

Paradigmenwechsel in der Analytik

Genotoxine und Hormone besser erkennen in Lebensmitteln und Kosmetika

Prof. Dr. Gertrud Morlock

Lebensmittel, kosmetische Mittel und Bedarfsgegenstände sind potenziell immer eine Quelle für Genotoxizität und Hormone. In diesen sind z. B. ungesättigte Fettsäuren, die leicht zu Hydroperoxiden und vor allem Epoxiden oxidieren und genotoxisch wirken können. Daher ist es wichtig zu wissen, wie man Öle am besten gewinnt, lagert und als Formulierung in Produkten stabil hält.

Kürzlich wurde gezeigt, dass die planare Chromatographie in Verbindung mit planaren wirkungsbezogenen Assays auf derselben Trennoberfläche [1-3] dem Stand der Technik überlegen ist. Die Stärke liegt in der Kombination von zwei Disziplinen (Chemie und Biologie) und Potenzierung der Aussagekraft. Zunächst werden viele Proben parallel auf einer planaren Trennphase grob in Fraktionen aufgetrennt und dann auf derselben Oberfläche mit Assays hinsichtlich ihrer biologischen Wirkung detektiert. Dadurch werden unter den vielen Tausenden von Verbindungen wichtige wirkende Substanzen priorisiert. Eine intensive Probenvorbereitung, die die Probe immer verändert, wird dabei vermieden. Denn eine umfassende Analytik setzt gerade das Nichtabtrennen von Probenbestandteilen voraus. Setzt man planare Assays zum Screening von Lebensmitteln und Kosmetika ein, findet man zum Beispiel genotoxische (Abb. 1) oder hormonell aktive Stoffe (Abb. 2).

Stellt man sich alle positiven und negativen Signale einer Probenbahn in einem planaren Assay (Abb. 1) als Summerwert vor – so wie es in einer Kavität eines Mikrotiterplatten-Assays der Fall ist, erkennt man die Problematik: vorhandene genotoxische Signale werden in komplexen Mischungen *in vitro* Assays schnell übersehen oder gehen im starken Quenching-Signal unter. Denn es fehlt die essentielle chromatographische Trennung. Erst durch die zuvor getrennte Probe sind die Effekte und Signale differenziert vorliegend und klar ersichtlich. Entscheidungen, die auf analytischen Erkenntnissen basieren, beeinflussen auch weitere Schlussfolgerungen und Ableitungen in der Risikoabschätzung, Ernährungsmedizin, Toxikologie, Humanmedizin etc. Ist die Analytik unzureichend, ist ein Erkennen von Zusammenhängen nicht möglich.

Die Differenzierung von Effekten ist für Schlussfolgerungen wichtig und kann sogar noch ausgebaut werden. Das offene Format der planaren Trennung ermöglicht das Auftragen von zwei Streifen über jede getrennte Probe (vor dem Bioassay). Dadurch kann man bei gleichem Aufwand nach dem Bioassay mehrere Effekte zeitgleich erfassen (Abb. 2). 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 physico-chemisches Fluoreszenzquenching und nicht 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 estrogenische Aktivität durch erstaunlich viele Pflanzenextrakte verstärkt [1], nicht jedoch die androgene Aktivität [2]. Dosis-Wirkungs-Kurven sowie Wirkdosen (EC_{50} , IC_{50} , etc.) können über die digitale Bildauswertung berechnet werden [3]. Unser Körper kann jedoch Schadstoffe in der Leber verstoffwechseln und im besten Fall entgiften. Vorausgesetzt die Leber ist in einem guten Funktionszustand und bis zum Erreichen der Leberzellen findet kein Schaden anderswo im Körper statt. Genauso kann unser Leberstoffwechsel aber auch andersherum "giften", das heißt aus Vorläufer-Molekülen die aktive Form in der Leber bilden und Stoffe erst giftig oder noch giftiger machen. Auch solche meist nachgeschalteten wichtigen Fragestellungen können durch die neue planare Technik untersucht werden (Abb. 3).

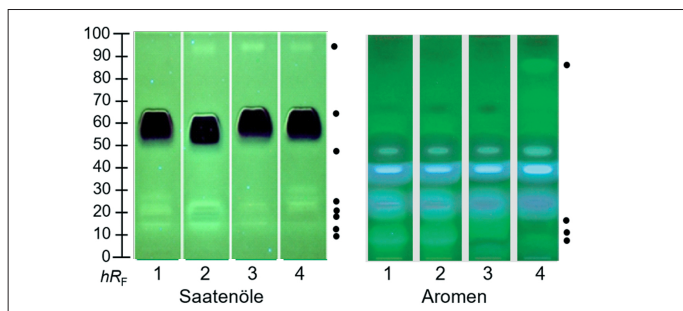


Abb. 1: Komplexe Proben untersucht mit dem planaren Genotoxizitäts-Assay^{4,5}, der durch einen gentechnisch veränderten *Salmonella typhimurium*-Stamm mit einem SOS-Umu-C-Reparaturmechanismus Genotoxine als grüne Fluoreszenzonen (●) nachweist.

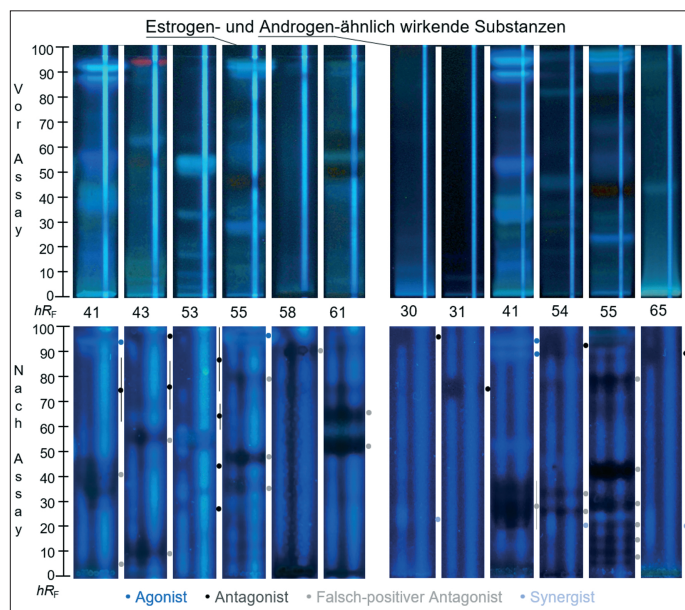


Abb. 2: Verschiedene Pflanzenextrakte IDs 30–65^{1,2} untersucht mit dem planaren Multiplex-Assay zur Detektion hormonähnlich wirkender Substanzen: Agonisten sind als Methylumbelliferon-blaue Fluoreszenzzone detektierbar, wohingegen Antagonisten eine Fluoreszenzsignal-Reduktion am ersten Agoniststreifen (fluoresziert erst nach dem Assay) und falsch-positive Antagonisten auch am zweiten Endproduktstreifen zeigen. Synergisten verstärken die blaue Fluoreszenz auf dem Agoniststreifen.

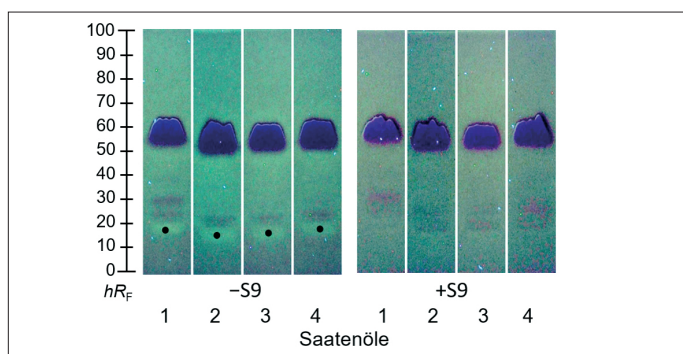


Abb. 3: Vier Saatenöle untersucht ohne (–S9) und mit (+S9) Metabolisierung durch das S9-Leberenzym-System und zeitgleich detektiert mit dem planaren Genotoxizitäts-Assay, der Genotoxine als grüne Fluoreszenzonen (●) darstellt, die durch die Lebermetabolisierung entgiftet wurden⁵.

minimale Probenvorbereitung. Die Investitionskosten liegen für kommerzielle Systeme höher, wohingegen ein open-source 2LabsToGo-System [9] um den Faktor 100 verringerte Materialkosten zur Anschaffung benötigt. Können Schadstoffzonen keinen bekannten Verbindungen in den komplexen Proben zugeordnet werden, ist es möglich, hochaufgelöste Massenspektren direkt vom Bio-autogramm durch automatisierte Elution [10] über eine zusätzliche orthogonale Trennung mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie zu erhalten. [8,11,12] Diese weitergehende Charakterisierung erfolgt bei Bedarf und macht die on-surface Assay-Strategie höchst effizient.

Fachwissen zu planaren wirkungsbezogenen Assays in Kombination mit der planaren Chromatographie wird jährlich vermittelt, und der nächste Kurs findet Ende Februar 2023 als Hybridmodul statt (www.uni-giessen.de/food). Interessierte können einen ersten Eindruck zum Thema Vielstoffe bei der Initiative zu Vielstoffen (www.vielstoffgemische.de) erhalten sowie Kontakte schließen und Hinweise zu Publikationen [13] erhalten.

References

- [1] Ronzheimer, A., Schreiner, T., Morlock, G.E. *Phytomed.* 2022, 103, 154230.
- [2] Schreiner, T., Ronzheimer, A., Friz, M., Morlock, G.E. *Food Chem.* 2022, 395, 133610.
- [3] Meyer, D., et al. *ALTEX* 2021, 38, 387-397.
- [4] Schreiner, T., Eggerstorfer, N.M., Morlock, G.E. 2022, in submission.
- [5] Meyer, D., Morlock, G.E. 2022, in submission.
- [6] Morlock, G.E., et al. *Molecules* 2021, 26, 1468.
- [7] Morlock, G.E., et al. *Antioxidants* 2021, 10, 117.
- [8] Schreiner, T., et al. *Front. Pharmacol.* 2021, 12, 755941.
- [9] Sing, L., et al. 2022, in revision.
- [10] Mehl, A., Schwack, W., Morlock, G. E. J. *Chromatogr. A* 2021, 1651, 462334.
- [11] Schreiner, T., Morlock, G.E. J. *Chromatogr. A* 2021, 1647, 462154.
- [12] Mehl, A., et al. *Food Chem.* 2021, 351, 129211.
- [13] Bunse, M., et al. *Front. Pharmacol.* 2022, doi: 10.3389/fphar.2022.956541.

Autorin | Kontakt

Prof. Dr. Gertrud E. Morlock

Justus-Liebig-Universität Gießen | Professur für Lebensmittelwissenschaften
Heinrich-Buff-Ring 26-32 | 35392 Giessen | <https://www.uni-giessen.de/food>



Planare Assay-Screenings in der Routineanalytik erkennen Schadstoffe proaktiv und verbessern die Sicherheit. Die Validität der neuen soliden Screening-Technik wurde vielfach gezeigt [1-12] und ist bereit, breit eingesetzt zu werden. Planare wirkungsbezogene Screenings dauern durch die parallele Analyse vieler Proben je nach Assay ca. 5-20 min pro Probe bei vergleichsweise geringen Verbrauchskosten und erfordern keine oder nur eine