Gastbeitrag zum 50-jährigen Jubiläum von Toxichem-Krimtech

In der ersten Ausgabe von damals noch „Toxichem“ im Januar 1976 erschien der Beitrag „Zur Standardisierung der Dünnschichtchromatographie“ von Dr. James Bäumler, Leiter des Arbeitskreises „Analytik der Suchtstoffe“, Schriftleiter von „Toxichem“ und Gründungspräsident der GTFCh. Damals ging es um die Harmonisierung von Fließmitteln in der Dünnschichtchromatographie (siehe die Reproduktion des Beitrages in diesem Heft), in Heft 2-1976 wurden dann die Anfärbemittel behandelt.

Seitdem sind 50 Jahre vergangen und in der Dünnschichtchromatographie (DC) hat es vielfältige Entwicklungen gegeben, hin zu besseren Trennungen und höherer Sensitivität bei reduziertem Reagenzeinsatz und Probenvolumen und schließlich zu Kopplungen über automatisierte Interface mit Massenspektrometern und mit planaren Bioassays zur Detektion von Schadstoffen in komplexen Proben wie auch biologischen Proben vom Menschen.

Der 50. Jahrestag der Erstpublikation von „Toxichem“ und des o. g. Beitrages ist sicher ein guter Anlass, den Weg der DC von damals zu heutigen hochauflösenden Verfahren zu reflektieren - nach dem Motto „Was ist eigentlich aus der DC von vor 50 Jahren geworden?“

Mit Frau Professor Gertrud Morlock (JLU Gießen) hat sich eine international renommierte Expertin, die die jüngsten Entwicklungen mit ihrer Arbeitsgruppe ganz wesentlich geprägt und voran getrieben hat, auf meine Anfrage hin, spontan bereit erklärt, eine Übersicht im o. g. Sinne für unser Jubiläumsheft von Toxichem Krimtech zu schreiben. (TA)

Schnelle Enttarnung von unbekannten Schadstoffen in der Toxikologie mit wirkungsbezogener non-target Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie

Gertrud Morlock

Professur für Lebensmittelwissenschaften, Institut für Ernährungswissenschaft, Justus-Liebig-Universität Gießen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen, gertrud.morlock@uni-giessen.de

Abstract. Modern hyphenated high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) can contribute to forensic toxicology with a unique prioritization strategy. Samples are analyzed in parallel with no or minimal sample preparation and compared in an ideal manner. The prioritization strategy via effect-directed detection reduces the complexity of a sample to the detected hazardous compounds. Many different (bio)assays have been reported for hazard analysis. The meaningful hazard profiles of complex samples, including effect differentiation, are important for sound decisions. Nothing is overlooked. Every compound that has an effect is detected. Hazardous compound zones of interest are eluted online and automatically into high-resolution mass spectrometry, including fragmentation, optionally via a second orthogonal separation with diode array detection. A selective derivatization reagent sequence can be applied on top of the stamped bioautogram for structural group assignments. Thus, hazardous compound zones are straightforwardly characterized, or even identified.

Entwicklung der HPTLC mit Multidetektion

Bis Ende der 1990er Jahre entwickelte sich vor allem die Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (High-Performance Thin-Layer Chromatography, HPTLC) als leistungsstarke Technik der Planar-Chromatographie [1]. Sie setzt gegenüber der Dünnschichtchromatographie (DC) vergleichsweise homogenere Plattenschichten mit kleineren Adsorbens-Partikeln sowie Geräte ein und wurde schrittautomatisiert; nur durch beide Aspekte (bessere Trennschicht und Automatisierung) wird das bestmögliche Ergebnis erreicht. Die DC und HPTLC gehören gemäß Definition zur Planar-Chromatographie (Einteilung nach Geometrie der stationären Phase) und zur Flüssigkeits-Chromatographie (Einteilung nach Zustand der mobilen Phase) [2].

Zwar ist die DC aufgrund ihrer einfachen Ausführungsform die weltweit am weitesten verbreitete Variante, sie erreicht jedoch bei weitem nicht das Potential, die Flexibilität und die Aussagekraft der HPTLC. Dies erklärt das kontroverse, mit Unwissen vermischte und widersprüchliche Meinungsbild zur planaren Methodik. Angehende Analytiker erfahren in der Ausbildung bzw. im Studium nur die einfache DC. Sie wird automatisierten säulenchromatographischen Systemen gegenübergestellt. Die weitaus leistungsstärkere, flexiblere und effektivere HPTLC wird nicht gelehrt. Das große Potential der HPTLC wird in der Entscheidungsfindung der Analytiker nicht berücksichtigt, da nicht erfahren. Dies erklärt hohe finanzielle Verluste und komplizierte analytische Lösungen, die auf einfache Weise mit HPTLC gelungen wären.

Die am meisten eingesetzte HPTLC-Schicht ist Kieselgel 60 (mit mittlerem Korndurchmesser von überwiegend 5–7 µm, mittlerem Porendurchmesser von 6 nm und einer spezifischen Oberfläche von ca. 500 m^2/g). Solch Kieselgel bietet in Kombination mit einer großen Vielfalt an Fließmitteln ein hohes Maß an Selektivität bei den meisten Trennaufgaben. Neben der polaren Kieselgelschicht, die 1975 eingeführt wurde, wurden um 1978 unpolare (reversed-phase, RP) RP2-, RP8- und RP18-Phasen (mit C2-, C8- und C18-Kettenlängen) und zwischen 1982 und 1987 mittelpolare Amino-, Cyano- und Diol-Phasen kommerzialisiert [1].

Organische polymere Bindermaterialien (Polyvinylalkohole oder Polymethacrylate) werden für die Abriebfestigkeit der Schicht auf dem Träger (Glas, Aluminium oder Polyester) zugesetzt. Anorganische Fluoreszenzindikatoren F_{254} (im UV 254 nm grünlich fluoreszierende, mit Mangan aktivierte Zinksilikate oder blau fluoreszierende, säurestabile Erdalkaliwolframate) werden zur Detektion UV-aktiver Substanzen beigemischt. UV-absorbierende Substanzen absorbieren die Lichtenergie und werden als dunkle Zonen detektiert, da an dieser Stelle der Fluoreszenzindikator nicht zur Fluoreszenz (richtiger Phosphoreszenz) angeregt werden kann. [3]

An der polaren Kieselgelschicht erfolgt die Trennung mit einem vergleichsweise unpolareren Fließmittel nach überwiegend adsorptions-chromatographischen Trennprozessen gemäß der Polarität der einzelnen Verbindungen (Abb. 1, Normalphasensystem [3]).

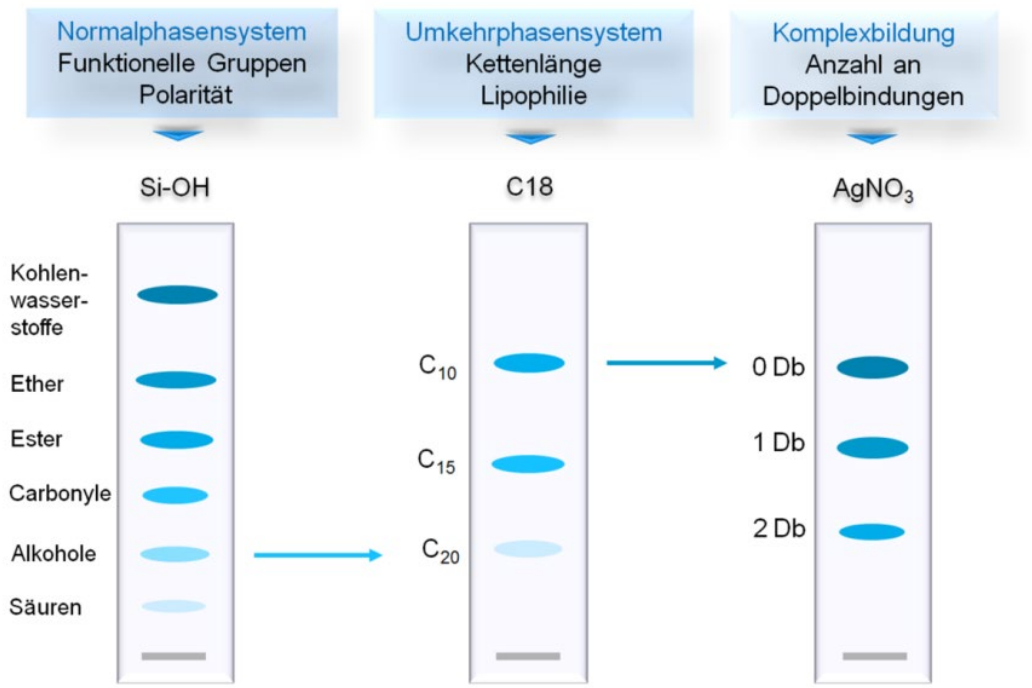

Abb. 1. Nutzung unterschiedlicher Trennprinzipien für verschiedene Fragestellungen [3].

Verbindungen mit gleicher funktioneller Gruppe (z. B. einwertige Alkohole mit verschieden langen Alkylketten) kann man in einem Normalphasensystem kaum trennen. Diese sind aber sehr leicht in einem Umkehrphasensystem (RP) trennbar, das vorrangig nach der Lipophilie bzw. der Kettenlänge trennt. Verbindungen, die die gleiche funktionelle Gruppe sowie den gleichen Alkylkettenrest tragen und sich z. B. nur in der Anzahl der Doppelbindungen unterscheiden, würden im Normalphasen- wie Umkehrphasensystem kaum getrennt werden. Eine solche Fragestellung kann die Komplexierungschromatographie jedoch sehr einfach lösen. Hierzu kann die Kieselgelschicht mit einem Reagenz modifiziert werden (z. B. Platte in eine Silbernitrat- oder Coffein-Lösung eintauchen und trocknen [4,5]).

Das vollautomatisierte Probenauftragen ist im Hinblick auf die Zonenschärfe und chromatographische Auflösung der wichtigste Schritt der HPTLC-Methode. Zur Fließmitteloptimierung sind verschiedene Strategien entwickelt worden unter Nutzung von Selektivitätsgruppen und Lösungsmittelstärken [6,7]. Häufig wird noch mit Fließmitteln gearbeitet, die keine optimale Trennung gewährleisten oder aus zu vielen Komponenten bestehen. Auch können weniger viskose Lösungsmittel für eine schnelle Entwicklung sorgen (z. B. aus der gleichen Selektivitätsgruppe vorzugsweise Methanol statt Butanol).

Das HPTLC-Chromatogramm gleicht einer Computerfestplatte, auf der die Informationen gespeichert und nach verschiedenen Detektionsverfahren bis zur Zerstörung auswertbar sind. Ein Hintereinanderschalten von verschiedenen Detektionsmöglichkeiten (Multi-Detektion) erfolgt innerhalb weniger Minuten nacheinander auf demselben Chromatogramm. Ein Teil der Substanzen ist direkt im Chromatogramm durch UV/Vis/FLD-Detektion oder densitometrisch durch Absorptions- oder Fluoreszenzmessung erfassbar. Ein weiterer Teil der Substanzen kann durch automatisierte postchromatographische Derivatisierung detektiert werden, die einfach, kostengünstig und simultan für alle parallel getrennten Proben erfolgt. Dabei können unterschiedliche Derivatisierungsreagenzien nacheinander auf demselben Chromatogramm eingesetzt werden (Derivatisierungsreagenz-Sequenz; nach dem pH-Wert geordnet) [8]. Die Detektierbarkeit von Analyten erfolgt unter Berücksichtigung verschiedener Aspekte [3] bis in den Spurenbereich (µg/kg oder µg/L).

Die Bildauswertung mit Videodensitometrie erfolgt elektronisch direkt über das aufgenommene Chromatogramm. Eine wellenlängenselektive Detektion im Wellenlängenbereich von 190 bis 900 nm erfolgt über optomechanische Densitometer zur Absorptions- oder Fluoreszenzmessung (Abb. 2 [9]). Die letztere ist in der Regel selektiver im Nachweis, empfindlicher in der Detektion und über einen größeren Bereich linearer im Response. Die HPTLC-Methodik ist schrittbasiert und eine gemeinsame Software unterstützt die Geräteansteuerung, Aufnahme der Daten und deren Auswertung.

Wirkungsbezogene non-target HPTLC-Analytik

Die Wirkung von Substanzen kann durch die wirkungsbezogene non-target Analytik mittels planarer Bioassays (direkte Bioautographie) detektiert werden. Diese einzigartige, andersartige Detektion erfolgt gemäß der Effektstärke und somit können Spuren (mit herkömmlicher Detektion leicht zu übersehen) hoch toxischer Substanzen ein intensives Signal ergeben. Es wird dadurch nichts übersehen, was wichtig ist. Um scharf begrenzte Zonen zu erreichen, wurde die direkte Bioautographie grundlegend überarbeitet und der Arbeitsablauf angepasst [10–12]. Erstmals in 2014 [10] wurden leistungsstarke Bioassay-Methoden mit scharfen Substanzzonen im Bioautogramm beschrieben, die stark wirkende Femtogramm-Substanzmengen bis in den Ultraspurenbereich (ng/L oder ng/kg) detektierten [10,13]. Diese wurden anfangs auf Umkehrphasen und danach auch auf Normalphasen gezeigt [9,14–16]. Eine weitere Effizienzsteigerung gelang durch entwickelte Multiplex-Bioassays [11,12,17], die mehrere biologische Endpunkte

in derselben Analyse abdeckten. Die Durchführung der Bioassays wurde verschlankt [18] hin zu ready-to-spray cryostocks [19], was die Handhabung der Bioassay-Anwendung nun so einfach macht wie eine Derivatisierung mit Reagenzien.

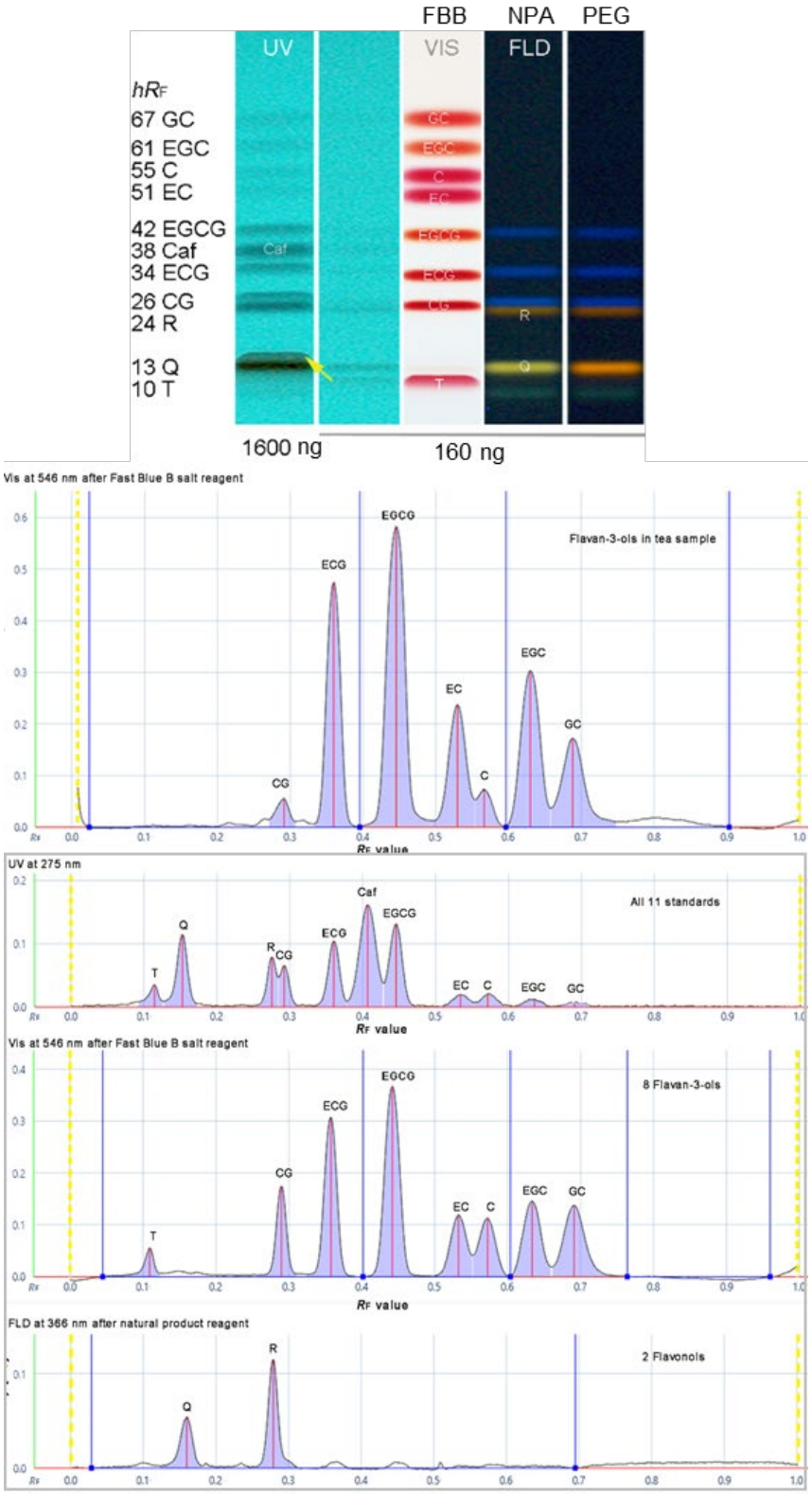

Abb. 2. Wellenlängenselektive Absorptions- oder Fluoreszenzmessung mittels Densitometrie am Beispiel von bekannten Wirkstoffen in Teedrogen nach Derivatisierungs-Sequenz mit Echtblau B Salz-Reagenz (FBB), Naturstoffreagenz A (NPA) und PEG 400 (PEG) [9].

Im Vergleich zu säulenchromatographischen Techniken kam erst recht spät um 2010 die Anbindung an die Massenspektrometrie (MS) [2,20–22] in die Routineanwendung [23–25]. Zur Charakterisierung und bestenfalls Identifizierung mittels Hochauflösungs-Massenspektrometrie und Fraktionierung (HRMS/MS) werden elutionsbasierte und desorptionsbasierte Interface-Kopplungen genutzt [21,26]. Der grundsätzliche Vorteil der Kopplung mit der Planar-Chromatographie liegt darin, dass die Aufnahme der Massenspektren aufgrund der stationären Speicherung der getrennten Substanzen auf der HPTLC-Platte gezielt erfolgt. Nach der wirkungsbezogenen Detektion und (video)densitometrischen Auswertung kann von interessierenden Substanzzonen ein Massenspektrum in Minutenschnelle vollständig automatisiert mit dem autoTLC-MS-Interface [23] aufgenommen werden (Abb. 3 [27]). Durch die erfolgte Priorisierung wichtiger Substanzzonen wird die Hintergrundbelastung des HRMS-Systems gering gehalten, da Matrix- und Hintergrundsignale nicht gemessen werden.

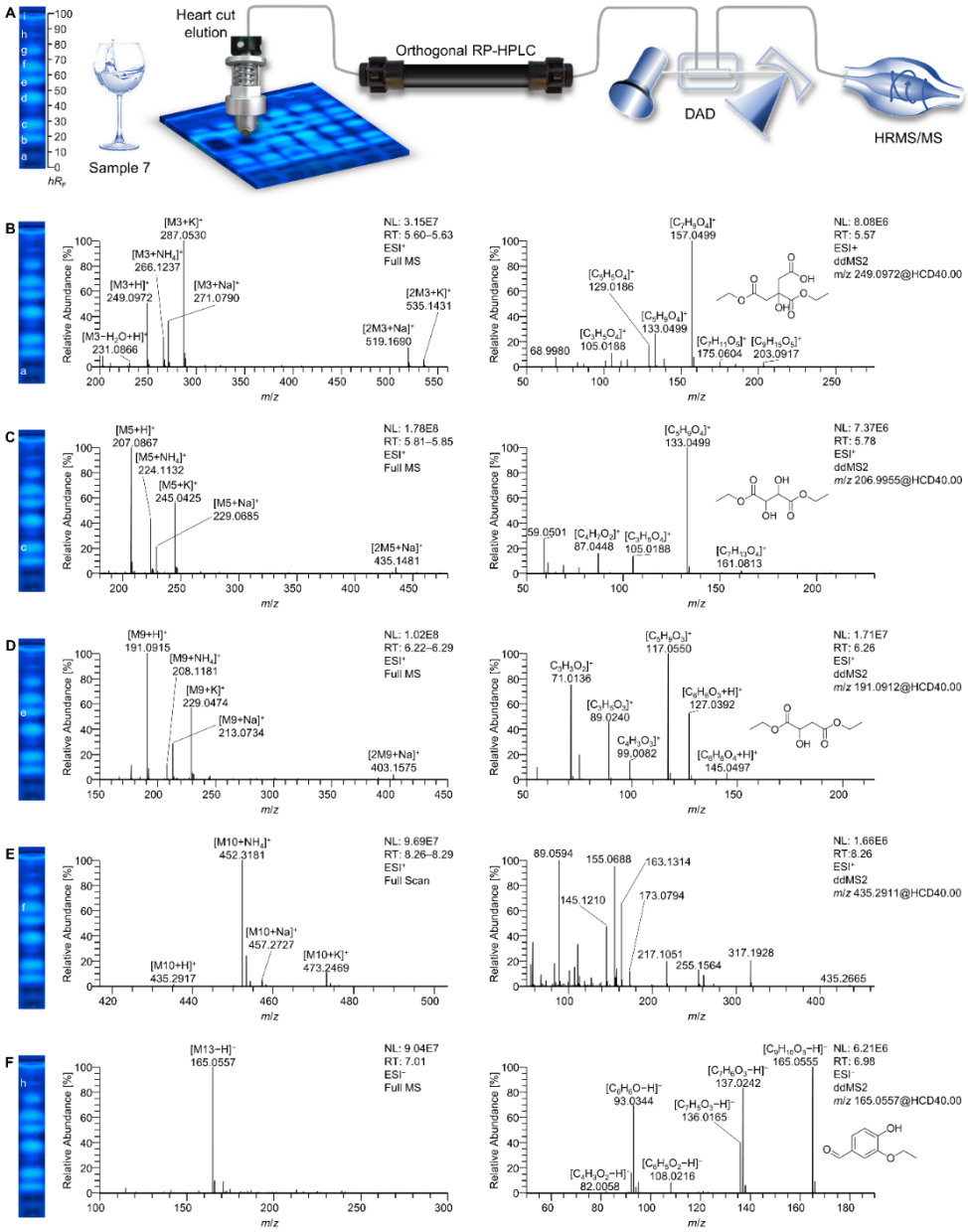

Abb. 3. Interessierende Substanzzonen werden über das Elutionskopf-basierte autoTLC-MS-Interface automatisiert nacheinander in die HRMS eluiert; hier nach dem planaren Bioassay zur Detektion von estrogenartigen Verbindungen in Wein über eine orthogonale Säulenchromatographie und Diodenarraydetektion [27].

Das Bioautogramm wird in das autoTLC-MS-Interface (Abb. 4A) hochgeladen, interessierende Schadstoffzonen werden angeklickt und die Methode wird gestartet. Die Elutionskopf-basierte Kopplung mittels autoTLC-MS-Interface [23] eluiert vollständig automatisiert eine nach der anderen Substanzzone in das HRMS-System (heart cut-HRMS/MS). Dies kann optional über eine orthogonale Säulenchromatographie und Diodenarraydetektion erfolgen [28]. Die ganze Substanzzone wird samt Tiefenprofil ins HRMS-System überführt und somit ist die Detektierbarkeit vergleichbar zur Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie [29]. Das Verfahren ist quantitativ einsetzbar.

Ein desorptionsbasiertes Interface zur HPTLC-HRMS-Kopplung ist Direct Analysis in Real Time (DART)-HRMS/MS. Diese Ionisierungsquelle nutzt einen beheizbaren angeregten Helium-Gasstrom zur Desorption/Ionisierung unter Atmosphärendruck in der Umgebungsluft. Mit DART-HRMS/MS kann die ganze Probebahn mit einer Ortsauflösung unter 1 mm abgefahren werden (Abb. 4B). HPTLC-DART-HRMS/MS erfasst nur einen Aliquot der Zone an ihrer Oberfläche. Somit kann die gleiche Zone mehrmals aufgenommen werden oder noch für eine nachfolgende Derivatisierung genutzt werden. Mit einer genauen x,y,z-Ansteuerung ist das Verfahren quantitativ einsetzbar.

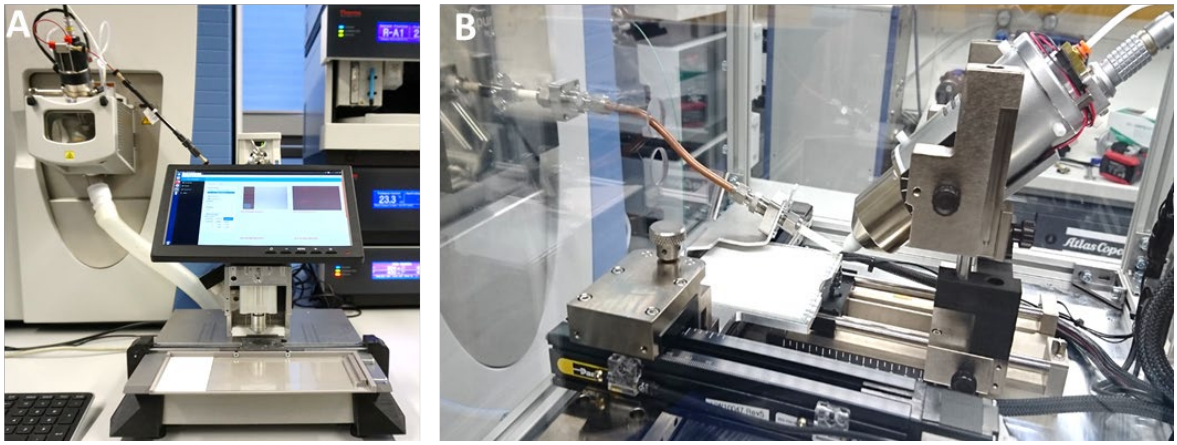

Abb. 4. Interface zur HPTLC-HRMS/MS-Kopplung: (A) Nachweisstarkes Elutionskopf-basiertes autoTLC-MS-Interface eluiert/ionisiert bzw. überführt die gesamte Substanzzone; (B) quantitatives Scannen einer Probenbahn mittels DART-Interface desorbiert/ionisiert bzw. überführt einen Teil der Substanzzone.

Machbarer Einstieg in die leistungsstarke planare HPTLC-Bioassay-Technologie

Die Methodik liefert umfassende und wichtige Informationen nicht nur zu bekannten, sondern vor allem zu unbekannten Schadstoffen in komplexen Proben. Die leistungsstarke HPTLC-Bioassay-Technologie wurde miniaturisiert [30,31] und lässt sich über das kostengünstige open-source (nicht patentierte) 2LabsToGo-Eco (Abb. 5) [32,33] mit kontrollierter Plattenaktivität [34] für Untersuchungen einsetzen. Das 2LabsToGo-Eco vereint das analytische HPTLC-Labor und das Bioassay-Labor in einem nachhaltigen System. Es ermöglicht auch unbekannte Schadstoffe in Proben erstmals umfassend zu detektieren. Das 2LabsToGo-Eco ist sowohl für zuverlässiges Screening als auch für quantitative Analysen einsetzbar und zum Selbstzusammenbau (Materialpreis 3738 Euro in 2024) bestimmt. Im Vorfeld müssen ca. 180 Teile eingekauft und ca. 125 Teile 3D gedruckt werden. Beim Zusammenbau (ca. 5 Tage) muss man schrauben und löten können. Man kann es sich aber auch über ein Start-up (www.chromnil.com) zusammenbauen lassen. Präzision, Genauigkeit und Zuverlässigkeit der Analysen mittels 2LabsToGo-Eco sind mit denen kommerzieller Geräte vergleichbar [33,35,36].

Abb. 5. Open-source 2LabsToGo-Eco, das selbst zusammengebaut für ein nachhaltiges Schadstoffscreening eingesetzt werden kann [33].

Stärke der wirkungsbezogenen non-target Methodik für die Forensische Toxikologie

Reviews zur TLC/HPTLC in der forensischen Analytik [37,38] zeigen die breite Anwendung der kostengünstigen und einfachen Analysetechnik, jedoch sind das Zielsubstanz- bzw. Zielgruppen-Methoden. Man sucht damit nach bekannten Substanzen. Die hochgradig gekoppelte (hyphenated) HPTLC hat jedoch weit mehr Potential, indem sie auch unbekannte Schadstoffe detektieren kann und komplexe Proben genauer in der Wirkung erfasst. Mit einer einzigen Analyse bekommt man viele Informationen zu den gefundenen Schadstoffen [12,39]. Die hyphenated HPTLC gibt Antworten, die derzeitige *State of the art*-Technologien nicht geben können [40,41] – vor allem wenn es um die Frage geht, ob eine Probe nicht nur bekannte sondern auch unbekannte Schadstoffe enthält [16,42,43]. Mit derartig offenen Fragestellungen befasst sich auch die Forensische Toxikologie. Wie kann nun die Forensische Toxikologie von der modernen hyphenated HPTLC profitieren, um fundierte Entscheidungen zu treffen [42]?

Einige Stärken der modernen hyphenated HPTLC werden nachfolgend mit dem Stand der Technik gespiegelt (Tab. 1).

1. Proben werden möglichst unverändert analysiert (damit nichts übersehen wird). Dies ist auch effizient, da die Probenvorbereitung oft der aufwendigste Schritt im Verfahren ist.
   - Flüssige Proben werden direkt analysiert [15] und feste Proben als Rohextrakt (über einen breiten Polaritätsbereich extrahiert) [44]. Die Probe wird vergleichsweise vollständiger abgebildet, auch die an der Startzone verbliebenen Komponenten sind detektierbar. Im Gegensatz dazu nutzen säulenchromatographische Techniken gerne Aufreinigungsstrategien. Substanzen, die am Säulenkopf oder im Liner stark adsorbieren, erreichen nicht den Detektor und sind somit nicht erfassbar.
   - Kleine wie hohe Probevolumina (0,1 µL bis zu 1 mL) können eingesetzt werden, was die Flexibilität und direkte Detektierbarkeit von Analyten verbessert. Durch das automatisierte Aufsprühen der Probelösung wird diese konzentriert und mittels flächenförmiger Auftragung gleichmäßig auf das Adsorbens verteilt [13,45]. Die Flächenauftragung verteilt die hohe Matrixlast der Probe, so dass das Fließmittel ungehindert durchfließen kann [46]. Im Gegensatz dazu liegen bei säulenchromatographischen Techniken die Probenvolumina im unteren µL-Bereich.
2. Hohe Flexibilität ermöglicht die Trennung komplexer Proben. Die parallele Chromatographie ermöglicht zudem einen idealen Probenvergleich.
   - Die Lösungsmittel werden vor der Detektion von der Platte entfernt. Einsetzbar sind Lösungsmittel von wässrig bis lipophil und von sauer bis basisch. Ein hoher Salzgehalt ist wenig kritisch. Zudem können biologische und biochemische Assays ohne technischen Aufwand nach Abdampfen der organischen Lösungsmittel direkt auf der Platte durchgeführt werden. Im Gegensatz dazu sind bei flüssigkeitschromatographischen Techniken die optische Durchlässigkeit detektionsrelevant und eine niedrige Viskosität systemrelevant sowie eine gewisse Mischbarkeit mit Wasser vorgegeben; Bioassays können aufgrund der langen Inkubationszeiten nicht online im Fluss durchgeführt werden.
   - Die große Flexibilität bei der uneingeschränkten Auswahl der Lösungsmittel für das Fließmittel und der Adsorbenzien (eingeschlossen eigener Schichtmodifizierungen) sowie die kontrollierte Einbeziehung einer Dampfphase (3. Phase) unterstützen die Anpassung an die verschiedensten Trennaufgaben. Im Gegensatz dazu können weniger flexible säulenchromatographische Techniken nur 2 Phasen nutzen.
   - Parallel analysierte Proben werden unter denselben Bedingungen hinsichtlich Chromatographie-, System- und Umwelteinflüssen verglichen. Die Parallelanalyse und schrittbasierte modulare Automatisierung sind sehr effizient. Im Gegensatz dazu nutzen säulenchromatographische Techniken die sequenzielle Analyse, wodurch sich bei komplexen Proben die Bedingungen schnell ändern können. Eine Fehlermeldung an einer Stelle kann die ganze Anlage blockieren bzw. stilllegen.
3. Nichts wird übersehen – alles was wirkt, wird detektiert.
   - Die nach der HPTLC durchgeführte Wirkungsdetektion detektiert auch bisher unbekannte Schadstoffe [15,16]. Im Gegensatz dazu detektieren Flüssigkeitschromatographie–Massenspektrometrie nur die unter den Standardeinstellungen ionisierbaren Moleküle. Die Ionisierbarkeit von Molekülen unterscheidet sich über einen Bereich von 10 Mio. Versuche mit variierten Standardeinstellungen oder anderen Interfaces würden Moleküle bestenfalls erst ionisieren, womöglich aber auch nicht; sie werden leicht übersehen [47].
   - Alle, auch bisher unbekannte Schadstoffe, die gemäß dem Wirkmechanismus wirken, werden detektiert. Dies ist wichtig, denn es wirken nicht nur bekannte Schadstoffe. Im

Gegensatz dazu zielen säulenchromatographische Techniken auf bekannte Schadstoffe ab, da kein Hinweis zur Toxizität unbekannter Substanzsignale gegeben wird. Schadstoffe außerhalb des Fokus werden nicht als solche erkannt.

- Komplexe Stoffgruppen, z. B. die in Mineralöl vorkommenden gesättigten bzw. aromatischen Mineralölkohlenwasserstoffe (mineral oil saturated/aromatic hydrocarbons, MOSH/ MOAH), beinhalten Stoffe mit unterschiedlicher Toxizität, wodurch die gleiche Menge unterschiedlicher Vertreter einer Stoffgruppe zu drastisch anderen Effekten führen kann. Im Gegensatz dazu erlaubt ein Summenwert bei säulenchromatographischen Techniken [48] keine Aussage zum Gefährdungspotenzial.

4. Priorisierungsstrategie reduziert eine komplexe Probe auf ihre Schadstoffe.

- Die Wirkungsdetektion lenkt den Fokus auf die Schadstoffe [15]. Sie hebt direkt hervor, welche Substanzen gefährlich sind. Die Priorisierungsstrategie ist effektiv und disruptiv. Denn im Gegensatz dazu versucht man durch umfassende Chromatographie (*comprehensive chromatography*) alle chemischen Komponenten einer komplexen Probe zu trennen, was oft zu einer überwältigenden Datenmenge zu unbekannten Stoffen mit unklarer biologischer bzw. toxikologischer Relevanz führt. Es können detektierte Signale nur zu 1 % einer Struktur und Toxizität zugeordnet werden [47], 99 % bleiben unklar.

5. Differenzierte Schadstoff-Profile haben Aussagekraft.

- Die HPTLC reicht aus, um Substanzen mit unterschiedlichen Effekten zu trennen und diese differenziert zu detektieren [11,12,17]. Ein positives Signal und ein negatives Signal weisen zwei unterschiedliche Wirkungen nach (z. B. Agonist/Antagonist; Wirkung/ Zytotoxizität) und doppeln das Risiko. Im Gegensatz dazu überlagern sich unterschiedliche Wirkungen im Summenwert derzeitiger *in vitro* Bioassays und heben sich auf. Es kann der Fehlschluss „Keine Wirkung“ durch konträre Signale hervorgerufen werden.
- Auch lipophile Moleküle sind hinsichtlich ihrer Wirkung detektierbar. Die Adsorption der Substanzen in der porösen Kieselgelschicht ermöglicht durch die hohe Elutionskraft des Mediums den Kontakt mit den Zellen. Im Gegensatz dazu werden bei *in vitro* Bioassays sehr lipophile Substanzen in der Löslichkeit diskriminiert [42].

6. Schadstoffzonen werden effizient weitergehend charakterisiert.

- Durch die wirkungsbezogene Priorisierung werden Schadstoffe effizient und zielstrebig in die HRMS überführt [49]. Im Gegensatz dazu werden in der Säulenchromatographie–HRMS, da keine Priorisierung vorab erfolgt, unnötigerweise Matrix und Hintergrund mit detektiert, was das teure HRMS-System belastet.
- Die Multi-Detektion ist einzigartig. Parallel getrennte Proben im fließmittelfreien Chromatogramm sind nach der Entwicklung und UV/Vis/FLD-Detektion für weitere Detektions- und Identifizierungsverfahren zugänglich. Bioassays, HRMS und Derivatisierungsreagenzien können sukzessive auf demselben Chromatogramm eingesetzt werden. So wird z. B. nach einer Bioassay-Sequenz [33] und HRMS-Spektren-Aufnahme, eine Sequenz von selektiven Derivatisierungsreagenzien auf das Bioautogramm aufgebracht [16], was Hinweise zur Substanzgruppe der unbekannten Schadstoffe in der restlichen Zone gibt. Im Gegensatz dazu sind Derivatisierungsreaktionen in der Säulenchromatographie aufwendiger und kaum im Einsatz.

7. Die Methodik ist effizient und sehr nachhaltig.

- Die Nachhaltigkeit der Methoden ist sehr gut (z. B. 0,93 von maximal 1,00 gemäß AGREE [15]). Es reichen z. B. für 48 Proben ca. 6 mL Fließmittel in der Horizontal-Entwicklungskammer bei einer antiparallelen Entwicklung [50]. Da jeder HPTLC-Schritt automatisiert

ist, beläuft sich der Personalaufwand in der Routine auf ca. 5 min Plattentransferzeit zwischen den Geräten für die parallele Bearbeitung von z. B. 20 Proben pro Platte [51]. Durch die gemeinsame Software, die alle Schritte bzw. Geräte kontrolliert, ist nur ein Klick nötig, um den nächsten Schritt zu starten. Die planare Bioassay-Detektion ist wässrig basiert und per se nachhaltig, wobei gegenüber *in vitro* Bioassays keine bzw. kaum Plastikmaterialien verwendet werden. Die Nachhaltigkeit der Methodik wird nicht gelehrt/erfahren und somit deutlich unterschätzt [3,42,46,50,52]. Im Gegensatz zur HPTLC stehen säulenchromatographische Methoden durch den hohen Verbrauch an Lösungsmitteln in der Nachhaltigkeit deutlich nach.

- Die Nachhaltigkeit der planaren Technik ist durch das kostengünstige open-source 2LabsToGo-Eco (Abb. 5) sehr gut. Der Dematerialisierungsgrad ist führend (ein höherer wurde bisher nicht gezeigt). Der Betrieb des 2LabsToGo-Eco mit Solarpanels [33] erfordert keine Energiekosten. Im Gegensatz dazu sind bei miniaturisierten säulenchromatographischen Systemen doch oft Peripheriegeräte nötig.

Tab. 1. Stärken der modernen hyphenated HPTLC im Vergleich zum Stand der Technik.

Hyphenated HPTLC	**Stand der etablierten Technik**
Probenvorbereitung ist minimal und Proben werden möglichst unverändert analysiert.	Aufreinigungsstrategien werden gerne genutzt, um die Säule zu schonen.
Proben können über einen großen Volumina-Bereich (0,1 µL bis 1 mL) eingesetzt werden.	Typische Probenvolumina liegen im unteren µL-Bereich.
Freie Lösungsmittelauswahl ist gegeben.	Optische Durchlässigkeit, niedrige Viskosität und Mischbarkeit mit Wasser sind vorgegeben sowie Expansionsvolumen im GC-Liner.
3 Phasen können zur Trennung eingesetzt werden; eigene Schichtmodifizierungen sind möglich.	2 Phasen sind nur nutzbar, jedoch große Vielfalt an Säulen auf dem Markt.
Gleiche Bedingungen für parallel analysierte Proben ermöglichen beste Vergleichbarkeit.	Bei komplexen Proben können sich die Bedingungen bei sequenzieller Analyse schnell ändern.
Wirkungsdetektion übersieht nichts (direkt nach HPTLC durchgeführt).	LC-MS detektiert nur ionisierbare Moleküle und das unterschiedlich gut (Unterschiede in der Ionisierbarkeit über einen Bereich von 10 Mio.).
Alle, auch unbekannte Schadstoffe werden detektiert.	Säulenchromatographische Techniken zielen auf bekannte Schadstoffe ab, da von unbekannten Signalen auch die Toxizität unbekannt ist.
Komplexe Stoffgruppen beinhalten Stoffe mit unterschiedlicher Toxizität, was planare Bioassays abbilden können.	Ein Summenwert mittels säulenchromatographischer Techniken sagt nichts zum Gefährdungspotential aus.
Die Wirkungsdetektion priorisiert und lenkt den Fokus auf die Schadstoffe.	99 % der Features, die durch umfassende Chromatographie detektiert werden, können keiner Struktur und Toxizität zugeordnet werden.
HPTLC trennt und detektiert differenziert Substanzen mit unterschiedlichen Effekten.	Unterschiedliche Wirkungen überlagern sich im Summenwert von *in vitro* Bioassays.
Auch sehr lipophile Moleküle sind hinsichtlich ihrer Wirkung detektierbar.	Sehr lipophile Moleküle werden in *in vitro* Bioassays diskriminiert.
Zielstrebige Detektion durch Elution der priorisierten Schadstoffzonen in die HRMS (keine Matrix-/Hintergrundbelastung).	Säulenchromatographie-HRMS detektiert auch Matrix und Hintergrund, da keine Priorisierung vorab erfolgt (kein Hinweis zur Toxizität).
Multi-Detektion (UV/Vis/FLD/Bioassay-Sequenz/Derivatisierungsreagenz-Sequenz) in derselben Analyse liefert Substanzgruppenhinweise zu den Schadstoffen.	Derivatisierungsreaktionen in der Säulenchromatographie sind aufwendiger und daher wenig im Einsatz; oftmals werden nur 2 Detektoren gekoppelt.
Methoden sind durch die parallele Analyse sehr nachhaltig.	Hoher Verbrauch an Lösungsmitteln oder Gasen verschlechtert die Nachhaltigkeit.
Dematerialisierungsgrad des 2LabsToGo-Eco und Betrieb mit Solarpanels ist sehr nachhaltig.	Miniaturisierungen erfordern doch oft Peripheriegeräte; kein Betrieb nur mit Solarenergie bisher gezeigt.

Biologische und biochemische Assays im Einsatz

Grundsätzlich kann jeder Bioassay und biochemische Assay als planare Variante auf die Platte gebracht werden. Exemplarisch sind einige planare (Bio)assays für die Schadstoff-Analyse aufgeführt (Abb. 6 [42]). Die metabolische Giftung/Entgiftung mit einer humanen Leberzellen S9-Fraktion kann in jedem Assay eingebunden werden. Die Durchführung der Bioassays unter Einsatz von ready-to-spray cryostocks [19] ist fast so einfach wie eine Derivatisierung mit Reagenzien.

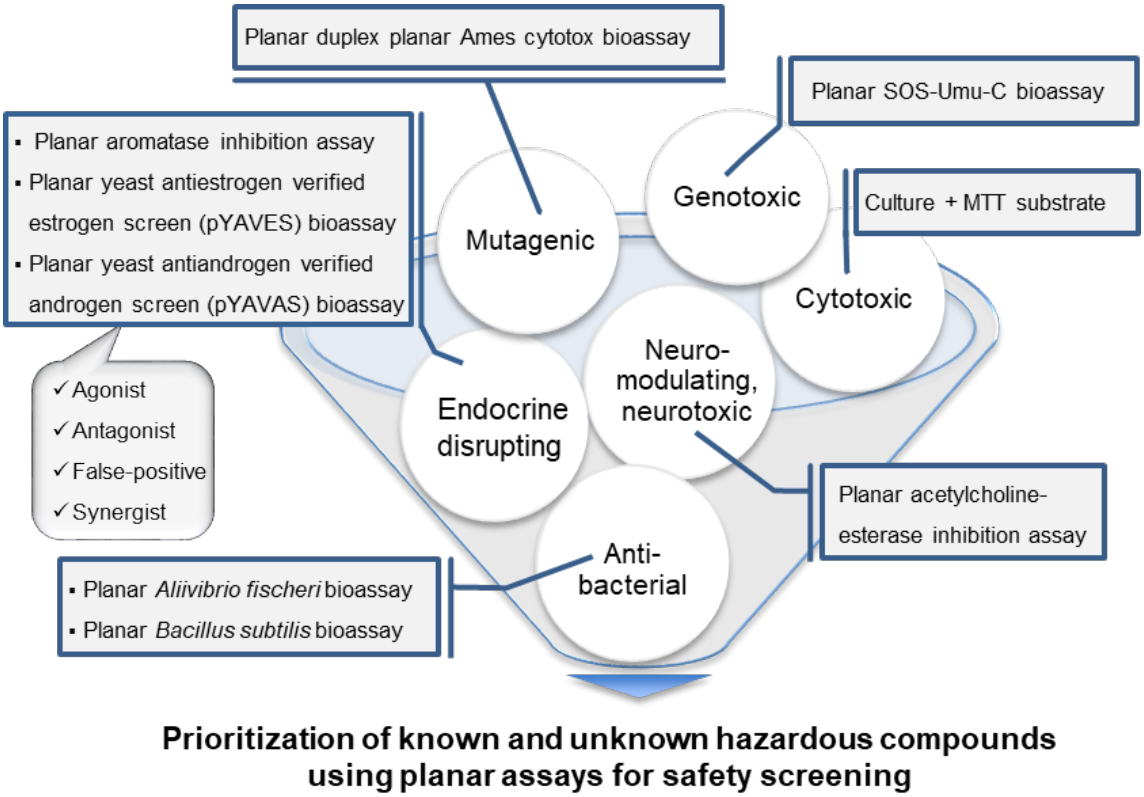

Abb. 6. Planare (Bio)assays für die Schadstoff-Analyse von komplexen Proben [42].

Die (Bio)assays wurden für das Screening von als sicher geltenden Alltagsprodukten eingesetzt. Es stellte sich heraus, dass diese viele unbekannte, u. a. erbgutverändernde, mutagene, zelltötende, neuromodulierende/-toxische, antibakterielle und den Hormonhaushalt beeinflussende Schadstoffe enthalten, welche regulatorisch bisher nicht abgedeckt werden. Im Folgenden werden ein Bioassay und ein biochemischer Assay exemplarisch näher erläutert.

Der planare SOS-Umu-C-Bioassay indiziert Genotoxizität und zeigt erbgutverändernde Schadstoffe als orange-fluoreszierende oder rosafarbene Substanzzonen an. Es wurden 140 Körperpflegeprodukte auf genotoxische Substanzen untersucht, wobei genotoxische Mineralölbestandteile (MOSH/MOAH), oxidierte Fettstrukturen, Fettsäureglycidylester, Monochlorpropandiol/-ester, oxidierte Sterole *etc.* gefunden wurden. Dosis-Wirkungs-Kurven wiesen auf halbmaximale erbgutverändernde Effektdosen (EC_{50}) von etwa 60 µg der Produkte hin, die bei nur 6 g untersuchtem Produkt oder bei einer angehäuften Verwendung verschiedener Produkte, wie in Verbraucherprofilen beobachtet, leicht um den Faktor 100.000 überschritten werden können (Abb. 7) [16]. Über Wunden, Mikrorisse, Zahnfleischbluten *etc.* können Schadstoffe direkt in die Blutbahn oder durch das Abwaschen in die Umwelt gelangen.

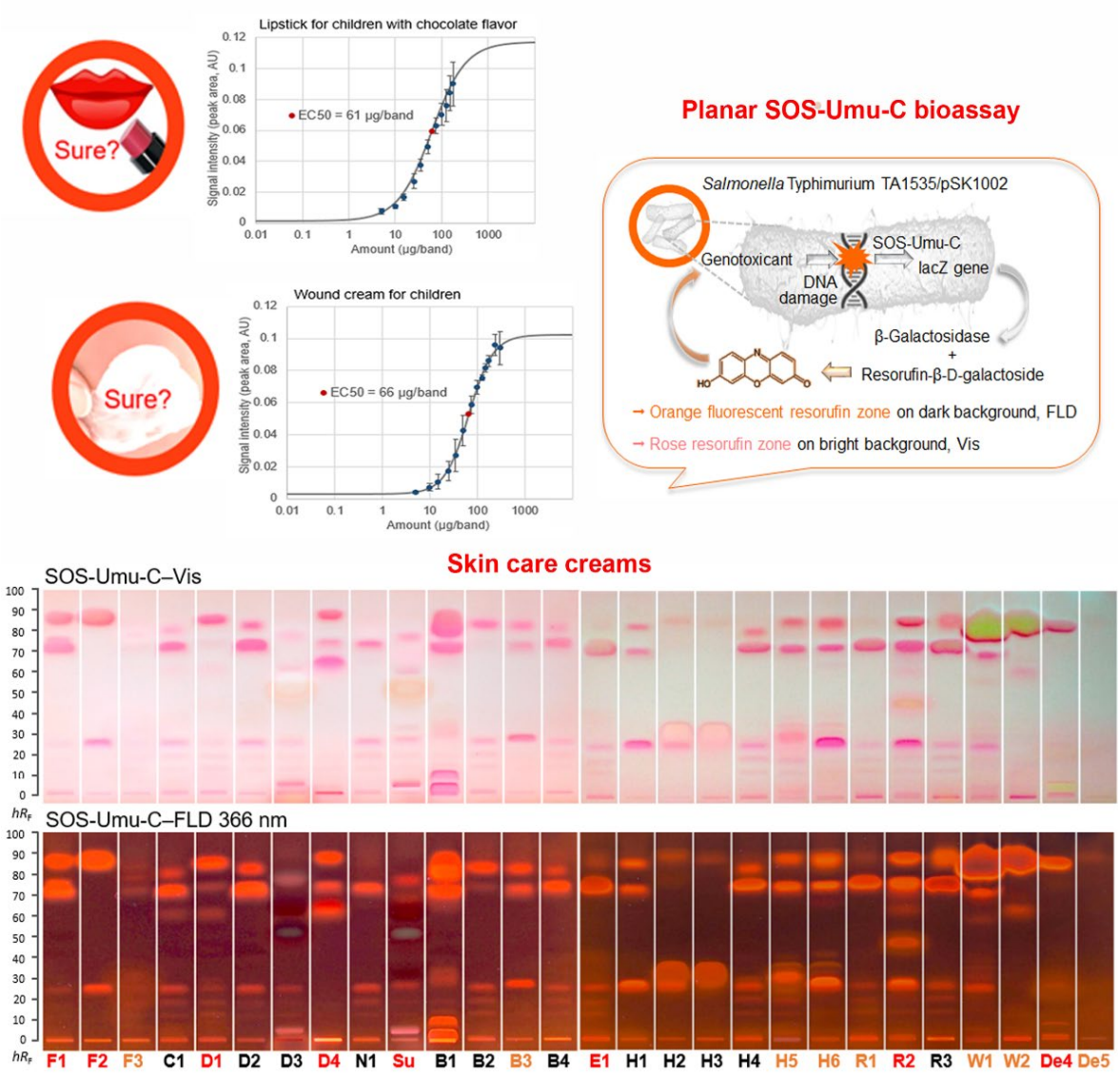

Abb. 7. Mechanistisches Schema des planaren SOS-Umu-C-Bioassays, der erbgutverändernde Schadstoffe als orange-fluoreszierende oder rosafarbene Zonen anzeigt und zum Screening von verschiedenen Hautpflegeprodukten eingesetzt wurde, wobei die EC_{50} bei etwa 60 µg lag [16].

Der planare Acetylcholinesterase-Hemmassay zeigt Inhibitoren der Acetylcholinesterase und somit neurotoxische/-modulierende Substanzen als farblose Zonen an. Durch das Screening von 42 Parfüms wurden verschiedene derartige Substanzen entdeckt (Abb. 8 [15]).

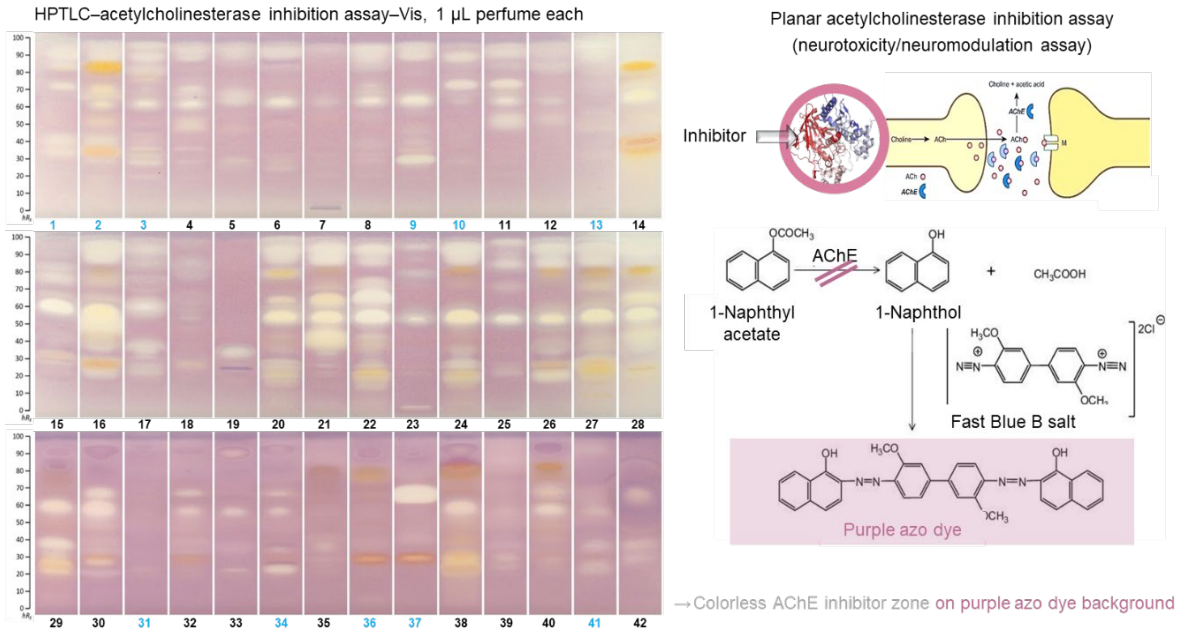

Abb. 8. Mechanistisches Schema des planaren Acetylcholinesterase-Hemmassays, der Inhibitoren somit neurotoxische/-modulierende Substanzen als farblose Zonen anzeigt und zum Screening von 42 Parfüms eingesetzt wurde [15].

Durch die parallele Probenauftrennung und wirkungsbezogene Detektion schädlicher Substanzen (können Spuren sein, jedoch hochtoxisch) in komplexen Proben wurden neue Erkenntnisse erhalten, die den derzeitigen Stand des Wissens bedeutungsvoll erweiterten. Bisherige Methoden hatten den Fokus auf bekannte Schadstoffe und dadurch unbekannte Schadstoffe ignoriert. Der entscheidende Unterschied ist, dass die Probe so originär wie möglich aufgetrennt wird und nach der Trennung die Stoffe direkt auf derselben Oberfläche auf ihren Effekt auf Zellsysteme und Rezeptoren untersucht werden. Dadurch muss ein Schadstoff nicht erst bekannt sein, um seinen Effekt in einer Probe sehen zu können. Durch die Effekterkennung können nun mittels weiterer Verfahren wie HRMS/MS oder selektiver Derivatisierung die neu entdeckten, noch unbekannten, Schadstoffe charakterisiert und Schadstoffgruppen zugeordnet werden.

Sehr zielgerichtet werden nur die interessierenden Schadstoff-Zonen online und automatisiert in die HRMS/MS eluiert. Dabei kann eine zweite orthogonale Trennung eingebunden werden, falls vermutlich mehrere Substanzen in einer Substanzzone liegen (hyphenated NP-HPTLC−UV/Vis/FLD/BLD−EDA-heart cut-RP-HPLC-DAD-HRMS/MS, Abb. 9 [42]). Da der Bioassay entsprechende Schadstoffe detektiert, kann nichts übersehen werden, denn es müssen mitunter auch verschiedene Interface (ESI, APCI und APPI) und Parametereinstellungen getestet werden, um Schadstoffe (Ionisierbarkeit über einen Bereich von 10 Mio.) schließlich zu ionisieren und eine Molekularformel zu erhalten. Nach der Elution der Schadstoff-Zone vom Bioautogramm kann nachfolgend noch eine selektive Derivatisierungs-Sequenz aufgebracht werden zur Zuordnung in Strukturgruppen. Oftmals reicht die restliche Substanzzone um die Elutionszone dazu aus.

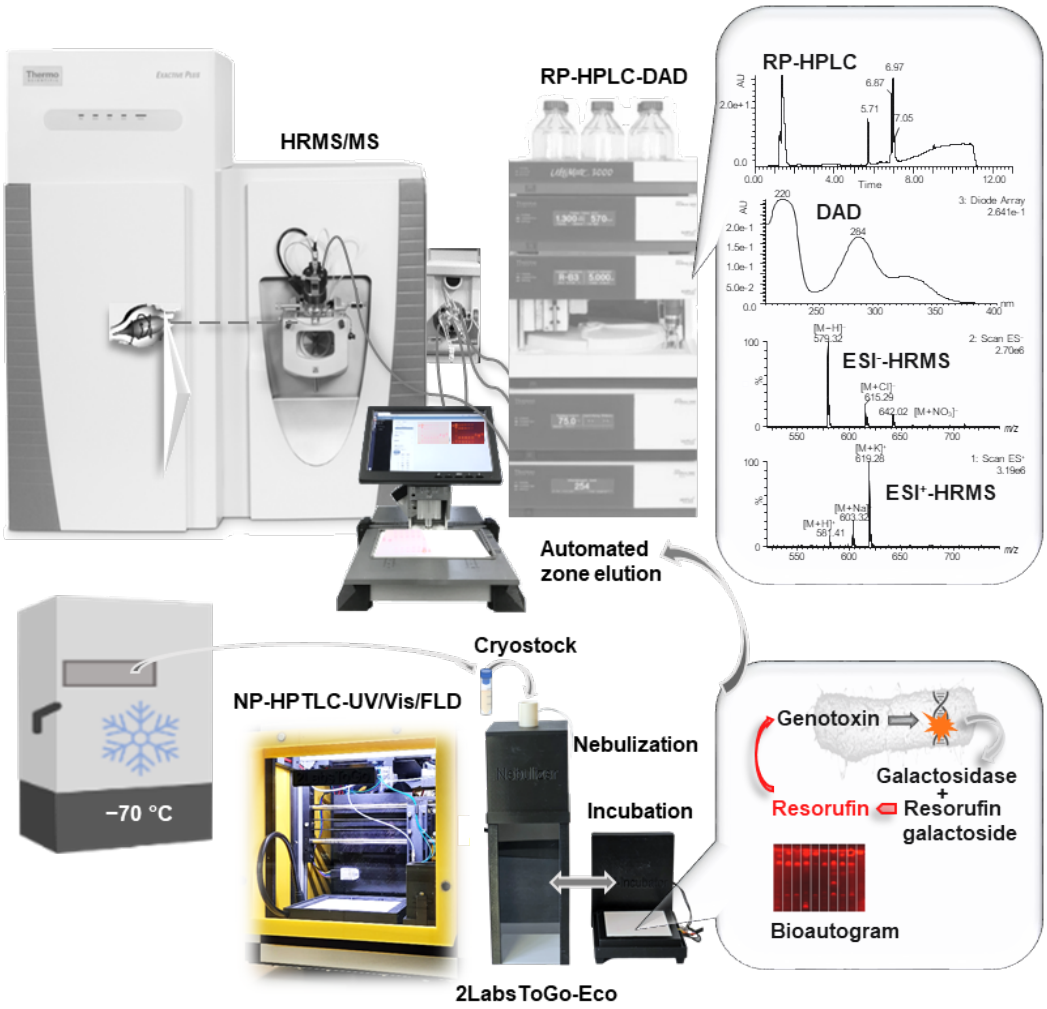

Abb. 9. Nachweis von unbekannten Schadstoffen in komplexen Proben: 2LabsToGo-Eco-Analyse (NP-HPTLC−UV/Vis/FLD/BLD−EDA) der komplexen Probe, und nach Priorisierung werden interessierende Schadstoffzonen im Bioautogramm, das ins autoTLC-MS-Interface hochgeladen wurde, angeklickt und dann vollständig automatisiert nacheinander in die HRMS/MS eluiert (heart cut-HRMS/MS) – optional kann dies über eine zweite orthogonale säulenchromatographische Trennung und Detektion erfolgen (heart cut-RP-HPLC-DAD-HRMS/MS) [42].

Anmerkung

Das nächste, nur jährlich stattfindende, digitale Online-Training zur Hyphenated HPTLC (in Englisch) findet vom 16.–20.03.2026 jeweils von 09:00 bis 17:00 Uhr statt. Eine Teilnahme kann per E-Mail (gertrud.morlock@uni-giessen.de) gebucht werden.

Literatur

[1] J. Sherma, G. Morlock, Chronology of Thin-Layer Chromatography Focusing on Instrumental Progress, J Planar Chromatogr 21 (2008) 471–477. https://doi.org/10.1556/JPC.21.2008.6.15.

[2] G. Morlock, W. Schwack, LC-MS = HPLC-MS plus TLC/HPTLC-MS, Deutsche Lebensmittel-Rundschau 106 (2010) 57–60.

[3] Morlock, G., Schnelle Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie mit Multidetektion, In: Kroh, Lothar, S. Drusch, R. Matissek (Eds.), Angewandte instrumentelle Lebensmittelanalytik, 4th ed., Behr's Verlag, Hamburg, 2020, pp. 77-111.

[4] G. Morlock, S. Kopacz, Fast and precise SBSE-HPTLC/FLD method for quantification of six polycyclic aromatic hydrocarbons frequently found in water, J Liq Chromatogr Relat Technol 31 (2008) 1925–1942. https://doi.org/10.1080/10826070802194856.

[5] W. Schwack, E. Pellissier, G. Morlock, Analysis of unauthorized Sudan dyes in food by high-performance thin-layer chromatography, Anal Bioanal Chem 410 (2018) 5641–5651. https://doi.org/10.1007/s00216-018-0945-6.

[6] L.R. Snyder, Classification of the solvent properties of common liquids, J Chromatogr A 92 (1974) 223–230. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)85732-5.

[7] S. Nyiredy, C. Erdelmeier, B. Meier, O. Sticher, „PRISMA": Ein Modell zur Optimierung der mobilen Phase für die Dünnschichtchromatographie, vorgestellt anhand verschiedener Naturstofftrennungen 1, PLANTA MEDICA 51 (1985) 241–246. https://doi.org/10.1055/s-2007-969468.

[8] G.E. Morlock, G. Sabir, Reagent sequence for planar chromatographic analysis of eight sweeteners in food products approved in the European Union, J Planar Chromatogr 35 (2022) 273–279. https://doi.org/10.1007/s00764-022-00178-0.

[9] G.E. Morlock, J. Heil, A.M. Inarejos-Garcia, J. Maeder, Effect-Directed Profiling of Powdered Tea Extracts for Catechins, Theaflavins, Flavonols and Caffeine, Antioxidants (Basel) 10 (2021) 117. https://doi.org/10.3390/antiox10010117.

[10] I. Klingelhöfer, G.E. Morlock, Sharp-bounded zones link to the effect in planar chromatography-bioassay-mass spectrometry, J Chromatogr A 1360 (2014) 288–295. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.07.083.

[11] A. Ronzheimer, T. Schreiner, G.E. Morlock, Multiplex planar bioassay detecting estrogens, antiestrogens, false-positives and synergists as sharp zones on normal phase, Phytomed 250 (2022) 154230. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154230.

[12] Schreiner, T., Ronzheimer, A., Friz, M., Morlock, G.E., Multiplex planar bioassay with reduced diffusion on normal phase, identifying androgens, verified antiandrogens and synergists in botanicals via 12D hyphenation, Food Chem. 395 (2022) 133610.

[13] I. Klingelhöfer, G.E. Morlock, Bioprofiling of Surface/Wastewater and Bioquantitation of Discovered Endocrine-Active Compounds by Streamlined Direct Bioautography, Anal Chem 87 (2015) 11098–11104. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03233.

[14] A.M. Inarejos-Garcia, J. Heil, P. Martorell, B. Álvarez, S. Llopis, I. Helbig, J. Liu, B. Quebbeman, T. Nemeth, D. Holmgren, G.E. Morlock, Effect-Directed, Chemical and Taxonomic Profiling of Peppermint Proprietary Varieties and Corresponding Leaf Extracts, Antioxidants (Basel) 12 (2023) 476. https://doi.org/10.3390/antiox12020476.

[15] G.E. Morlock, J. Heil, Fast unmasking hazards of safe perfumes, J Chromatogr A 1754 (2025) 465959. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.465959.

[16] G.E. Morlock, L. Zoller, Fast unmasking toxicity of safe personal care products, J Chromatogr A 1752 (2025) 465886. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.465886.

[17] D. Meyer, G.E. Morlock, Concept of a six-fold multiplex planar bioassay to distinguish endocrine agonist, antagonist, cytotoxic and false-positive responses, Talanta 275 (2024) 126174. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2024.126174.

[18] A. Ronzheimer, A.E. Ringelmann, G.E. Morlock, Fast and sustainable planar yeast-based bioassay for endocrine disruptors in complex mixtures: Start of cell cultivation to result within one day, Talanta 272 (2024) 125746. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2024.125746.

[19] B. Loderhose, G.L. Gottschalg, G.E. Morlock, Fast and easy handling of planar bioassays using cryostocks of a ready-to-spray cell suspensions (in submission).

[20] A. Alpmann, G. Morlock, Improved online coupling of planar chromatography with electrospray mass spectrometry: extraction of zones from glass plates, Anal Bioanal Chem 386 (2006) 1543–1551. https://doi.org/10.1007/s00216-006-0692-y.

[21] G. Morlock, W. Schwack, Coupling of planar chromatography to mass spectrometry, Trends Anal Chem 29 (2010) 1157–1171. https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.07.010.

[22] G. Morlock, Y. Ueda, New coupling of planar chromatography with direct analysis in real time mass spectrometry, J Chromatogr A 1143 (2007) 243–251. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.056.

[23] A. Mehl, W. Schwack, G.E. Morlock, On-surface autosampling for liquid chromatography−mass spectrometry, J Chromatogr A 1651 (2021) 462334. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462334.

[24] A. Mehl, L. Hudel, M. Bücker, G.E. Morlock, Validated Screening Method for 81 Multiclass Veterinary Drug Residues in Food via Online-Coupling High-Throughput Planar Solid-Phase Extraction to High-Performance Liquid Chromatography-Orbitrap Tandem Mass Spectrometry, J Agric Food Chem 70 (2022) 10886–10898. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c03925.

[25] A. Mehl, S. Seiferling, G.E. Morlock, Non-target estrogenic screening of 60 pesticides, six plant protection products, and tomato, grape, and wine samples by planar chromatography combined with the planar yeast estrogen screen bioassay, Anal Bioanal Chem 416 (2024) 701–713. https://doi.org/10.1007/s00216-023-04605-x.

[26] G. Morlock, W. Schwack, Hyphenations in planar chromatography, J Chromatogr A 1217 (2010) 6600–6609. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.058.

[27] T. Schreiner, G.E. Morlock, Investigation of the estrogenic potential of 15 rosé, white and red wines via effect-directed ten-dimensional hyphenation, J Chromatogr A 1690 (2023) 463775. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463775.

[28] T. Schreiner, G.E. Morlock, Non-target bioanalytical eight-dimensional hyphenation including bioassay, heart-cut trapping, online desalting, orthogonal separations and mass spectrometry, J Chromatogr A 1647 (2021) 462154. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462154.

[29] U. Jautz, G. Morlock, Efficacy of planar chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry for employment in trace analysis, J Chromatogr A 1128 (2006) 244–250. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.06.070.

[30] Morlock, G., Morlock, J., Morlock, L., Microfluidic and Small-Scale Planar Separation System, Chapter 14: In C. Poole (Ed.), Instrumental Thin-Layer Chromatography, Handbooks in Separation Science, Elsevier Science, Amsterdam, 2023, 395-409.

[31] G.E. Morlock, Miniaturized planar chromatography using office peripherals--office chromatography, J Chromatogr A 1382 (2015) 87–96. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.050.

[32] G.E. Morlock 2LabsToGo-Eco workshop for analysis of genotoxic compounds in foods and cosmetics at Justus Liebig University Giessen (2024).

[33] M.C.O. Romero, K. Jakob, J. Schmidt, T. Nimmerfroh, W. Schwack, G.E. Morlock, Consolidating two laboratories into the most sustainable lab of the future: 2LabsToGo-Eco, Anal. Chim. Acta (Analytica Chimica Acta) (2025) 344103. https://doi.org/10.1016/j.aca.2025.344103.

[34] A. Haase, W. Schwack, G.E. Morlock, Humidity control for the 2LabsToGo-Eco, Anal. Chim. Acta (Analytica Chimica Acta) (2025) in Druck.

[35] G.E. Morlock, J. Koch, W. Schwack, Miniaturized open-source 2LabsToGo screening of lactose-free dairy products and saccharide-containing foods, J Chromatogr A 1688 (2023) 463720. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463720.

[36] K. Jakob, W. Schwack, G.E. Morlock, All-in-one 2LabsToGo system for analysis of ergot alkaloids in whole rye, Food Chem 453 (2024) 139593. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139593.

[37] A. Radoičić, P. Ristivojević, N. Radosavljević-Stevanović, Recent applications of high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) in forensic drug analysis, J Planar Chromatogr 37 (2024) 407–414. https://doi.org/10.1007/s00764-024-00320-0.

[38] M.-V. Coman, M.-C. Herghelegiu, Thin-layer chromatography in forensic analysis, J Planar Chromatogr 38 (2025) 247–333. https://doi.org/10.1007/s00764-025-00375-7.

[39] T. Schreiner, N.M. Eggerstorfer, G.E. Morlock, Ten-dimensional hyphenation including simulated static gastro-intestinal digestion on the adsorbent surface, planar assays, and bioactivity evaluation for meal replacement products, Food Funct 14 (2023) 344–353. https://doi.org/10.1039/d2fo02610d.

[40] G.E. Morlock, 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 (2021) 338644. https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338644.

[41] G.E. Morlock, Planar chromatographic super-hyphenations for rapid dereplication, Phytochem Rev doi 10.1007/s11101-022-09844-x (2022). https://doi.org/10.1007/s11101-022-09844-x.

[42] G.E. Morlock, Chemical safety screening of products - better proactive, J Chromatogr A 1752 (2025) 465946. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.465946.

[43] G.E. Morlock, J. Heil, V. Bardot, L. Lenoir, C. Cotte, M. Dubourdeaux, 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 26 (2021). https://doi.org/10.3390/molecules26051468.

[44] G.E. Morlock, M. Busso, S. Tomeba, A. Sighicelli, Effect-directed profiling of 32 vanilla products, characterization of multi-potent compounds and quantification of vanillin and ethylvanillin, J Chromatogr A 1652 (2021) 462377. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462377.

[45] G.E. Morlock, G. Sabir, Comparison of two orthogonal liquid chromatographic methods for quantitation of sugars in food, J Liq Chromatogr Relat Technol 34 (2011) 902–919. https://doi.org/10.1080/10826076.2011.571118.

[46] G.E. Morlock, S. Prabha, Analysis and stability of sucralose in a milk-based confection by a simple planar chromatographic method, J Agric Food Chem 55 (2007) 7217–7223. https://doi.org/10.1021/jf071719u.

[47] Kruve A., Lecture at ISC 2024 in Liverpool (2024) https://kruvelab.com/wp-content/uploads/2024/10/Hall1A%E2%80%93Thursday-1040-P6-Anneli-Kruve-1.pdf. Accessed on 30.03.2025.

[48] M. Biedermann, C. Munoz, K. Grob, Update of on-line coupled liquid chromatography - gas chromatography for the analysis of mineral oil hydrocarbons in foods and cosmetics, J Chromatogr A 1521 (2017) 140–149. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.028.

[49] T. Schreiner, D. Sauter, M. Friz, J. Heil, G.E. Morlock, Is Our Natural Food Our Homeostasis? Array of a Thousand Effect-Directed Profiles of 68 Herbs and Spices, Front Pharmacol 12 (2021) 755941. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.755941.

[50] F. Schade, W. Schwack, Y. Demirbas, G.E. Morlock, Open-source all-in-one LabToGo Office Chromatography, Anal Chim Acta 1174 (2021) 338702. https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338702.

[51] G.E. Morlock, W. Schwack, The contribution of planar chromatography to food analysis, J Planar Chromatogr 20 (2007) 399–406. https://doi.org/10.1556/JPC.20.2007.6.2.

[52] G. Morlock, W. Schwack, Planar chromatography - Back to the future?, LC GC EUROPE 21 (2008) 366-371.