

Flüssigkeitschromatographie mit biochemischer Detektion

Nils Helge Schebb (Davis/USA), Hubertus Irth (Amsterdam/NL)
und Uwe Karst (Münster/D)

University of California, Department of Entomology, One Shields Avenue, Davis, CA

Die Untersuchung der biologischen Wirkung von Substanzen steht im Fokus lebensmittelchemischer Fragestellungen. Die Wirkung resultiert in vielen Fällen aus der Inhibition regulatorischer Enzyme. Flüssigchromatographie (LC) mit biochemischer Detektion (BCD) ist die Methode der Wahl zur Identifizierung von Inhibitoren in komplexen Substanzgemischen. Im Gegensatz zu klassischen Platerreader Verfahren, ermöglicht die LC-BCD Kopplung die Bestimmung der Aktivität der enthaltenen Einzelkomponenten direkt in einem Experiment.

Die Funktion und Anwendung der LC-BCD Technik wird anhand einer von uns neu entwickelten Methode zum Screening nach Serin-Proteaseinhibitoren vorgestellt¹. Ebenso werden die Ergebnisse zur Hemmung des Enzyms Gluthation-S-Transferase (GST)^{2,3} präsentiert. Die BCD beider Methoden basiert auf der Nachsäulenumsetzung eines fluoreszenzmarkierten Substrates (4-Nitroannilin-peptide, bzw. Monochlorobiman) in einem Fließreaktor (Abb. 1). Das Fluoreszenzsignal des „steady-state“ der enzymatischen Reaktion bildet hierbei die Basislinie des Detektors. Eluiert ein Inhibitor, wird das Enzym (Thrombin, Trypsin bzw. GST) gehemmt. Folglich wird weniger fluoreszierendes Produkt gebildet, was zu einer temporären Verringerung der Fluoreszenzintensität führt. Durch Korrelation der resultierenden negativen Peaks im Chromatogramm des BCD mit dem parallel aufgenommenen Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS) Signal (Abb. 1), werden die inhibitorisch aktiven Substanzen direkt charakterisiert. Durch Anwendung der Methode konnten zwei Glutathion-Addukte des Mykotoxins Patulin als GST Inhibitoren identifiziert werden³. Insgesamt eröffnet die HPLC-BCD neue Perspektiven zum Screening von Lebensmitteln auf biologisch aktive Bestandteile.

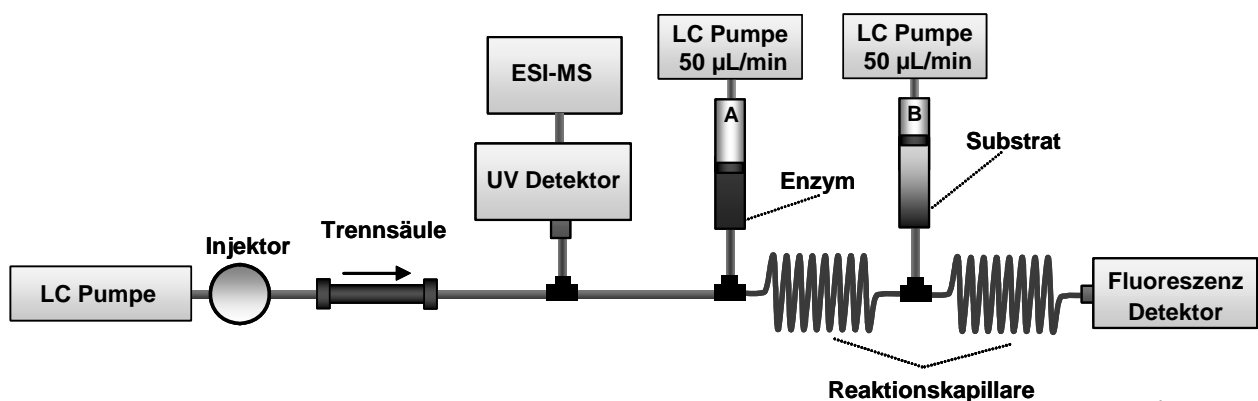


Abb. 1: Schematischer Aufbau des LC-BCD Systems zum Screening nach Enzyminhibitoren¹

¹ Schebb, N. H.; Heus, F.; Saenger, T.; Karst, U.; Irth, H.; Kool, J., *Anal Chem* **2008**, 80, (17), 6764-72.

² Kool, J.; Eggink, M.; van Rossum, H.; van Liempd, S. M.; van Elswijk, D. A.; Irth, H.; Commandeur, J. N.; Meerman, J. H.; Vermeulen, N. P. *J Biomol Screen* **2007**, 12, 396-405.

³ Schebb, N. H.; Faber, H.; Heus, F.; Kool, J.; Irth, H.; Karst, U. **2009** submitted.