

Schadstoffe **besser erkennen** in **komplexen** Proben

Ist womöglich ein Paradigmenwechsel in der Analytik angesagt?



Autorin: **Gertrud Morlock**, Justus Liebig Universität Gießen, Professur für Lebensmittelwissenschaften

Komplexe Proben wie Lebensmittel, kosmetische Mittel und Bedarfsgegenstände sind potenziell immer eine Quelle für Schadstoffe. In diesen sind aber auch z. B. ungesättigte Fettsäuren, die leicht zu Hydroperoxiden und vor allem Epoxiden oxidieren^[1] und dann genotoxisch wirken können^[2]. Daher ist es wichtig zu wissen, wie man Öle am besten gewinnt, lagert und als Formulierung in Produkten stabil hält. Die Analytik (als Basis unseres Wissens) kann Prozesse der Industrie begleiten und Probleme erkennen.

Über die Lebensmittel, Kosmetika und Bedarfsgegenstände, die wir täglich in (oder an) uns aufnehmen, ist wenig bekannt. Das liegt daran, dass dies komplexe natürliche Gemische sind, die aus Tausenden von Verbindungen bestehen, die nicht leicht umfassend analysiert werden können.^[3] Selbst für bekannte Zielsubstanzen sind Abbauprodukte und Metaboliten nicht unbedingt bekannt. Unbeabsichtigt vorhandene chemische Umwelt- und Lebensmittelverunreinigungen (Rückstände, Kontaminanten, etc.) und natürliche Toxine können die Gesundheit gefährden. Entlang der globalen Produktionskette können vor allem pulverförmige Zutaten leicht verfälscht werden^[4]. Ein nachhaltiges kreislauforientiertes Lebensmittelsystem (Green Deal), wie es bei Ersatzlebensmitteln oft der Fall ist, häuft Schadstoffe womöglich zudem an.

In der Vergangenheit wurden Kontaminationen und Betrug meist durch Whistleblowing und wenn, dann durch Zufall im analytischen Labor aufgedeckt. Es stellt sich die Frage, warum Lebensmittel nicht wenigstens routinemäßig auf toxische oder hormonelle

Verbindungen untersucht werden. Dies wird damit erklärt, dass wir bisher nicht über ausreichend schnelle Screening-Tools für komplexe Gemische verfügten. Zwar untersucht man komplexe Mischungen auch mit *in vitro* Mikrotiterplatten-Assays, aber hier sind womöglich Probleme ersichtlich.

Kürzlich wurde gezeigt, dass die planare Chromatographie in Verbindung mit planaren wirkungsbezogenen Assays auf derselben Trennoberfläche^[5-7] 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 Verbin-

dungen 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). Der Hintergrund kann in der Farbnuance variieren, verursacht durch kleinere pH-Unterschiede durch die jeweilige mobile Phase oder Plattencharge, was jedoch nicht kritisch ist, da Positiv- und Negativkontrollen sowie Lösungsmittel-Blindwerte auf jeder Platte mitgeführt werden.

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: Vorhande-

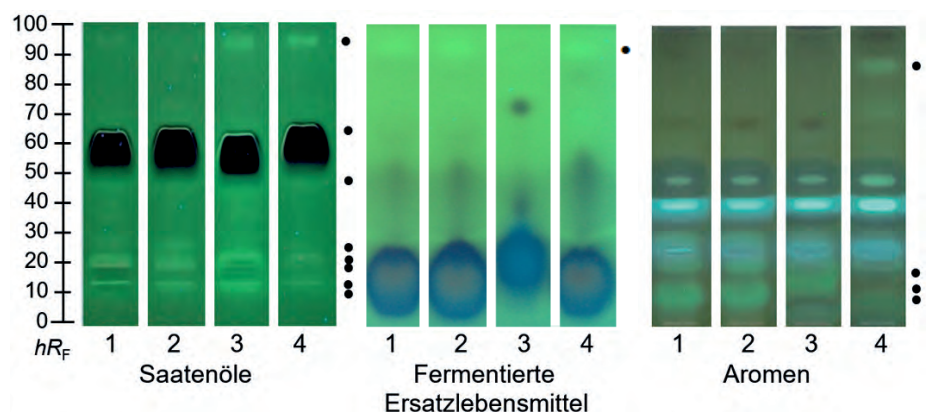


Abbildung 1: Komplexe Proben untersucht mit dem planaren Genotoxizitäts-Assay, der durch einen gentechnisch veränderten *Salmonella typhimurium*-Stamm mit einem SOS-Umu-C-Reparaturmechanismus Genotoxine als grüne Fluoreszenzonen (•) nachweist.

ne genotoxische Signale werden in komplexen Mischungen *in vitro* Assays schnell übersehen oder gehen unter im starken Quenching-Signal (verursacht durch z. B. Pigmente oder stark absorbierende Substanzen). 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 zwei-

te 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 estrogene Aktivität durch erstaunlich viele Pflanzenextrakte verstärkt^[5], nicht jedoch die androgene Aktivität^[6]. Der Ausschluss von Cytotoxizität kann in den Workflow eingebaut werden. Dosis-Wirkungs-Kurven sowie Wirkdosen (EC_{50} , IC_{50} , etc.) können über die digitale Bildauswertung berechnet werden. Im Vergleich zum Status quo müßten pro Probe fünf *in vitro* Assays durchgeführt werden (agonistischer, antagonistischer, falsch-positiver, synergistischer und cytotoxischer Assay) und die Ergebnisse miteinander verrechnet werden, um ein Bioautogramm annähernd zu ersetzen. Daher sind on-surface Assays für komplexe Proben von großem Vorteil.

Unser Körper kann 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 anderherum "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. Nebeneinander auf der Startzone können zum Beispiel metabolische Prozesse simuliert werden (Abb. 3)^[8-10] oder parallel auf zwei Plattenhälften (Abb. 4)^[11].

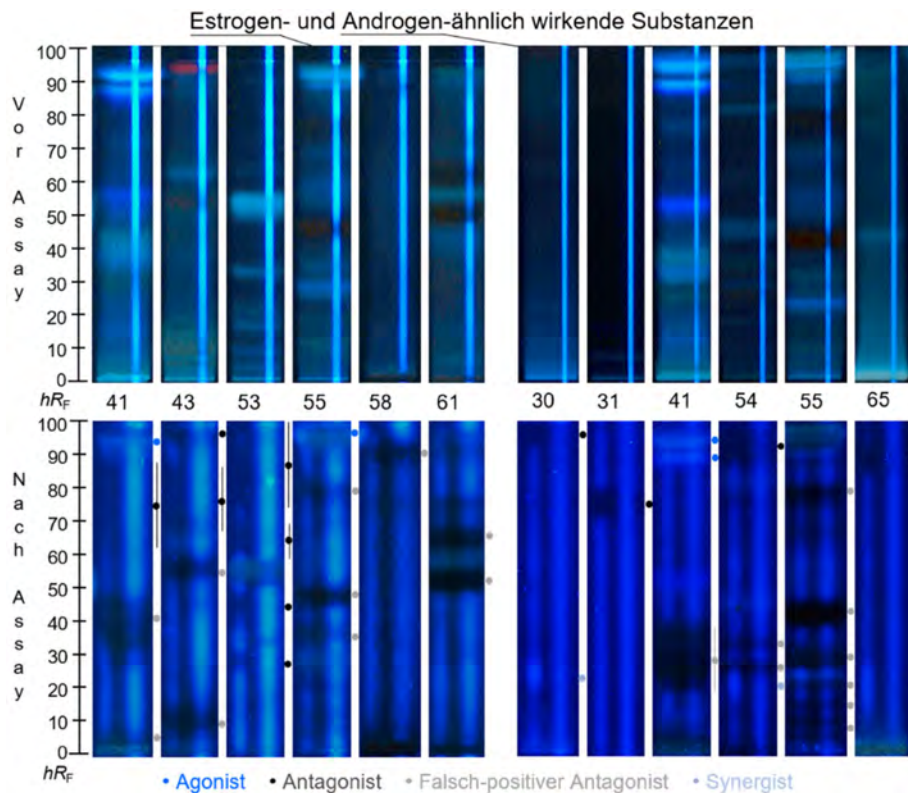


Abb. 2: Verschiedene Pflanzenextrakte IDs 30–65^[5,6] untersucht mit dem planaren Multiplex-Assay zur Detektion hormonähnlich wirkender Substanzen: Agonisten sind als (Methylumbelliferon-)blaue Fluoreszenzzone detektierbar, wohingegen Antagonisten eine Fluoreszenzsignal-Reduktion am ersten Agoniststreifen (fluoresziert erst nach dem Assay) und falsch-positive Antagonisten auch am zweiten Endproduktstreifen zeigen. Synergisten verstärken die blaue Fluoreszenz auf dem Agoniststreifen.

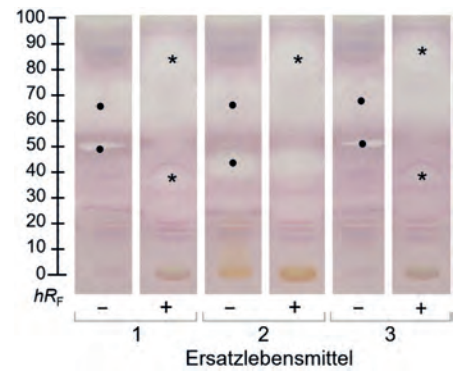


Abbildung 3: Drei Ersatzlebensmittel untersucht ohne (-) und mit (+) Verdau im Dünndarm simuliert auf der Startzone, dann getrennt und detektiert mit dem Acetylcholinesterase-Inhibitionsassay, der neurotoxische Zonen als farblose Zonen (vorhandene • versus durch Metabolisierung neu gebildete*) anzeigt^[10].

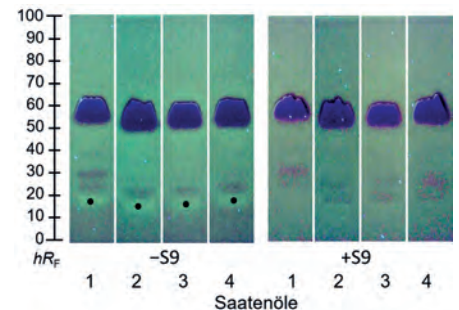


Abbildung 4: Vier Saatenöle untersucht ohne (-S9) und mit (+S9) Metabolisierung durch das S9-Leberenzym-System und zeitgleich detektiert mit dem planaren Genotoxizitäts-Assay, der Genotoxine als grüne Fluoreszenzonen (•) darstellt, die durch eine funktionierende Lebermetabolisierung entgiftet wurden^[11].

Die Überwachung von Lebensmittelkontaminanten und -rückständen hat sich in den letzten Jahren erheblich verbessert^[12]. Fortschritte auf dem Gebiet der Chromatographie-Massenspektrometrie-Kopplungstechniken ermöglichten die Entwicklung quantitativer Multitarget-Ansätze, die mehrere hundert Analyten abdecken. Auch bei den z.B. Hunderten von Pyrrolizidinalkaloiden gibt es sehr unterschiedliche Genotoxizitäten bis gar keine bei den einzelnen Vertretern. Kombiniert man nun aber die Trennung mit der Wirkungsdetektion können die wirklich wichtigen wirkenden Substanzen priorisiert werden und zudem auch weitere Wirkstoffe entdeckt werden. Somit können Proben zielorientiert und proaktiv auf Sicherheit gescreent werden. Die Zielsubstanz-Analytik einer Probe ist wie das Erfassen von Pixeln eines Gemäldes. Eine Erhöhung der Anzahl und Nuancen von braunen Pixeln hilft dabei nicht, das Lächeln der Mona Lisa zu entdecken, wohl aber das Erfassen der wichtigen Pixel. Die Einführung von nicht zielgerichteten Ansätzen wie spektrale Fingerabdrücke eröffnet zwar neue Perspektiven, priorisiert aber nicht die wichtigen wirkenden Verbindungen, denn die Kombination mit der biologischen Detektion fehlt. Das Erfassen vieler Pixel-signale hilft dabei nicht, das subtile Lächeln der Mona Lisa zu erkennen, wohl aber das Erfassen der wichtigen Pixel im Spuren- und Ultraspurenbereich.

Wie kann man also wichtige Pixel schnell finden, besonders auch neue Pixel, die bisher nicht im Fokus standen? Ist womöglich ein Paradigmenwechsel angesagt hin zu planaren Assays in der Routineanalytik, um durch die proaktive Erkennung von Schadstoffen für eine bessere Sicherheit zu sorgen und durch disruptives Denken die Effizienz zu steigern? Die Validität der neuen soliden Screening-Technik wurde vielfach gezeigt^[5-11, 13-19] und ist bereit, breit eingesetzt zu werden (Abb. 5). Planare wirkungsbezogene Screenings dauern durch die parallele Analyse vieler Proben je nach Assay ca. 5–20 min pro Probe bei vergleichsweise geringen Verbrauchskosten (0,5–1,0 Euro pro Probe) und erfordern keine oder nur eine minimale Probenvorbereitung. Die Investitionskosten liegen für kommerzielle Systeme^[13-15] bei ca. 70000 Euro, wohingegen ein open-source 2LabsToGo-System^[16] nur ca. 1700 Euro Materialkosten zur Anschaffung benötigt. Das Selbstzusammenbauen muss nicht nachteilig sein, denn es ermöglicht ein Eindenken in das minia-

turierte System und erleichtert die spätere Selbstreparatur.

Können Schadstoffzonen keinen bekannten Verbindungen in den komplexen Proben zugeordnet werden, ist es möglich, hochaufgelöste Massenspektren direkt vom Bioautogramm durch automatisierte Elution^[17] über eine zusätzliche orthogonale Trennung mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie zu erhalten.^[15, 18, 19] 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 Initiati-

ve zu Vielstoffen (www.vielstoffgemische.de) erhalten sowie Kontakte schließen und Hinweise zu Publikationen^[20] erhalten.

Literatur

- [1] Sevanian, A., Mead, J.F., Stein, R.A. (1979). Epoxides as products of lipid autoxidation in rat lungs. *Lipids* 14, 634–643.
- [2] Harder, A., Escher, B.I., Landini, P., Tobler, N.B., Schwarzenbach, R.P. (2003). Evaluation of bioanalytical assays for toxicity assessment and mode of toxic action classification of reactive chemicals. *Environmental science & technology* 37, 4962–4970.
- [3] Morlock, G.E. (2021). High-performance thin-layer chromatography combined with effect-directed assays and high-resolution mass spectrometry as an emerging hyphenated technology: A tutorial review. *Anal. Chim. Acta* 1180, 338644.
- [4] AG Fragen der Ernährung in der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (2022). Grundlagenpapier Pflanzenextrakte in Lebensmitteln. *Lebensmittelchemie* 1, S1-27 (Supplementband).
- [5] Ronzheimer, A., Schreiner, T., Morlock, G.E. (2022). Multiplex planar bioassay detecting estrogens, antiestrogens, false-positives and synergists as sharp zones on normal phase. *Phytomedicine* 250, 154230.
- [6] Schreiner, T., Ronzheimer, A., Friz, M., Morlock, G.E. (2022). Multiplex planar bioassay with reduced diffusion on normal phase, identifying androgens, verified antiandrogens and synergists in botanicals via 12D hyphenation. *Food Chem.* 395, 133610.
- [7] Meyer, D., Marin-Kuan, M., Debon, E., Serrant, P., Cottet-Fontannaz, C., Schilter, B., Morlock, G.E. (2021). Detection of low levels of genotoxic compounds in food contact materials using an alternative HPTLC-SOS-Umu-C assay. *ALTEX* 38, 387–397.
- [8] Schreiner, T., Eggerstorfer, N.M., Morlock, G.E. (2022). Effects of gastrointestinal digestion on the bioactivity of meal replacement products examined by ten dimensional hyphenation, in submission.
- [9] Morlock, G.E., Drotleff, L., Brinkmann, S. (2021). Miniaturized all-in-one nanoGIT+active system for on-surface metabolization, separation and effect imaging. *Anal. Chim. Acta* 1154, 338307.



Abbildung 5: Arbeitsablauf des planaren Assay-Screenings und optionale Charakterisierung von Schadstoffzonen mit hochauflösender Massenspektrometrie

- [10] Azadniya, E., Mollergues, J., Stroheker, T., Billerbeck, K., Morlock, G.E. (2020). New incorporation of the S9 metabolizing system into methods for detecting acetylcholinesterase inhibition. *Anal. Chim. Acta* 1129, 76–84.
- [11] Meyer, D., Morlock, G.E. (2022). Healthy oils are not necessarily healthy, in submission.
- [12] Steiner, D., Malachová, A., Sulyok, M., Krska, R. (2021). Challenges and future directions in LC-MS-based multiclass method development for the quantification of food contaminants. *Anal. Bioanal. Chem.* 413, 25–34.
- [13] Morlock, G.E., Heil, J., Bardot, V., Lenoir, L., Cotte, C., Dubourdeaux, M. (2021). Effect-Directed Profiling of 17 Different Fortified Plant Extracts by High-Performance Thin-Layer Chromatography Combined with Six Planar Assays and High-Resolution Mass Spectrometry. *Molecules* (Basel, Switzerland) 26.
- [14] Morlock, G.E., Heil, J., Inarejos-Garcia, A.M., Maeder, J. (2021). Effect-Directed Profiling of Powdered Tea Extracts for Catechins, Theaflavins, Flavonols and Caffeine. *Antioxidants* (Basel, Switzerland) 10.
- [15] Schreiner, T., Sauter, D., Friz, M., Heil, J., Morlock, G.E. (2021). Is Our Natural Food Our Homeostasis? Array of a Thousand Effect-Directed Profiles of 68 Herbs and Spices. *Frontiers in Pharmacology* 12, 755941.
- [16] Sing, L., Schwack, W., Göttsche, R., Morlock, G.E. (2022). 2LabsToGo – Recipe for building your own chromatography equipment including biological effect-detection.
- [17] Mehl, A., Schwack, W., Morlock, G.E. (2021). On-surface autosampling for liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1651, 462334.
- [18] Schreiner, T., Morlock, G.E. (2021). Non-target bioanalytical eight-dimensional hyphenation including bioassay, heart-cut trapping, online desalting, orthogonal separations and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1647, 462154.
- [19] Mehl, A., Schmidt, L.J., Schmidt, L., Morlock, G.E. (2021). High-throughput planar solid-phase extraction coupled to orbitrap high-resolution mass spectrometry via the autoTLC-MS interface for screening of 66 multi-class antibiotic residues in food of animal origin. *Food Chem.* 351, 129211.
- [20] Bunse, M., et al. (2022) Essential oils as multicomponent mixtures and their potential for human health and well-being, *Front. Pharmacol.*, doi: 10.3389/fphar.2022.956541.