

# CBS

CAMAG BIBLIOGRAPHY SERVICE

# 115

SEPTEMBER 2015

# 50 JAHRE CBS

Den CAMAG Bibliography Service gibt es seit 1965.

Die Literaturreferate – bisher mehr als 11 000 – werden seit 1982 elektronisch zusammengetragen und können benutzerfreundlich mit dem CBS Online-Suchsystem über die CAMAG Webseite abgerufen werden.

## CAMAG®

WELTWEIT FÜHREND IN DER PLANAR-CHROMATOGRAPHIE

Nr. 115, September 2015

CAMAG Literaturdienst  
Planar-Chromatographie  
Herausgegeben von Gertrud Morlock  
cbs@camag.com  
Eigenverlag CAMAG Schweiz

## IN DIESER AUSGABE

### Verfahren, Anwendungen

Moderne direkte Bioautographie  
von endokrin aktiven Substanzen ... 2–4

Quantifizierung von Xanthonen  
in Schalenextrakten  
von Mangostan-Früchten..... 5–7

Die HPTLC-Bildauswertung bietet  
einzigartige Möglichkeiten für  
die Qualitätskontrolle  
pflanzlicher Arzneimittel ..... 9–10

In-Prozess-Kontrolle bei der  
Herstellung neuartiger  
Ergolin-Psychedelika mittels  
HPTLC-MS..... 11–12

Charakterisierung von  
Leitsubstanzen in Java-Tee  
mittels HPTLC..... 13–15

### In dieser Ausgabe hervorgehobene Produkte

visionCATS..... 10

TLC-MS Interface 2..... 16

### Rubrik: Kennen Sie CAMAG?

Dr. Markus Wyss jetzt Vorsitzender  
der Geschäftsleitung (CEO)..... 8

CAMAG Entwicklung  
unter neuer Leitung..... 8



CAMAG (Schweiz)  
Sonnenmattstrasse 11 • 4132 Muttenz  
Tel. +41 61 467 34 34 • Fax +41 61 461 07 02  
info@camag.com

CAMAG (Deutschland)  
Bismarckstrasse 27–29 • 12169 Berlin  
Tel. +49 30 516 55 50 • Fax +49 30 795 70 73  
infoberlin@camag.com  
www.camag.com

# Planar-Chromatographie in der Praxis

## Moderne direkte Bioautographie von endokrin aktiven Substanzen



Ines Klingelhöfer, M. Sc. und Prof. Dr. Gertrud Morlock, Institut für Ernährungswissenschaften (IfE) und Interdisziplinäres Forschungszentrum (IFZ) der Justus-Liebig-Universität Gießen, sind aktive Mitglieder der Expertengruppe zur Entwicklung des Yeast Estrogen Screen in Kombination mit der Planar-Chromatographie (HPTLC-pYES). Im Juli 2013 wurde von ihnen eine direkte Bioautographie-Methode (DB) gezeigt, die erstmalig zu scharfen Substanzonen führte. Durch solch ein aussagekräftiges, wirkungsbezogenes Screening von komplexen Proben und die anschließende Identifizierung dieser bioaktiven Substanzen ist nunmehr ein breites Nahrungsmittel- und Naturstoffscreening durchführbar.

### Einleitung

Endokrin aktive Substanzen sind allgegenwärtig in unserer Nahrung, in Nahrungsergänzungsmitteln und Kosmetika. Sie beeinflussen die Gesundheit von Menschen und Tieren, indem sie wesentliche Funktionen des Stoffwechsels, Wachstums und der Entwicklung steuern und regulieren. Diese Substanzen umfassen sowohl natürliche Estrogene, wie  $\beta$ -Estradiol und Estron, die über Ausscheidungen von Mensch und Tier in die Umwelt und somit in den Lebensmittelkreislauf gelangen, als auch Weichmacher, Pestizide und Biozide, die über die industrielle Produktion Nahrungsmittel kontaminieren. Eine weitere Substanzgruppe sind Phytoestrogene – sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe in der Natur. Ein spezifisches Nachweisverfahren für solche estrogenähnlich wirkende Substanzen ist HPTLC-pYES.

Die Bioautographie wird seit fast 70 Jahren eingesetzt [1], jedoch war die starke Diffusion der Substanzonen (während der mehrstündigen Inkubation mit dem wässrigen Kulturmedium) ein wesentlicher Nachteil. Jegliche Versuche zur Verbesserung der DB blieben erfolglos, und stark diffuse Zonen konnten Analytiker nur wenig überzeugen.

**Die nachfolgend gezeigte DB am Beispiel von HPTLC-pYES wurde substanzial verbessert und erstmalig auf RP-18 W-Platten gezeigt [2, 3], die als nicht anwendbar für die DB galten (da das Bioassaysignal auf diesen Phasen ausblieb). Wasser weist aber auf Umkehrphasen keine Elutionskraft auf, und lange Inkubationszeiten im wässrigen Medium führen somit zu geringer Diffusion der Zonen. Die wasserbenetzbare Umkehrphase, sowie auch mittelpolare Schichten, sind somit per se deutlich besser zur DB geeignet als die bisher eingesetzte Kieselgelphase. Die verbesserte HPTLC-pYES-Methode**

weist estrogenähnlich wirkende Substanzen als scharf abgegrenzte Zonen in komplexen Probenmatrices nach. Die Güte dieser neuartigen DB zeigt sich daran, dass die biologische Detektion auch zur Quantifizierung eingesetzt werden kann.

## Probenvorbereitung

Propolis-Tinkturen wurden direkt oder 1:10 mit Ethanol verdünnt eingesetzt. Der Inhalt von Propolis-Kapseln wurde mit 1 mL Ethanol versetzt, 3 min durchmischt (Vortex), bei 15000 x g 5 min zentrifugiert und der Überstand analysiert. Propolis-Lutschtabletten wurden gemörsert und 100 mg davon analog den Propolis-Kapseln extrahiert.

## Standardlösungen

Estron (E1), 17 $\beta$ -Estradiol (E2), 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol (EE2), Estriol (E3), Bisphenol A (BPA), 4-*n*-Nonylphenol (NP) und Kaffeesäure-Phenethylester (CAPE) wurden je in Ethanol bzw. Methanol gelöst (0,1, 1 und 50 pg/ $\mu$ L sowie 2,5 und 50 ng/ $\mu$ L).

## Schicht

HPTLC-Platten Kieselgel 60 RP-18 W (Merck), 20 x 10 cm, bei Bedarf zugeschnitten mit dem Plattenschneider smartCut

## Probenauftragen

Bandförmig mit DC-Probenautomat (ATS 4), Bandlänge 6,5 mm, Bahnabstand 7,5 mm, Abstand vom unteren Rand 8 mm und vom seitlichen Rand 12 mm, Auftragevolumina 0,1–25  $\mu$ L/Band (Standards) und 0,1–5  $\mu$ L/Band (Proben)

## Chromatographie

In der Doppeltrogkammer 10 x 10 cm bzw. 20 x 10 cm mit 5 bzw. 10 mL *n*-Hexan – Toluol – Ethylacetat 8:3:2, Laufstrecke 7 cm

## Bioassay

Das Chromatogramm wurde in die Hefezellsuspension (rekombinante *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505-Zellen, die den humanen Estrogenrezeptor (hER $\alpha$ ) und das Reporter-gen lacZ tragen) getaucht und 3 h inkubiert [2]. Estrogenartig wirkende Substanzen führen zur Freisetzung der  $\beta$ -Galaktosidase, die das im zweiten Tauchschrift aufgebrauchte Substrat 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid zum blau fluoreszierenden 4-Methylumbelliferon (MU) spaltet.

## Densitometrie

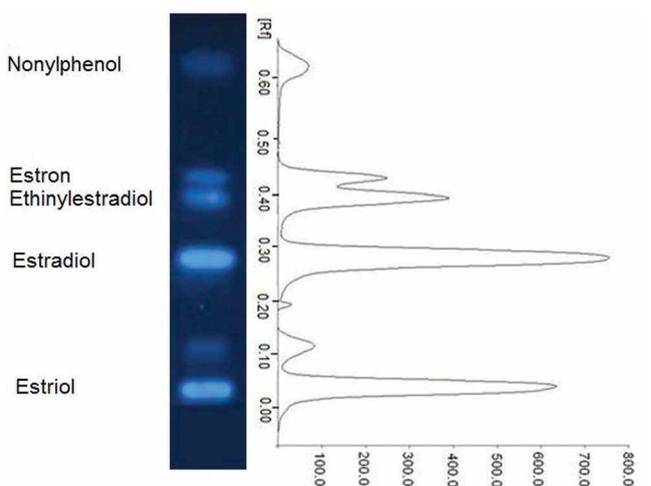
TLC Scanner 3 mit winCATS, Fluoreszenzmessung bei 365/>400 nm, Quecksilberlampe, Spaltgröße 5,0 x 0,2 mm, Messgeschwindigkeit 20 mm/s, Auswertung über polynome Regression

## Massenspektrometrie

Elution der bioaktiven Zonen mit Methanol-Ammoniumformatpuffer (10 mM, pH 4, 49:1, 0,2 mL/min) mittels TLC-MS Interface (Elutionskopf 4 x 2 mm) ins ESI-MS (CMS, Advion).

## Ergebnisse und Diskussion

Zum Nachweis von estrogenartig wirkenden Substanzen in matrixreichen Proben wurden bis zu 24 Proben parallel auf der HPTLC-Platte getrennt. Die Optimierung des HPTLC-pYES-Arbeitsablaufes und die Anpassung der Hefezellkultivierung an die RP-18 W HPTLC-Platte erfolgte mit den Standardsubstanzen E1, E2, EE2, E3 und NP. Es resultierten scharf umrandete, blau fluoreszierende MU-Zonen.



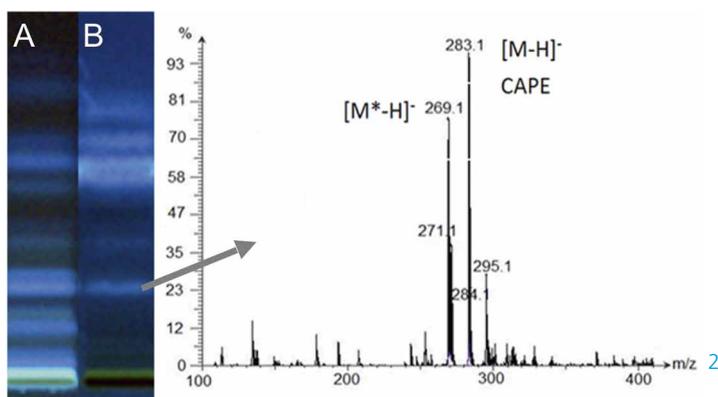
Scharf begrenzte, blau fluoreszierende MU-Zonen nach 4 h Inkubation in wässrigem Medium; Fluoreszenzmessung bei UV 365/>400 nm

Die blaue Fluoreszenz wurde durch die Hefezellenaktivität generiert und anschließend konventionell gemessen. Zur Methodvalidierung wurden LOD, LOQ und der maximale Arbeitsbereich für die biologische Detektion der Standardsubstanzen bestimmt (n = 3, jeweils neu angesetzte Hefekulturen) [2]. Die Detektion von E2 war am empfindlichsten: Je nach Berechnungsmethode lag die mittlere LOD bei 0,2 pg/Band und die mittlere LOQ bei 0,5 pg/Band (Kalibrierkurvenmethode nach

DIN 32645) bzw. bei 0.5 und 1 pg/Band, wenn über das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) gerechnet wurde.

	Substanz (pg/Band)					
Mean (n=3)	E1	E2	EE2	E3	BPA	NP
LOD (S/N 3)	25	0,5	2	n.d.	$62,5 \times 10^2$	$25 \times 10^3$
LOQ (S/N 10)	50	1	5	500	$12,5 \times 10^3$	$50 \times 10^3$
Arbeitsbereich	$25 - 25 \times 10^3$	0,5–50	$2 - 1 \times 10^3$	$5 \times 10^2 - 50 \times 10^3$	$62,5 \times 10^2 - 1 \times 10^6$	$25 \times 10^3 - 1 \times 10^6$

Am Beispiel von sieben kommerziell erhältlichen Propolisproben wurde gezeigt, dass mit keiner oder nur minimaler Probenvorbereitung estrogenartig wirkende Substanzen sehr empfindlich detektiert, identifiziert und quantifiziert werden können [3]. Viele Lebensmittel-extrakte, wie auch die hier gezeigte Propolisprobe, wiesen nativ blau fluoreszierende Zonen auf [2, 3]. Zum Ausschluss falsch positiver MU-Zonen wurde der gesamte Bioassay-Ablauf ohne Hefezellen durchgeführt. Die entsprechenden Negativkontrollen wiesen keine nativ fluoreszierenden Zonen auf. Die Durchführung einer Negativkontrolle wurde als wesentlich erachtet, um sich vor falsch positiven Funden abzusichern.



Chromatogramme einer Propolisprobe: (A) nativ fluoreszierende Zonen, (B) blau fluoreszierende MU-Zonen nach pYES; exemplarische Identifizierung einer Zone (CAPE) mittels ESI-MS (TLC-MS Interface)

CAPE wurde in allen Propolisproben gefunden. Zu dessen Quantifizierung wurde die Wiederfindung im Bereich von 10 bis 150 ng/Band bestimmt. Die mittlere Wiederfindung über alle Konzentrationsniveaus lag bei 95 % (%RSD 15 %; n=7). Die über die mittlere Wiederfindungsrate korrigierten CAPE-Gehalte der Propolisproben wurden zwischen 710 und 2387 µg/g über die biologische Detektion bestimmt (5-Punkt-Kalibration) und stimmten mit Literaturwerten (mittels SPE und HPLC-MS/MS) gut überein [3].

Mit dieser optimierten DB-Methode war es erstmalig möglich – aufgrund der scharf begrenzten Zonen – einzelne bioaktive Inhaltsstoffe in komplexen Proben empfindlich zu detektieren, eindeutig zuzuordnen und zu identifizieren sowie über die durch die Hefezellen generierten Respons zu quantifizieren. Entdeckte Wirkstoffe sind über konventionelle Detektionsarten (physikalisch/chemisch) einfacher zu quantifizieren als über die gezeigte biologische Detektion. Letztere diente hier als Beleg für die erreichte Leistungsgüte, Richtigkeit und Zuverlässigkeit dieser wirkungsbezogenen Analytik.

Es ist gute wissenschaftliche Praxis, bei LOD- und Gehaltsangaben mittels biologischer Detektion über Mehrfachanalysen zu gehen, die Werte von jeweils neu angesetzten Hefekulturen vergleichen. LODs bei sehr gut arbeitenden Hefen lagen zum Beispiel reproduzierbar bei 250 fg/Band E2 (S/N 3), waren aber nicht immer wieder mit neu angesetzten Hefekulturen erreichbar.

Die LODs liegen für wichtige estrogenartig wirkende Substanzen im fg- und pg-Bereich und erlauben den direkten Nachweis im Spurenbereich ohne Anreicherung.

Weitere Informationen sind von den Autoren erhältlich.

- [1] R.R. Goodall, A.A. Levi, Nature 158 (1946) 675
- [2] I. Klingelhöfer, G.E. Morlock, J Chromatogr A 1360 (2014) 288
- [3] G.E. Morlock, I. Klingelhöfer, Anal Chem 86 (2014) 8289

Kontakt: Prof. Dr. Gertrud Morlock und Ines Klingelhöfer, Justus-Liebig-Universität Giessen, Institut für Ernährungswissenschaften, IFZ, Heinrich-Buff-Ring 26–32, 35392 Giessen, Gertrud.Morlock@ernaehrung.uni-giessen.de