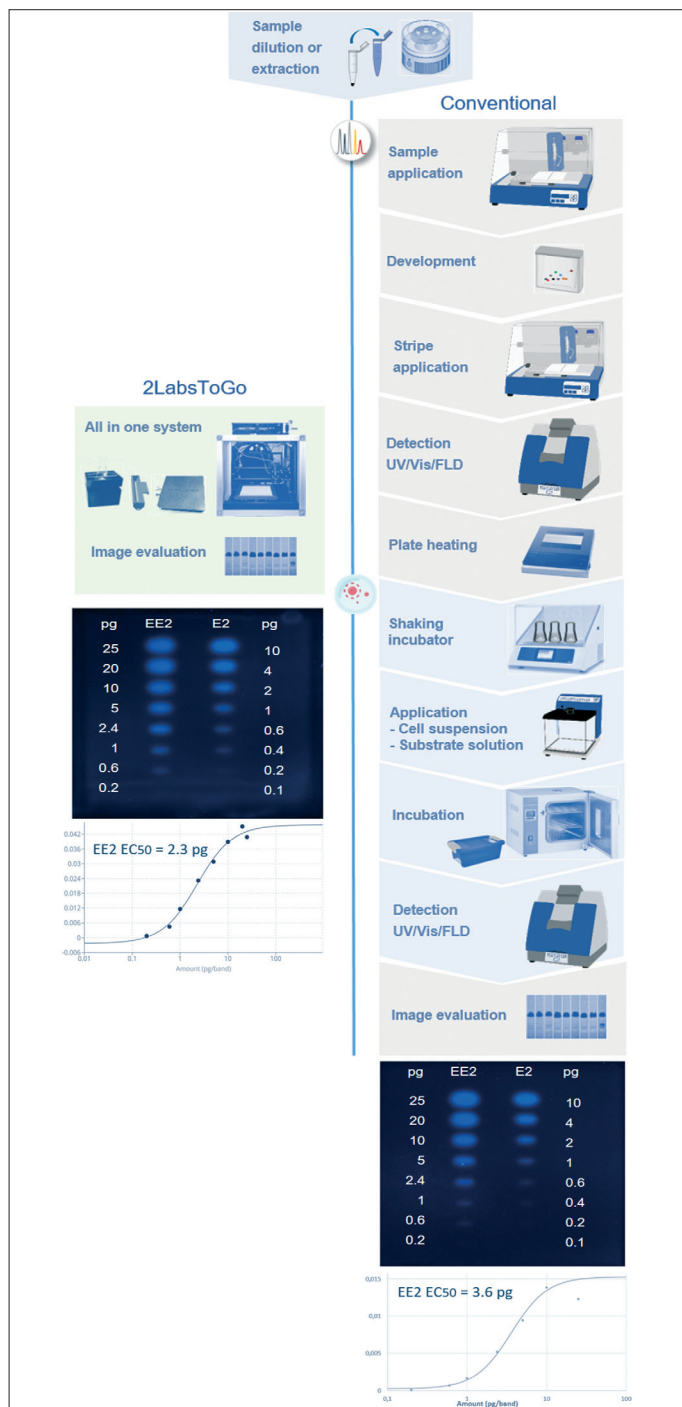


Abb. 4: Quantitativer Vergleich der EC<sub>50</sub>-Werte für Estradiol (E2) und Ethinylestradiol (EE2) unter Verwendung des 2LabsToGo-Systems im Vergleich zu modernsten Instrumenten für die Durchführung des planaren Hefe-Estrogen-Screens (pYES) Bioassays

werden auf ein- und derselben Adsorptionsmitteloberfläche kombiniert. Das Ergebnis liegt als Bild vor und zeigt die parallel und zeitgleich analysierten Proben. Auch für die Bildauswertung gibt es open-source Software [11-13].

Die Kombination der drei Disziplinen Chemie, Biologie und Open-source-Technologien ermöglicht eine analytische Strategie zur Priorisierung wichtiger Schadstoffe in komplexen Proben. Im Gegensatz zum vorherrschenden Trend möglichst alles zu trennen und sich in den Tausenden von unbekannt Signalen (keine Strukturdaten) mit unbekannter Aktivität (keine Toxizitätsdaten) im virtuellen Prognoseraum (Algorithmen zur Berechnung) zu verlieren [1,2] oder eine maßgeschneiderte, jedoch Substanzen diskriminierende Probenvorbereitung durchzuführen und damit wichtige Schadstoffe zu übersehen, hat diese günstige und schnelle Methodik großes Potential den Verbraucherschutz substantiell zu verbessern.

Expertise in diesen planaren Bioassays wird Februar/März 2024 vermittelt ([www.uni-giessen.de/food](http://www.uni-giessen.de/food)). Informationen zum Thema Vielstoffgemische gibt es auch bei der Initiative Vielstoffgemische ([www.vielstoff-gemische.de](http://www.vielstoff-gemische.de)) [14].

Dank an das Bundesamt für Ausrüstung, Informationstechnik und Nutzung der Bundeswehr (Forschungsprojekt E/U2AD/KA018/IF565) und die Deutsche Forschungsgemeinschaft (INST 162/471-1 FUGG, INST 162/536-1 FUGG).

## References

1. G.E. Morlock, *Phytochem. Review*, 2023, <https://doi.org/10.1007/s11101-022-09844-x>
2. G.E. Morlock, *Anal. Chim. Acta* 2021, 1180, 338644
3. G.E. Morlock, D. Meyer, *Food Chem.* 2023, 408, 135253
4. D. Meyer, et al. *Food Control* 147 (2023) 109546
5. D. Meyer, et al. *ALTEX* 2021, 38, 387-397
6. A. Ronzheimer, et al., *Phytomed.* 2022, 103, 154230
7. T. Schreiner, et al., *Food Chem.* 2022, 395, 133610
8. T. Schreiner, et al., *Front. Pharmacol.* 2021, 12, 755941
9. L. Sing et al., *Anal. Chem.* 2022, 94, 14554–14564
10. G.E. Morlock et al., *J. Chromatogr. A* 2023, 1688, 463720
11. D. Fichou, G.E. Morlock, *Anal. Chem.* 2018, 90, 12647–12654
12. D. Fichou, G.E. Morlock, *Anal. Chem.* 2018, 90, 6984–699
13. D. Fichou, et al., *Anal. Chem.* 2016, 88, 12494–12501
14. M. Bunse, et al., *Front. Pharmacol.* 2022, 13, 956541



## Autorin | Kontakt

### Prof. Dr. Gertrud E. 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)