

**Entwicklung und Anwendung von
flüssigchromatographischen Analyseverfahren zum
Nachweis von Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP)-
Toxinen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Chemiker Alexander Rühl
geboren am 08. Juni 1971 in Wehrda

Gutachter:

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Luckas
2. Gutachter: Prof. Dr. Hans Bergmann
3. Gutachter: Prof. Dr. Werner Engewald

Tag der mündlichen Prüfung: 23.04.2004

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.06.2004

Inhaltsverzeichnis

0.	Verzeichnisse	IV
0.1.	Abkürzungen	IV
0.2.	Abbildungen	VII
0.3.	Tabellen	X
1.	Einleitung	1
2.	Theoretischer Teil	2
2.1.	Einteilung von Algentoxinen	2
2.2.	<i>Diarrhetic Shellfish Poisoning</i> (DSP)-Toxine	4
2.2.1.	Okadasäure (OA) und Dinophysistoxine (DTXs)	4
2.2.2.	Yessotoxine (YTXs)	7
2.2.3.	Pectenotoxine (PTXs)	8
2.3.	Toxizität von DSP-Toxinen	10
2.3.1.	OA und DTXs	10
2.3.2.	YTXs	12
2.3.3.	PTXs	12
2.4.	Vorkommen von DSP-Toxinen	13
2.5.	Detektionsmöglichkeiten für DSP-Toxine	16
2.5.1.	Biologische Verfahren	16
2.5.2.	Biochemische Verfahren	17
2.5.3.	Physikalisch-chemische Verfahren	20
2.5.3.1.	HPLC-Verfahren	20
2.5.3.2.	Kapillarelektrophorese	28
2.5.4.	Strategien zur Bestimmung von DTX-3	29
2.6.	Gelpermeationschromatographie (GPC)	31
2.7.	Interne Standards zur Bestimmung von OA und DTXs	33
2.8.	Lebensmittelrechtliche Regelungen	36
2.9.	Statistische Prüfverfahren	38

3.	Zielstellungen der Arbeit	40
4.	Entwicklung eines Analyseanges für OA und DTXs	42
4.1.	Massenspektrometrische Detektion von OA und DTXs sowie möglicher interner Standards	42
4.2.	Optimierung der GPC zur Aufreinigung DSP-haltiger Extrakte unter besonderer Berücksichtigung von OA und DTXs	47
4.2.1.	Die stationäre Phase	47
4.2.1.1.	Styrol-Divinyl-Copolymer Säule	47
4.2.1.2.	Agarose-Dextran Säule	49
4.2.2.	Wahl eines internen Standards	51
4.2.3.	Optimierung der mobilen Phase der GPC im Hinblick auf die Wiederfindung der Analyte am Beispiel von OA	53
4.2.3.1.	Überprüfung der OA-Wiederfindung nach Erhöhung der Essigsäurekonzentration der mobilen Phase der GPC	54
4.2.4.	OA-Wiederfindung in auf die GPC folgenden Probenaufarbeitungsschritten	57
4.3.	Extraktion von OA, DTXs und Monensin aus Muschelmateriale	59
4.4.	Bestimmung von OA, DTXs sowie Monensin nach Derivatisierung mit 3-Brommethyl-7-methoxy-1,4-benzoxazin-2-on (BrMB)	62
4.4.1.	Bestimmung der BrMB-Derivate nach HPLC-Trennung und Fluoreszenzdetektion (HPLC/FLD)	62
4.4.2.	Bestimmung der BrMB-Derivate mit Hilfe der LC/MS-Kopplung	64
4.4.3.	Optimierung der Derivatisierungsbedingungen	67
4.5.	Hydrolyse von DTX-3	70
4.5.1.	Etablierung eines Hydrolyseverfahrens für DTX-3 (am Beispiel von 7-O-palmitoyl-OA)	70
4.5.2.	Überprüfung der Stabilität von OA und DTX-1 sowie Monensin während der Hydrolyse	73
4.5.3.	Optimierung der Hydrolyse im Hinblick auf die nachfolgende Derivatisierung mit BrMB	75
4.6.	Überprüfung und Anwendung des Gesamtverfahrens	78
4.6.1.	HPLC/FLD-Bestimmung der BrMB-Derivate bzw. massenspektrometrischer Nachweis der underivatisierten Analyte	78
4.6.1.1.	Überprüfung anhand eines dotierten Muschelmateriale	80
4.6.1.2.	Überprüfung anhand von zertifiziertem Referenzmateriale	84
4.6.1.3.	Anwendung auf natürlich belastetes Muschelmateriale	86
4.6.2.	Überprüfung und Anwendung des Gesamtverfahrens im Hinblick auf die Bestimmung der derivatisierten Toxine mit Hilfe der Kopplung LC/MS	88

5.	Entwicklung einer Analysemethode zum Nachweis von YTX neben OA und DTX-1	90
5.1.	LC/MS-Bestimmung von YTX, OA und DTX-1	90
5.2.	Entwicklung eines GPC-Verfahrens zur Aufreinigung von YTX-, OA- und DTX-1-haltigen Muschelextrakten	93
5.3.	Anwendung des Verfahrens auf natürlich belastetes Muschelmaterial	95
6.	Zusammenfassung	97
7.	Literatur	101
8.	Anhang	117
8.1.	Geräte und Materialien	117
8.2.	Standards und Referenzmaterialien	118
8.3.	Chemikalien / Verbrauchsmaterial	119
8.4.	Chromatographische Bedingungen	120
8.5.	Datentabellen	123

0. Verzeichnisse

0.1. Abkürzungen

ADAM	9-Anthryldiazomethan
AE-OTf	2-(2,3-Anthracendicarboximido)ethyltrifluormethansulfonat
API	atmospheric pressure ionization (engl.); Ionisation unter Atmosphärendruck
APCI	atmospheric pressure chemical ionization (engl.); chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck
ATX	Adriatoxin
AZA	Azaspirosäure
AZAs	Azaspirosäuren
AZA-1	Azaspirosäure-1
AZA-2	Azaspirosäure-2
AZA-3	Azaspirosäure-3
BrMB	3-Brommethyl-7-methoxy-1,4-benzoxazin-2-on
BrMMC	4-Brommethyl-7-methoxycumarin
Carboxy-YTX	Carboxy-Yessotoxin
Carboxy-YTXs	Carboxy-Yessotoxine
Carboxyhomo-YTX	Carboxyhomo-Yessotoxin
1-desulfo-YTX	1-Desulfo-Yessotoxin
DMEQ-TAD	4-[2-(6,7-Dimethoxy-4-methyl-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaliny)ethyl]-1,2,4-triazolin-3,5-dion
DTXs	Dinophysistoxine
DTX-1	Dinophysistoxin-1
DTX-2	Dinophysistoxin-2
DTX-3	Dinophysistoxin-3
usw.	usw.
DTX-1-BrMB-Ester	BrMB-Derivat von DTX-1
DSP	diarrhetic shellfish poisoning (engl.); durch Algentoxine hervorgerufene Vergiftung mit Diarrhö als Hauptsymptom
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (engl.); Enzymimmunoassay
ESI	electrospray ionization (engl.); Elektrospray-Ionisierung
FischHV	Fischhygieneverordnung
Ger.-Gl.	Geradengleichung
GPC	Gelpermeationschromatographie
HAB	harmful algal bloom (engl.); schädliche Algenblüte

homo-YTX	Homoyessotoxin
HPLC	high performance liquid chromatography (engl.); Hochleistungsflüssigchromatographie
HPLC/FLD	HPLC gekoppelt mit Fluoreszenzdetektion
Korrel.-K.	Korrelationskoeffizient
K ₂ CO ₃	Kaliumcarbonat
LC	liquid chromatography (engl.); Flüssigchromatographie
LC/MS	Kopplung Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
LD ₅₀	Letale Dosis 50
35-Methyl-OA	35-Methyl-Okadasäure, Dinophysistoxin-1
MID	multiple ion detection (engl.) gleichzeitige Überwachung mehrerer bestimmter m/z-Verhältnisse (Massenspuren)
Monensin-BrMB- Ester	BrMB-Derivat des Monensin
MS	mass spectrometer (engl.); Massenspektrometer / mass spectrometry (engl.); Massenspektrometrie
MS-MS	gekoppelte Massenspektrometrie
MW	molecular weight (engl.); Molekulargewicht
MWs	molecular weights (engl.); Molekulargewichte
m/z	Masse – zu – Ladungs-Verhältnis
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
n.n.	nicht nachweisbar
OA	okadaic acid (engl.); Okadasäure
OA-BrMB-Ester	BRMB-Derivat von OA
7-O-acetyl-OA	7-O-Acetyl Okadasäure
7-O-acyl-OA	7-O-Acyl Okadasäure
OA-D7a	Okadasäure Diolester-7a
OA-D7b	Okadasäure Diolester-7b
usw.	usw.
OA-tetraacetat	Okadasäure-Tetraacetat
o.c.	[Menge] on column (engl.); auf die Säule gebrachte Menge
45-OH-YTX	45-Hydroxy-Yessotoxin
45-OH-homo-YTX	45-Hydroxy-Homoyessotoxin
7-O-palmitoyl- DTX-1	7-O-Palmitoyl Dinophysistoxin-1
7-O-palmitoyl-OA	7-O-Palmitoyl Okadasäure
7-O-palmitoyl-OA- BrMB-Ester	BrMB-Derivat der 7-O-Palmitoyl-OA
PP1	Protein Phosphatase 1
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PTXs	Pectenotoxine
PTX-1	Pectenotoxin-1
PTX-2	Pectenotoxin-2
usw.	usw.

PTX-2SA 7- <i>epi</i> -PTX-2SA	pectenotoxin-2 seco acid (engl.); Pectenotoxin-2 Secosäure 7- <i>epi</i> -pectenotoxin-2 seco acid (engl.); 7- <i>epi</i> -Pectenotoxin-2 Secosäure
SD SDs SIM	standard deviation (engl.); Standardabweichung standard deviations (engl.); Standardabweichungen single ion monitoring (engl.); Überwachung eines bestimmten m/z-Verhältnisses (Massenspuren)
TBME TIC TICs TEAC 45,46,47-trinor- YTX trinor-YTX	<i>tertiär</i> -Butyl-Methyl-Ether total ion chromatogram (engl.); Totalionenstromchromatogramm total ion chromatograms (engl.); Totalionenstromchromatogramme Tetraethylammoniumcarbonat 45,46,47-Trinor-Yessotoxin Trinor-Yessotoxin
v : v VK	[bei Mischungen:] Volumen : Volumen Variationskoeffizient
WF	Wiederfindung
YTX YTXs	Yessotoxin Yessotoxine
*	signifikant (95 % Signifikanzniveau)
**	sehr signifikant (99 % Signifikanzniveau)
***	hochsignifikant (99,9 % Signifikanzniveau)

0.2. Abbildungen

	Seite
Abb. 2.1: Strukturen von OA und DTXs [Quilliam et al., 2003; Suárez-Gómez et al., 2001]	5
Abb. 2.2: Strukturen von YTXs und ATX [Quilliam, 2003; Draisci et al., 2000]	8
Abb. 2.3: Strukturen von PTXs [Quilliam, 2003]	9
Abb. 2.4: Verbreitung von YTXs, PTXs sowie Cooliatoxin [Draisci et al., 2000]	14
Abb. 2.5: Prinzip der Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Proteinen	18
Abb. 2.6: Reaktion von ADAM mit Carbonsäuren	22
Abb. 2.7: Reaktion von AE-OTf mit Carbonsäuren	22
Abb. 2.8: Reaktion von BrMMC mit Carbonsäuren	23
Abb. 2.9: Derivatisierung von Carbonsäuren mit BrMB	23
Abb. 2.10: Reaktion von YTX mit DMEQ-TAD [Yasumoto & Takizawa, 1997]	24
Abb. 2.11: Funktionsweise eines Elektrospray-Einlasssystems [Sciex (ed), 1990]	26
Abb. 2.12: Strukturen von: a) 7-O-Acetyl-OA b) Desoxycholsäure	34
Abb. 2.13: Strukturen von: a) OA-tetraacetat b) 1-nor-Okadaon	34
Abb. 2.14: Struktur von Monensin	35
Abb. 4.1: Totalionenstromchromatogramm (TIC) einer Standardmischung aus je 2 ng OA, DTX-1, Monensin und 7-O-palmitoyl-OA nach Trennung mit Hilfe einer C-8-Säule (Phenomenex Hypersil 3 μ C8 BDS 50 x 2,00 mm 3 micron)	44
Abb. 4.2: TIC einer Mischung aus je 3,3 ng o.c. OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA sowie 20 ng o.c. Monensin auf einer C-4-Säule (Phenomenex Jupiter 5 μ micron C4, 300 \AA 4,6 x 50 mm)	46
Abb. 4.3: Massenspektren für die Ionen a) $m/z = 803,4$ [OA - H] ⁻ , b) $m/z = 817,4$ [DTX-1 - H] ⁻ , sowie c) $m/z = 1042,1$ [7-O-palmitoyl-OA - H] ⁻ bei Kopplung der Styrol-Divinyl-Copolymer Säule mit dem Massenspektrometer (Flussrate: 1,4 mL min ⁻¹)	48

- Abb. 4.4: Single ion current chromatograms für die Ionen a) $m/z = 803,4$ [OA - H]⁻, b) $m/z = 817,4$ [DTX-1 - H]⁻, sowie c) $m/z = 1042,1$ [7-O-palmitoyl-OA - H]⁻ bei Kopplung der Agarose-Dextran Säule mit dem Massenspektrometer (Flussrate: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$) 50
- Abb. 4.5: Massenspur für das Ion $m/z = 391,5$ [M - H]⁻ (M = Desoxycholsäure) bei Kopplung von Agarose-Dextran Säule und Massenspektrometer (Flussrate: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$) 52
- Abb. 4.6: Massenspur für das Ion $m/z = 669,7$ [M - H]⁻ (M = Monensin) bei Kopplung der Agarose-Dextran Säule mit dem Massenspektrometer (Flussrate: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$) 52
- Abb. 4.7: OA-Wiederfindung der verschiedenen Eluatfraktionen bei Anwendung der GPC auf je 400 ng OA enthaltende Muschelextrakte 56
- Abb. 4.8: Fluoreszenzchromatogramme nach Trennung der BrMB- Derivate a) eines Reagenzienblindwertes bzw. b) einer Standardmischung bestehend aus je 2,5 ng o.c. OA bzw. DTX-1, 7,5 ng o.c. Monensin und 15 ng o.c. 7-O-palmitoyl-OA 63
- Abb. 4.9: LC/MS-TIC einer Reaktionslösung mit je 20 ng o.c. OA, DTX-1 bzw. 7-O-palmitoyl-OA sowie 2 ng o.c. Monensin als BrMB Derivate 66
- Abb. 4.10: Peakflächen von a) OA bzw. b) DTX-1 als BrMB-Derivate in Abhängigkeit von der Standzeit bei Verwendung unterschiedlicher Basen zur Derivatisierung 67
- Abb. 4.11: Methodik zur Bestimmung von OA und DTXs 79
- Abb. 4.12: HPLC/FLD Chromatogramme der Derivate der a) unhydrolysierten bzw. b) hydrolysierten dotierten Muschelprobe 81
- Abb. 4.13: Überprüfung des Gesamtverfahrens mit dotiertem Muschelmaterial: Wiederfindung für a) OA, b) DTX-1, c) 7-O-palmitoyl-OA und d) Monensin als BrMB-Derivate nach Fluoreszenzdetektion bzw. underivatisiert mit massenspektrometrischer Detektion 82
- Abb. 4.14: Überprüfung des Gesamtverfahrens mit zertifiziertem Referenzmaterial MUS-2: Wiederfindung für OA, DTX-1 und Monensin nach a) HPLC/FLD-Bestimmung der BrMB-Derivate bzw. b) massenspektrometrischer Detektion der underivatisierten Analyten 85
- Abb. 4.15: Anwendung des Gesamtverfahrens auf natürlich belastetes Muschelmaterial: a) OA-Gehalt und b) Monensin-Wiederfindung nach HPLC/FLD-Bestimmung der BrMB-Derivate bzw. nach massenspektrometrischer Detektion der underivatisierten Analyten 86
- Abb. 4.16 LC/MS-TIC der BrMB-Derivate der natürlich belasteten Muschelprobe a) ohne bzw. b) mit Hydrolyse 89

Abb. 5.1: TIC sowie Massenspuren für b) $m/z = 803,4$, c) $m/z = 817,4$, d) $m/z = 1141,9$, e) $m/z = 1163,9$ (LC/MS-Bestimmung von YTX, OA und DTX-1) 92

Abb. 5.2: a) TIC sowie Massenspuren von b) $m/z = 803,4$, c) $m/z = 817,4$ d) $m/z = 1141,9$ e) $m/z = 1163,9$ von je 50 ng OA, DTX-1 und YTX bei Kopplung der GPC mit dem Massenspektrometer 94

0.3. Tabellen

	Seite
Tab. 2.1: Übersicht über die wichtigsten Algentoxinvergiftungen [Bürk et al., 1998; Hallegraeff, 1993; Hallegraeff, 2003]	2
Tab. 2.2: Akute Toxizitäten (LD ₅₀) von DSP-Toxinen nach intraperitonealer Injektion in Mäuse	11
Tab. 2.3: Nachweislich toxinproduzierende Dinoflagellaten [Wright & Cembella, 1998; Draisci et al., 2000]	15
Tab. 4.1: Ionen und zugehörige m/z-Werte für die massenspektrometrische Detektion von OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA, Monensin und Desoxycholsäure sowie deren Molekulargewichte (MW)	42
Tab. 4.2: Gradient für die Trennung von OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin auf einer C-8-Säule (Phenomenex Hypersil 3 µ C8 BDS 50 x 2,00 mm 3 micron)	43
Tab. 4.3: Kenndaten für die Trennung von OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin mit einer C-8-Säule (Phenomenex Hypersil 3 µ C8 BDS 50 x 2,00 mm 3 micron)	44
Tab. 4.4: Gradient für die LC/MS-Bestimmung von OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin auf einer C-4-Säule (Phenomenex Jupiter 5µ micron C4, 300Å 4,6 x 50 mm)	45
Tab. 4.5: Kenndaten für die LC/MS Detektion von OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin (Säule: Phenomenex Jupiter 5µ micron C4, 300Å 4,6 x 50 mm)	46
Tab. 4.6: Gradient für die HPLC/FLD-Bestimmung der BrMB-Derivate von OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin	62
Tab. 4.7: Kenndaten für die HPLC/FLD Detektion von OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin als BrMB-Derivate	64
Tab. 4.8: Ionen und zugehörige m/z-Werte für die massenspektrometrische Detektion der BrMB-Derivate von OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin sowie deren MWs	65
Tab. 4.9: Kenndaten für die LC/MS Detektion von OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin als BrMB-Derivate	66

Tab. 5.1:	Gradient der Trennung von OA, DTX-1 sowie YTX auf einer C-4-Umkehrphase (Phenomenex Jupiter 5 μ micron C4, 300 \AA 4,6 x 50 mm)	90
Tab. 5.2:	Ionen und zugehörige m/z-Werte für die massenspektrometrische-Detektion von OA, DTX-1 und YTX sowie deren MWs	90
Tab. 5.3:	Detektionslimits und Bestimmungsgrenzen für die LC/MS-Bestimmung von OA, DTX-1 und YTX	91
Tabellen im Anhang (Kapitel 8.6):		
Tab. 8.1:	OA-Wiederfindung in der Hauptfraktion nach Aufreinigung von mit 40 ng OA dotierter Muschelmatrix mittels GPC	123
Tab. 8.2:	OA-Wiederfindung in der Hauptfraktion nach GPC bei Aufgabe von 400 ng OA ohne Muschelmatrix	123
Tab. 8.3:	OA-Wiederfindung nach GPC bei Aufgabe von 400 ng OA mit Muschelmatrix	124
Tab. 8.4:	OA-Wiederfindung nach GPC bei Aufgabe von 20 ng OA ohne bzw. mit Muschelmatrix	126
Tab. 8.5:	Wiederfindung beim Einengen OA-haltiger Lösungen mit Zugabe von GPC-Eluent	127
Tab. 8.6:	Wiederfindung beim Einengen OA-haltiger Lösungen ohne Zugabe von GPC-Eluent	128
Tab. 8.7:	OA-Wiederfindung nach Einengen (Vergleichsbestimmung für Experimente mit Aufnahme in Aceton)	129
Tab. 8.8:	OA-Wiederfindung nach Einengen und Wiederaufnahme in Aceton	130
Tab. 8.9:	Wiederfindung für OA nach Extraktion aus dotiertem Muschelhepatopankreas	131
Tab. 8.10:	Wiederfindung für DTX-1 nach Extraktion aus dotiertem Muschelhepatopankreas	132
Tab. 8.11:	Wiederfindung für 7-O-palmitoyl-OA nach Extraktion aus dotiertem Muschelhepatopankreas	133
Tab. 8.12:	Wiederfindung für Monensin nach Extraktion aus dotiertem Muschelhepatopankreas	134

Tab. 8.13a:	Peakflächen der BrMB-Derivate von OA bzw. DTX-1 in Abhängigkeit von der Standzeit bei Verwendung unterschiedlicher Basen zur Derivatisierung (Peakflächen bei Verwendung von Hünig-Base/Triethylamin-Mischung gleich 100 % gesetzt)	135
Tab. 8.13b:	Peakflächen der BrMB-Derivate von OA bzw. DTX-1 in Abhängigkeit von der Standzeit bei Verwendung unterschiedlicher Basen zur Derivatisierung (Peakflächen bei t = 0 min gleich 100 % gesetzt)	135
Tab. 8.14:	OA-Wiederfindung nach Zugabe von Methanol während des Einengens	136
Tab. 8.15a:	OA-Wiederfindung nach Hydrolyse von 7-O-palmitoyl-OA	137
Tab. 8.15b:	OA-Wiederfindung nach Hydrolyse von OA (zu Vergleichszwecken)	137
Tab. 8.16:	OA-Wiederfindung im auf die Hydrolyse folgenden Extraktionsschritt	138
Tab. 8.17:	OA-Wiederfindung nach Vergrößerung des Extraktionsmittel- und zu extrahierenden Volumens	139
Tab. 8.18:	OA-Wiederfindung bei Verwendung von CH ₂ Cl ₂ als Extraktionsmittel	139
Tab. 8.19:	Wiederfindung für OA, DTX-1 und Monensin bei Einbeziehung („mit Hydrolyse“) bzw. Nichteinbeziehung („ohne Hydrolyse“) der Hydrolyse	140
Tab. 8.20:	OA-Wiederfindung nach Hydrolyse und Neutralisation durch K ₂ CO ₃	142
Tab. 8.21:	OA-Wiederfindung in dem mit OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin dotierten Muschelmaterial (Gesamtmethodik); HPLC/FLD-Bestimmung als BrMB-Derivat	143
Tab. 8.22:	OA-Wiederfindung in dem mit OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin dotierten Muschelmaterial (Gesamtmethodik); Bestimmung underivatisiert mittels LC/MS	144
Tab. 8.23:	DTX-1-Wiederfindung in dem mit OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin dotierten Muschelmaterial (Gesamtmethodik); HPLC/FLD-Bestimmung als BrMB-Derivat	145
Tab. 8.24:	DTX-1-Wiederfindung in dem mit OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin dotierten Muschelmaterial (Gesamtmethodik); Bestimmung underivatisiert per LC/MS	146
Tab. 8.25:	7-O-palmitoyl-OA-Wiederfindung in dem mit OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin dotierten Muschelmaterial (Gesamtmethodik); HPLC/FLD-Bestimmung als BrMB-Derivat bzw. underivatisiert per LC/MS	147

Tab. 8.26:	Monensin -Wiederfindung in dem mit OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin dotierten Muschelmaterial (Gesamtmethodik); HPLC/FLD-Bestimmung als BrMB-Derivat bzw. underivatisiert mittels LC/MS	148
Tab. 8.27:	OA-Wiederfindung im zertifizierten Referenzmaterial MUS-2 (Gesamtmethodik); HPLC/FLD-Bestimmung als BrMB-Derivat bzw. underivatisiert mittels LC/MS	149
Tab. 8.28:	DTX-1-Wiederfindung im zertifizierten Referenzmaterial MUS-2 (Gesamtmethodik); HPLC/FLD-Bestimmung als BrMB-Derivat bzw. underivatisiert per LC/MS	150
Tab. 8.29:	Monensin-Wiederfindung im zertifizierten Referenzmaterial MUS-2 (Gesamtmethodik); HPLC/FLD-Bestimmung als BrMB-Derivat bzw. underivatisiert per LC/MS	151
Tab. 8.30:	OA-Wiederfindung im natürlich belasteten Muschelmaterial (Gesamtmethodik); HPLC/FLD-Bestimmung als BrMB-Derivat	152
Tab. 8.31:	OA-Wiederfindung im natürlich belasteten Muschelmaterial (Gesamtmethodik); Bestimmung underivatisiert per LC/MS	153
Tab. 8.32:	Monensin-Wiederfindung im natürlich belasteten Muschelmaterial (Gesamtmethodik); HPLC/FLD-Bestimmung als BrMB-Derivat bzw. underivatisiert per LC/MS	154
Tab. 8.33:	Wiederfindung von YTX, OA und DTX-1 nach Evaporation ihrer Lösung in Methanol : 10 mM Ammoniumacetat (13 : 7; v : v)	155
Tab. 8.34:	Wiederfindung von YTX, OA und DTX-1 bei Anwendung der GPC mit Methanol : 10 mM $\text{NH}_4^+\text{H}_3\text{CCOO}^-$ (13 : 7; v : v)	156
Tab. 8.35:	Wiederfindung nach Anwendung der GPC auf mit YTX, OA und DTX-1 dotierten Muschelextrakt	157
Tab. 8.36:	YTX-Gehalte des natürlich kontaminierten Muschelhepatopankreas	158
Tab. 8.37:	OA-Gehalte des natürlich kontaminierten Muschelhepatopankreas	159
Tab. 8.38:	DTX-1-Gehalte des natürlich kontaminierten Muschelhepatopankreas	160

1. Einleitung

Algenmassenvermehrungen (sog. Algenblüten) sind ein seit langem bekanntes Problem. So wird bereits in der Bibel (Exodus 7: 20-21) berichtet: „Alle Wasser des Flusses wurden zu Blut. Und die Fische im Fluss starben; und das Wasser stank, und die Ägypter konnten das Wasser des Flusses nicht trinken...“.

Aus dem Jahre 1793 sind Todesfälle infolge einer Algenblüte (Harmful Algal Bloom [HAB]) überliefert. Als George Vancouver mit seiner Mannschaft in British Columbia landete, starben einige Seeleute nach dem Verzehr von Muscheln.

Rudolf Virchow berichtete im Jahre 1895 in der Berliner Medizinischen Wochenschrift über „Die Vergiftung durch Miesmuscheln in Wilhelmshaven“ [Virchow, 1895]. Seitdem sind die Aufmerksamkeit und Forschungstätigkeit bezüglich dieser Problematik bis heute deutlich gestiegen.

Zwar sind die meisten Algenspezies ungiftig; werden aber toxinproduzierende Spezies von Organismen eines höheren trophischen Niveaus gefressen, so können die Toxine bis ans Ende der Nahrungskette, also bis zum Menschen, gelangen. Ist das der Fall, stellt dies hohe Anforderungen an die Lebensmittelüberwachung, um die menschliche Gesundheit vor den möglichen Gefahren, die durch den Verzehr solcher durch Biotoxine belasteten Lebensmittel entstehen können, zu bewahren [Balmer-Hanchey et al., 2003].

Diese Aufgabe ist umso wichtiger, weil - insbesondere vor dem Hintergrund der weiter wachsenden Weltbevölkerung- die Bedeutung von Seafood für die menschliche Ernährung steigt. Damit eng verknüpft sind ökonomische Interessen, besonders bei der oftmals mit Aquakulturen einhergehenden Käfighaltung von Fischen, die ebenfalls von HAB-Ereignissen betroffen sein können.

2. Theoretischer Teil

2.1. Einteilung von Algentoxinen

Die bisher beobachteten Algentoxine sind z.T. verschiedenen biologischen Ursprungs. Sie unterscheiden sich in ihren chemischen Strukturen und ihren Wirkungen auf den (menschlichen) Organismus. Daher lag es nahe, dass die klassische Einteilung der verschiedenen Algentoxinvergiftungen (siehe Tabelle 2.1) nach den beim Menschen ausgelösten Intoxikationssymptomen erfolgte.

Tab. 2.1: Übersicht über die wichtigsten Algentoxinvergiftungen [Bürk et al., 1998; Hallegraeff, 1993; Hallegraeff, 2003]

	Amnesic shellfish poisoning	Diarrhetic shellfish poisoning	Neurotoxic shellfish poisoning	Paralytic shellfish poisoning	Ciguatera shellfish poisoning
Abkürzung	ASP	DSP	NSP	PSP	CFP
Symptome	Gedächtnisverlust, Erbrechen, Durchfall	Durchfall, Übelkeit, Erbrechen	Parästhesien, Erbrechen, Durchfall	Taubheit in Gesicht und Extremitäten, Parästhesien, schlaffe Lähmungen, evtl Tod durch Atemlähmung	Gefühlstauheit in Extremitäten, Parästhesien, Umkehr der Heiß-/Kalt-Wahrnehmung, Erbrechen, Muskelschmerz
Toxine	Domainsäure und -derivate	Okadasäure (OA) u. Dinophysistoxine (DTXs), Yessotoxine (YTXs), Pectenotoxine (PTXs)	Brevetoxine	Saxitoxin u. Derivate	Ciguatoxin, Maitotoxin
chem. Grundstruktur	Aminosäurederivat	Polyether	Polyether	Purinderivate	Polyether
Wirkprinzip	Glutamat-Rezeptor - Agonist	Hemmung von Proteinphosphatasen	Aktivierung von Na ⁺ - Ionenkanälen	Blockade von Na ⁺ - Ionenkanälen	Aktivierung von Na ⁺ - bzw. Ca ²⁺ - Ionenkanälen
Toxinproduzenten (Auswahl)	<i>Pseudonitzschia spp.</i>	<i>Dinophysis spp.</i> , <i>Prorocentrum lima</i>	<i>Karenia (Gymnodinium) spp.</i>	<i>Alexandrium spp.</i> , <i>Gymnodinium spp.</i> , <i>Pyrodinium spp.</i>	<i>Gambierdiscus toxicus</i>

Diese Einteilung ist bis heute die gebräuchlichste, wenn auch durch die in den letzten Jahren zunehmende Zahl von neu entdeckten Algentoxinen [Quilliam, 1999] die exakte

Eingruppierung ihrer Vergiftungserscheinungen in die bestehenden Kategorien nicht immer eindeutig möglich ist. So wurden z.B. Yessotoxine (YTXs) und Pectenotoxine (PTXs) nach ihrem Auftreten den Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP)-Toxinen zugerechnet, weil sie oftmals zusammen mit Okadasäure (OA) und den Dinophysistoxinen (DTXs) vorkommen, ebenfalls lipophil sind und wie OA und DTXs im Maus-Bioassay nach intraperitonealer Injektion nachweisbar sind. Nachdem ihre Wirkmechanismen näher untersucht worden waren, stellte man fest, dass es sich bei YTXs nicht um diarrhöisch wirkende Substanzen handelt und demzufolge ihre Einteilung bei den DSP Toxinen nicht mehr gerechtfertigt erschien [Quilliam, 2003].

Um Verwechslungen auszuschließen, wird im Rahmen dieser Arbeit, wenn ausschließlich OA bzw. DTXs gemeint sind, explizit von diesen gesprochen oder sie werden zusammenfassend als „Toxine der OA-Gruppe“ bezeichnet.

Im übrigen beginnt sich heute der Oberbegriff „lipophile Toxine“ als Sammelbezeichnung für OA, DTXs, YTXs, PTXs und einige weitere Polyethertoxine, die im Folgenden kurz vorgestellt werden, zu etablieren [Quilliam, 2003].

Dazu zählen z.B. die Azaspirosäuren (AZAs), die für das Vergiftungssyndrom Azaspiracid-Poisoning verantwortlich sind [McMahon & Silke, 1996; Satake et al. 1998a; Brana-Magdalena et al. 2003] und von *Protoperidinium crassipes* produziert werden [James et al., 2003]. Bei der Struktur handelt es sich um einen Spiro-Polyether mit Carboxylgruppe [Satake et al., 1998b].

Eine weitere Gruppe von lipophilen Toxinen stellen Spirolide [Hu et al., 1995a; Cembella et al. 2000] dar. Die makrocyclischen Polyether mit Spiro-Strukturen, welche eine cyclische Imminium-Funktion enthalten, bewirken neurotoxische Effekte [Hu et al., 1996]. Mit der Imminiumfunktion sowie den spiro-artig verbundenen Etherringen erinnern sie zudem an Pinnatoxine [Chou et al., 1994] sowie Gymnodimin [Seki et al., 1995].

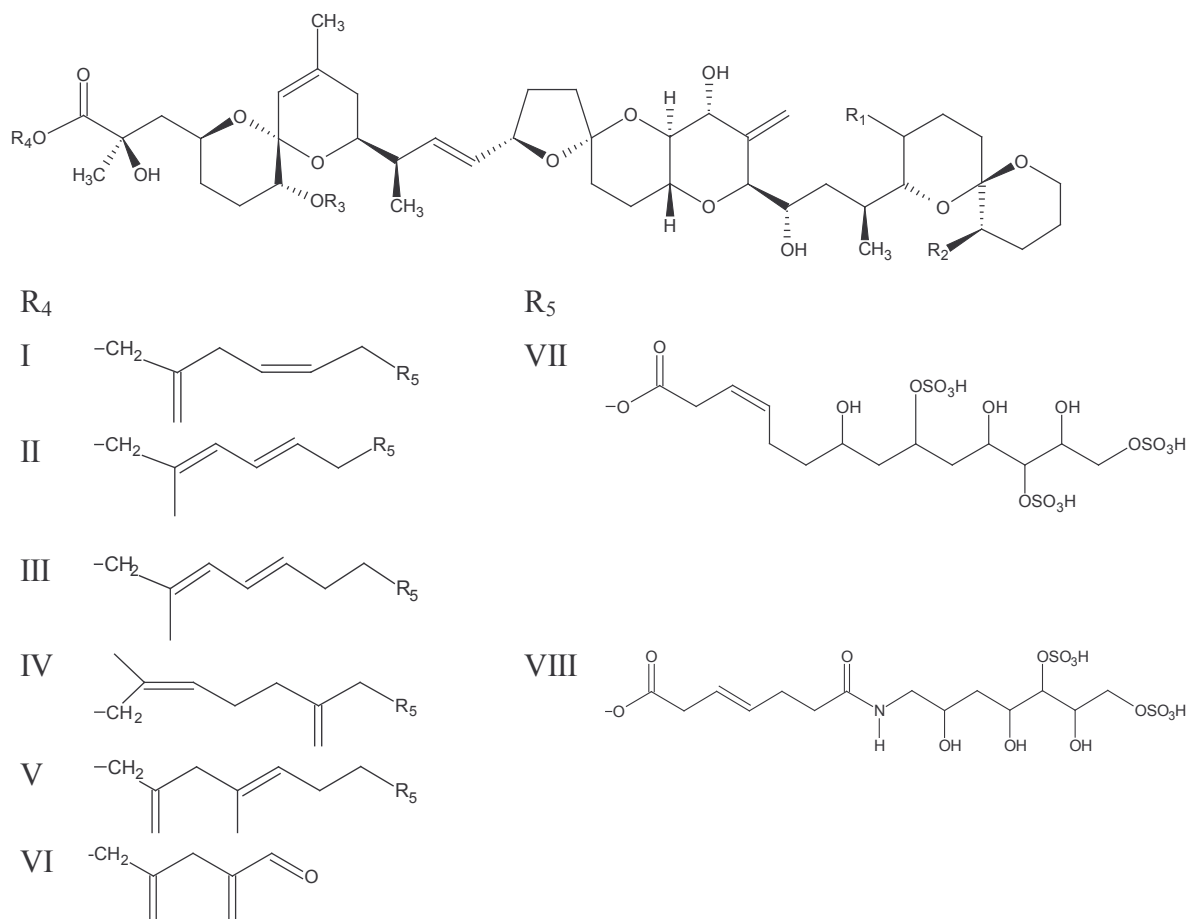
2.2. *Diarrhetic Shellfish Poisoning* (DSP)-Toxine

Gemeinsame Hauptmerkmale der DSP Toxine sind ihre Polyetherstruktur sowie ihre lipophile Natur, so dass sie bei der Extraktion aus Seafood oft gemeinsam erfasst werden. Die DSP Toxine ergeben im Maus-Bioassay nach intraperitonealer Injektion in Mäuse toxische Effekte. Sie lassen sich nach ihren Grundstrukturen in drei Gruppen einteilen: 1. OA und DTXs, 2. YTXs und 3. PTXs.

2.2.1. Okadasäure (OA) und Dinophysistoxine (DTXs)

Im Jahr 1976 erkrankten in Japan 42 Personen an einer Vergiftung, in deren Verlauf starke Diarrhö neben Übelkeit, Erbrechen und starken Schmerzen auftraten [Yasumoto et al., 1978]. Da pathogene Mikroorganismen als potentielle Verursacher ausgeschlossen werden konnten, benannte man die neue Erkrankung entsprechend dem Hauptsymptom DSP. Der Dinoflagellat *Dinophysis fortii* konnte als Toxinproduzent identifiziert werden [Yasumoto et al., 1980]. In den Niederlanden wurde ebenfalls ein Vergiftungsfall mit unbekannter Ursache und ähnlichen Symptomen bekannt [Kat, 1979]. Die Isolierung und Strukturaufklärung des in Japan verantwortlichen Toxins gelang im Jahre 1982; es wurde als 35-Methyl-OA identifiziert und erhielt den Namen DTX-1 [Murata et al., 1982]. Ein Jahr zuvor war aus den marinen Schwämmen *Halichondria okadai* und *H. melandocia* ein Toxin isoliert und seinem Ursprung entsprechend OA genannt worden (vgl. Abbildung 2.1) [Tachibana et al., 1981]. Ein Strukturisomeres der OA, DTX-2 wurde erstmals 1992 aus irischen Muscheln isoliert [Hu et al., 1992a].

Alle drei langkettigen Substanzen bestehen jeweils aus Polyetherringen mit einer α -ständigen Hydroxylfunktion zur endständigen Carboxylgruppe, die sich im Vorhandensein von Methylgruppen an C-31 bzw. C-35 unterscheiden. Sie sind gut in organischen Lösungsmitteln wie Methanol, Aceton, Chloroform, Dichlormethan und Dimethylsulfoxid löslich, weisen keine Chromophore und nur schwache UV-Absorption um 220 nm auf [Quilliam, 2003].



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
OA	CH ₃	H	H	H	--
DTX-1	CH ₃	CH ₃	H	H	--
DTX-2	H	CH ₃	H	H	--
DTX-3	H oder CH ₃	H oder CH ₃	Acyl	H	--
OA-D7a	CH ₃	H	H	I	OH
OA-D7b	CH ₃	H	H	II	OH
OA-D8	CH ₃	H	H	III	OH
OA-D9a	CH ₃	H	H	IV	OH
OA-D9b	CH ₃	H	H	V	OH
DTX-4	CH ₃	H	H	III	VII
DTX-5a	CH ₃	H	H	II	VIII
DTX-5b	CH ₃	H	H	III	VIII
DTX-6	CH ₃	H	H	VI	--

Abb. 2.1: Strukturen von OA und DTXs [Quilliam et al., 2003; Suárez-Gómez et al., 2001]

Die Bezeichnung DTX-3 stand für Substanzen, bei denen jeweils eine gesättigte oder ungesättigte Fettsäure mit einer Kettenlänge zwischen 14 und 22 C-Atomen mit DTX-1 über dessen Hydroxylgruppe am C-7-Atom verestert ist [Yasumoto et al., 1985]. Später stellte sich heraus, dass auch OA und DTX-2 (hier „Muttertoxine“ genannt) auf diese Weise verestert werden können. Deshalb wurde der Terminus DTX-3 um die 7-O-Acylester von OA und DTX-2 erweitert [Marr et al., 1992]. Allen DTX-3-Vertretern ist gemeinsam, dass es sich dabei nicht um *de novo* Produkte von toxinproduzierendem Phytoplankton, sondern um von Meeresfrüchten produzierte Metabolite handelt, denn in der Kammuschel *Patinopecten yessoensis* konnte nach Fütterungsversuchen mit DTX-1 haltigen *Dinophysis fortii* 7-O-palmitoyl-DTX-1, der 7-O-Ester aus DTX-1 und Palmitinsäure, nachgewiesen werden [Suzuki et al., 1999].

Bei den OA-Diolesteren ist die Carboxylgruppe der OA mit einem ungesättigten Diol, bestehend aus 7 bis 9 C-Atomen, verestert. Ihre Benennung erfolgt nach dem Schema OA-D#x, wobei # die Anzahl der C-Atome in der Diol-Seitenkette und x das spezifische Isomer darstellen. Sie wurden in Kulturen von *Prorocentrum lima* und *P. maculosum* gefunden [Yasumoto et al., 1987; Hu et al., 1992b].

Dieselben Spezies produzieren einige wasserlösliche OA-Derivate, in denen die Diolester-Seitenketten länger sind und polare Gruppen, wie Sulfat- bzw. Hydroxylgruppen, tragen [Yasumoto et al., 1987; Hu et al., 1992b]. Diese Substanzen werden als DTX-4, DTX-5a bzw. -b bezeichnet, wobei letztere zusätzlich über eine Amidfunktion verfügen [Hu et al., 1995b; Hu et al., 1995c]. Zwischenzeitlich wurden weitere Analoga dieser Toxine entdeckt [Quilliam et al., 1996]. Alle können leicht chemisch oder enzymatisch zu OA bzw. dem betreffenden Muttertoxin gespalten werden und sind bisher nicht in Schalentieren gefunden worden [Quilliam, 2003].

Diolester sind ebenfalls nicht sehr stabil; ihre Esterbindungen in der Seitenkette werden durch Esterasen, die im Phytoplankton vorhanden sind und bei mechanischer Beanspruchung der Zellen leicht freigesetzt werden, gespalten. Sie entstehen auf diese Weise aus DTX-4 bzw. DTX-5 und stellen Artefakte der Probenaufarbeitung dar. Der Abbauschritt von DTX-4 bzw. DTX-5 zum Diolester geht sehr viel schneller vonstatten als derjenige vom Diolester zum Muttertoxin, so dass oft nur noch die Diolester nachweisbar sind.

In DTX-6 ist OA über die Carboxylgruppe mit einem ungesättigten Aldehyd mit 7 C- Atomen verestert [Suárez-Gómez et al., 2001].

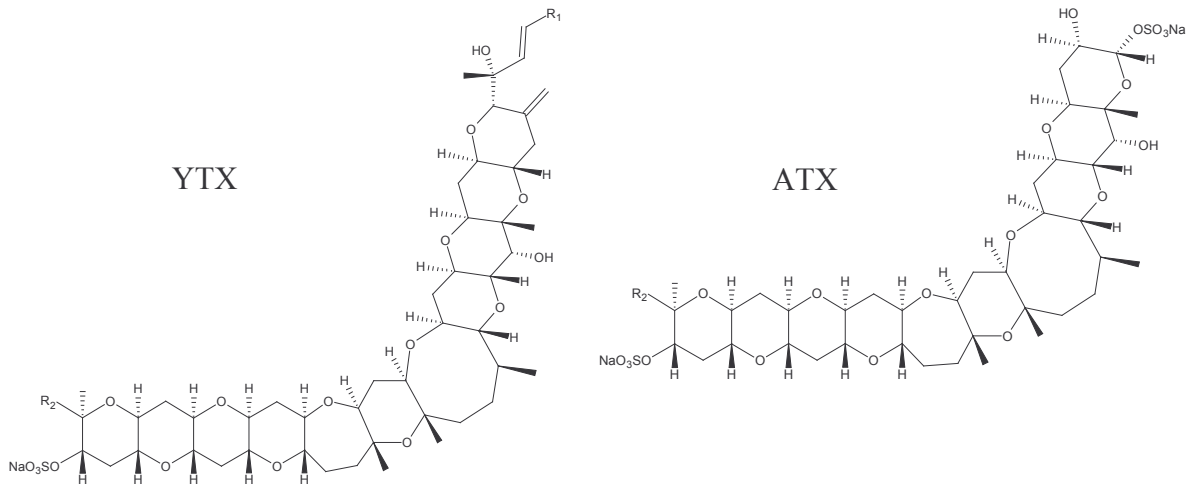
Da DTX-3 und die Diolester aufgrund der unpolaren Seitenketten eine größere Lipophilie aufweisen als die entsprechenden Muttertoxine, können sie bei der Flüssig-flüssig-Aufreinigung mit Hexan in die organische Phase übertreten und für den weiteren Analysegang verlorengehen, wenn die Hexanphase nicht weiter untersucht wird. Diolester und DTX-3-Vertreter können neben dem manchmal problematischen Nachweis als intakte Ester auch durch Hydrolyse in die jeweiligen Muttertoxine überführt und letztere bestimmt werden [Vale & Sampayo, 1999].

2.2.2. Yessotoxine (YTXs)

Yessotoxin (YTX) wurde zuerst in Japan zusammen mit DTX-1 und DTX-3 aus der namensgebenden Kammuschel *Patinopecten yessoensis* isoliert [Murata et al., 1987]; ein Umstand, der zunächst zu seiner Einordnung in die Familie der DSP-Toxine führte. Sein Produzent ist der Dinoflagellat *Prorocentrum reticulatum* [Satake et al., 1997a]. Die leiterartige Struktur des YTX-Grundkörpers [Takahashi, et al., 1996] ist in den später entdeckten Derivaten ebenfalls enthalten; sie unterscheiden sich durch ihre Seitenketten (vgl. Abbildung 2.2).

Homoyessotoxin (homo-YTX) [Tubaro et al., 1998] kann ebenso wie YTX zum jeweiligen 45-Hydroxy-Derivat oxidiert werden [Satake et al., 1997b]. Weitere YTXs-Vertreter sind 1-desulfo-Yessotoxin (1-desulfo-YTX) [Daiguji et al., 1998a], Carboxy-Derivate von YTX und homo-YTX [Ciminiello et al., 2000a; Ciminiello et al., 2000b] sowie 45,46,47-trinor-Yessotoxin (45,46,47-trinor-YTX).

Adriatoxin (ATX) besitzt im Vergleich zu YTX einen verkürzten Grundkörper [Ciminiello, 1998]. Alle genannten YTXs, außer ATX sowie den Carboxyderivaten, besitzen mit einer konjugierten Dienstruktur auch eine UV-Absorption im Bereich von 225-230 nm.



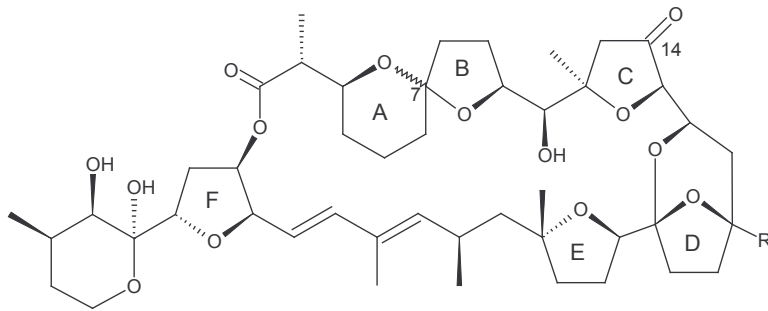
Name	Abkürzung	R ₁	R ₂
Yesotoxin	YTX		-(CH ₂) ₂ OSO ₃ Na
45-Hydroxy- Yessotoxin	45-OH-YTX		-(CH ₂) ₂ OSO ₃ Na
45,46,47-trinor- Yessotoxin	45,46,47- trinor-YTX		-(CH ₂) ₂ OSO ₃ Na
Homo-Yessotoxin	Homo-YTX		-(CH ₂) ₃ OSO ₃ Na
45-Hydroxyhomo- Yessotoxin	45-OH-homo- YTX		-(CH ₂) ₃ OSO ₃ Na
1-Desulfo- Yessotoxin	1-Desulfo- YTX		-(CH ₂) ₂ OH
Carboxy- Yessotoxin	Carboxy-YTX		-(CH ₂) ₂ OSO ₃ Na
Carboxyhomo- Yessotoxin	Carboxyhomo- YTX		-(CH ₂) ₃ OSO ₃ Na
Adriatoxin	ATX	---	-(CH ₂) ₂ OSO ₃ Na

Abb. 2.2: Strukturen von YTXs und ATX [Quilliam, 2003; Draisci et al., 2000]

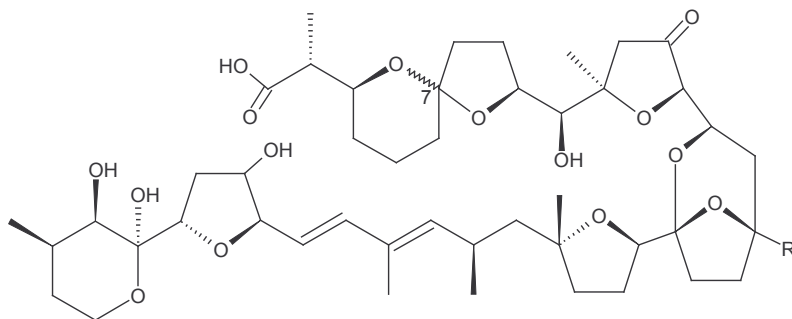
2.2.3. Pectenotoxine (PTXs)

PTXs sind nach der Kammmuschel *Patinopecten yessoensis*, in der sie zuerst entdeckt wurden [Yasumoto et al., 1985], benannt. Pectenotoxin (PTX) –2 (vgl. Abbildung 2.3) wird, von *Dinophysis* spp. produziert, in Schalentieren metabolisiert. Die Methylgruppe an C-43 wird zum Alkohol (PTX-1), Aldehyd (PTX-3) und zur Carbonsäure (PTX-6) oxidiert. Das

Spiroketal-Ringsystem in den Ringen A und B kann unter acidischen Bedingungen zu PTX-4 bzw. PTX-7 bis PTX-9 umgewandelt werden bzw. epimerisieren [Sasaki et al., 1998]. Wenn der macrocyclische Lacton-Ring gespalten wird, entsteht aus PTX-2 die entsprechende Seco-Säure PTX-2SA, bei zusätzlicher Epimerisierung *7-epi*-PTX-2SA [Daiguji et al., 1998b]. Diese Transformation erfolgt enzymatisch in Schalentieren [Suzuki et al., 2001]. Alle Pectenotoxine zeigen UV-Aktivität zwischen 235 und 239 nm und sind instabil unter stark basischen Bedingungen.



Name	R	C7	
PTX-2	CH ₃	R	
PTX-1	CH ₂ OH	R	
PTX-4	CH ₂ OH	S	
PTX-3	CHO	R	
PTX-5) ¹	CH ₂ OH	R) ¹ Carbonyl an C14 reduziert zu Hydroxyl
PTX-6	COOH	R	
PTX-7	COOH	S	
PTX-8	CH ₂ OH	S	
PTX-9	COOH	S	



Name	R	C7
PTX-2SA	CH ₃	R
<i>7-epi</i> -PTX-2SA	CH ₂ OH	R

Abb. 2.3: Strukturen von PTXs [Quilliam, 2003]

2.3. Toxizität von DSP Toxinen

Obwohl die ersten Vertreter der DSP Toxine schon mehr als 15 Jahre bekannt sind, liegen -außer für OA- über ihre Toxizität recht wenig Erkenntnisse vor. Der Grund dafür ist im Wesentlichen die begrenzte Menge an (natürlich kontaminiertem) Material, aus welchem in zeit- und aufwandintensiven Verfahren die entsprechenden Toxine gewonnen werden. Verschiedene Vertreter einer Substanzklasse weisen meist unterschiedliche Toxizitäten auf, und letztere unterscheiden sich nach den angewendeten Tests (Mausbioassay, Phosphataseinhibitionstest, Cytotoxizitätsassay, ELISA-Test [enzyme-linked immunosorbent assay] usw.). Dazu kommt -wie z.B. in Fall der YTXs- eine Abhängigkeit der toxischen Wirkung vom Applikationsweg; je nachdem, ob YTX oral oder durch intraperitoneale Injektion verabreicht wird, ergeben sich unterschiedlich starke Wirkungen.

Diese Faktoren erschweren die ohnehin problematische Übertragung von im Tierexperiment gewonnenen Daten auf den Menschen.

2.3.1. OA und DTXs

OA und DTXs sind potente Inhibitoren der Proteinphosphatasen PP1 und PP2A [Takai et al., 1987]. Diese Enzyme sind für die Dephosphorylierung von Serin- bzw. Threonin-Resten in Proteinen verantwortlich. Wird diese gehemmt, kommt es zu einer Zunahme der Phosphorylierung von Proteinen in Körper [Bialojan & Takai, 1988; Gauss et al., 1997]. Metabolische Prozesse wie die Regulierung der Na^+ -Absonderung im Darm sowie die Signaltransduktion (Kontraktion von glatten- und Herzmuskeln) [Shibata et al., 1982] werden beeinflusst. Als Symptome treten Diarrhö neben Übelkeit, Erbrechen und Leibschmerzen innerhalb von 30 Minuten bis 3 Stunden nach oraler Aufnahme der Toxine auf [Bürk et al., 1998]. Außerdem kommt es zu degenerativen Veränderungen im Epithel des Dünndarms [Terao et al., 1986; Ito & Terao, 1994]. Nach spätestens drei Tagen tritt eine völlige Genesung der Patienten von der akuten Symptomatik ein [Yasumoto et al., 1978; Kat, 1979]. Todesfälle von Menschen wurden bisher nicht beobachtet [Hallegraeff, 2003]. Langfristig wirken OA und DTXs als Tumor-Promotoren [Suganuma et al., 1988; Fujiki et al., 1988]. Insbesondere OA wird wegen seiner Eigenschaft als Phosphatasehemmer zur Untersuchung von durch

reversible Phosphorylierungen beeinflusste zelluläre Prozesse verwendet [Cohen et al., 1990; Fernandez et al., 2002].

In Bezug auf die Struktur-Wirkungsbeziehung ist zu konstatieren, dass vor allem die freie Carboxylgruppe am C-1-Atom, aber auch die Hydroxylgruppen an C-2, C-7, C-24 und C-27 Atom für die inhibitorische Wirkung von Bedeutung zu sein scheinen [Nishiwaki et al., 1990]. Damit im Einklang steht die Beobachtung, dass eine Acylierung am C-7-Atom, wie sie in DTX-3 vorliegt, zu einer im Vergleich zu OA niedrigeren akuten Toxizität sowie Cytotoxizität führt, wobei diese Toxizitäten umso größer sind, je stärker ungesättigt der Acylrest ist. Die diarrhöische Wirkung von 7-O-Acyl-OA-Derivaten ist hingegen nicht geringer als diejenige von OA. Sie wirken nach Injektion in Darmgewebe von Mäusen offenbar per se und nicht erst indirekt durch ihre Spaltung in ihr Muttertoxin [Yanagi et al., 1989]. In Tabelle 2.2 sind die LD₅₀-Werte (letale Dosis, bei der 50 % der Versuchstiere sterben) für OA, DTXs, PTXs und YTXs nach intraperitonealer Injektion in Mäuse angegeben.

Tab. 2.2: Akute Toxizitäten (LD₅₀) von DSP-Toxinen nach intraperitonealer Injektion in Mäuse

Toxingruppe	Vertreter	Toxizität [µg kg ⁻¹]	Literatur	Pathologie
OA	OA	200	[Yasumoto et al., 1989]	Diarrhö; Tumorpromotion
Dinophysis- toxine	DTX-1	160	[Yasumoto et al., 1989]	Diarrhö
	DTX-3	500	[Yasumoto et al., 1989]	Diarrhö
Yesso- toxine	YTX	100	[Yasumoto et al., 1989]	Kardiotoxizität
	45-OH-YTX	500	[Satake et al., 1996]) ¹
	45,46,47-trinor-YTX	220	[Satake et al., 1996]) ¹
	Homo-YTX	100	[Satake et al., 1997b]) ¹
	45-OH-homo-YTX	500	[Satake et al., 1997b]) ¹
	1-Desulfo-YTX	500	[Daiguji et al., 1998a]) ¹
	Carboxy-YTX	500	[Ciminiello et al., 2000a]) ¹
Pecten- toxine	PTX-1	250	[Yasumoto et al., 1989]	Hepatotoxizität
	PTX-2	230	[Yasumoto et al., 1989]	Hepatotoxizität, Diarrhö
	PTX-3	350	[Yasumoto et al., 1989]) ²
	PTX-4	770	[Yasumoto et al., 1989]) ²
	PTX-6	500	zit. in [Yasumoto, 2000]) ²
	PTX-7	< 5000	[Sasaki et al., 1998]) ²
	PTX-8	< 5000	[Sasaki et al., 1998]) ²
	PTX-9	< 5000	[Sasaki et al., 1998]) ²

)¹ keine Angaben verfügbar; Pathologie ist wahrscheinlich ähnlich oder gleich wie diejenige von YTX
)² keine Angaben verfügbar; Pathologie ist wahrscheinlich ähnlich oder gleich wie diejenige von PTX-1 bzw. PTX-2

2.3.2. YTXs

YTX inhibiert PP2A wesentlich schwächer als OA und verursacht keine Diarrhö [Ogino et al., 1997]. Seine Cytotoxizität gegenüber Mauslymphozytenzellen (P388) ist mit mehr als 8 μM sehr viel schwächer als diejenige von OA (0,01 μM) [Yasumoto & Satake, 1998]. Es wirkt nicht hämolytisch oder ichthyotoxisch, obwohl seine Struktur derjenigen des fischtoxischen Brevetoxins ähnelt, beeinflusst aber Ca^{2+} -Ionen Kanäle in ähnlicher Weise wie Brevetoxine und Maitotoxin [de la Rosa et al., 2001]. Der genaue Wirkmechanismus von YTXs ist nach wie vor nicht bekannt.

Im Maus-Bioassay mit intraperitonealer Injektion ist die letale Dosis von YTX nach Murata et al. [1987] mit 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ Körpergewicht niedriger als diejenige von OA (200 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Aune und Mitarbeiter [2002] fanden dagegen, dass der Tod der Mäuse erst ab 750 $\mu\text{g kg}^{-1}$ eintrat. Ab einer Dosis von 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ wurden Veränderungen des Herzgewebes (intrazytoplasmatische Ödeme der Herzmuskelzellen) nur nach Injektion beobachtet, nicht aber bei oraler Aufnahme [Terao et al., 1990]. Sogar nach einer oralen Gabe von 1 mg kg^{-1} zeigten die Mäuse keine Anzeichen von Krankheit. Ab 2,5 mg kg^{-1} traten erste Schwellungen von Herzzellen auf und selbst eine Dosis von 10 mg kg^{-1} überlebten alle Versuchsmäuse. Auswirkungen auf andere innere Organe konnten nicht festgestellt werden [Aune et al., 2002]. Insgesamt zeigen die Daten, dass die Gesundheitsrisiken nach Verzehr von YTX niedriger sind als diejenigen von OA bzw. DTXs [Yasumoto & Satake, 1998].

2.3.3. PTXs

PTX-1 und PTX-6 hemmen die Proteinphosphatasen PP1 und PP2A nicht [Luu et al., 1993]. Obwohl PTXs nicht als Tumorpromotoren wirken, besitzen sie eine hepatotoxische Wirkung (Nekrose von Hepatocyten) [Terao et al., 1986]. Bei oraler Gabe an Ratten treten zusätzlich Diarrhö und degenerative Veränderungen des Darmgewebes auf, wobei die orale Toxizität ähnlich derjenigen nach intraperitonealer Injektion ist [Ishige et al., 1988]. Gegenüber verschiedenen Humanzelllinien erwies sich PTX-2 bereits im nano- bis picomolaren Bereich

als extrem cytotoxisch [Jung et al., 1995]. Auch bei PTXs ist der genaue Wirkmechanismus noch nicht aufgeklärt.

2.4. Vorkommen von DSP-Toxinen

Das Auftreten von DSP konzentriert sich nach wie vor in Europa und Japan. Dennoch wurden in den letzten Jahren auch Fälle aus Chile, Nova Scotia (Kanada), Australien, Neuseeland und Indonesien beschrieben [Yasumoto & Satake, 1998]. Das Vorkommen von OA und DTXs ist noch weiter verbreitet, so z.B. in Indien, der früheren Sowjetunion, Uruguay und Long Island (New York) [Aune & Yndestad, 1993; Backer et al., 2003].

Bei YTXs ist die Ausdehnung (noch) nicht so weit vorangeschritten. Sie umfasst Norwegen, Italien, Japan, Neuseeland und Chile [Yasumoto & Satake, 1998]. In der italienischen Adria wurden neben ATX [Ciminiello et al., 1998] auch PTXs entdeckt. Weitere Orte des Auftretens von PTXs waren irländische, japanische und neuseeländische Küsten (vgl. Abbildung 2.4) [Lee et al., 1989a; Draisci et al., 2000].

Bezüglich der biogenetischen Herkunft der Toxine ist festzustellen, dass eine Spezies nichttoxisch bzw. zeitweilig toxisch sein kann. Die Toxinproduktion variiert oft innerhalb einer Art und regionaler Morphotypen. Über die Gründe für die Toxinproduktion besteht noch keine endgültige Klarheit. Man nimmt jedoch an, dass Temperatur, Art und Umfang der Nährstoffe im Wasser sowie weitere Umweltfaktoren beteiligt sind, wobei es sich offenbar um ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Ursachen handelt. Auch die Funktion der Toxine als Sekundärmetabolite ist nicht bekannt. Diskutiert wird der Schutz vor Fraßfeinden [Wright & Cembella, 1998].

Wissenschaftliche Untersuchungen werden beispielsweise im Fall der *Dinophysis* spp. dadurch erschwert, dass es bis heute nicht gelungen ist, Vertreter dieser Gattung zu kultivieren.

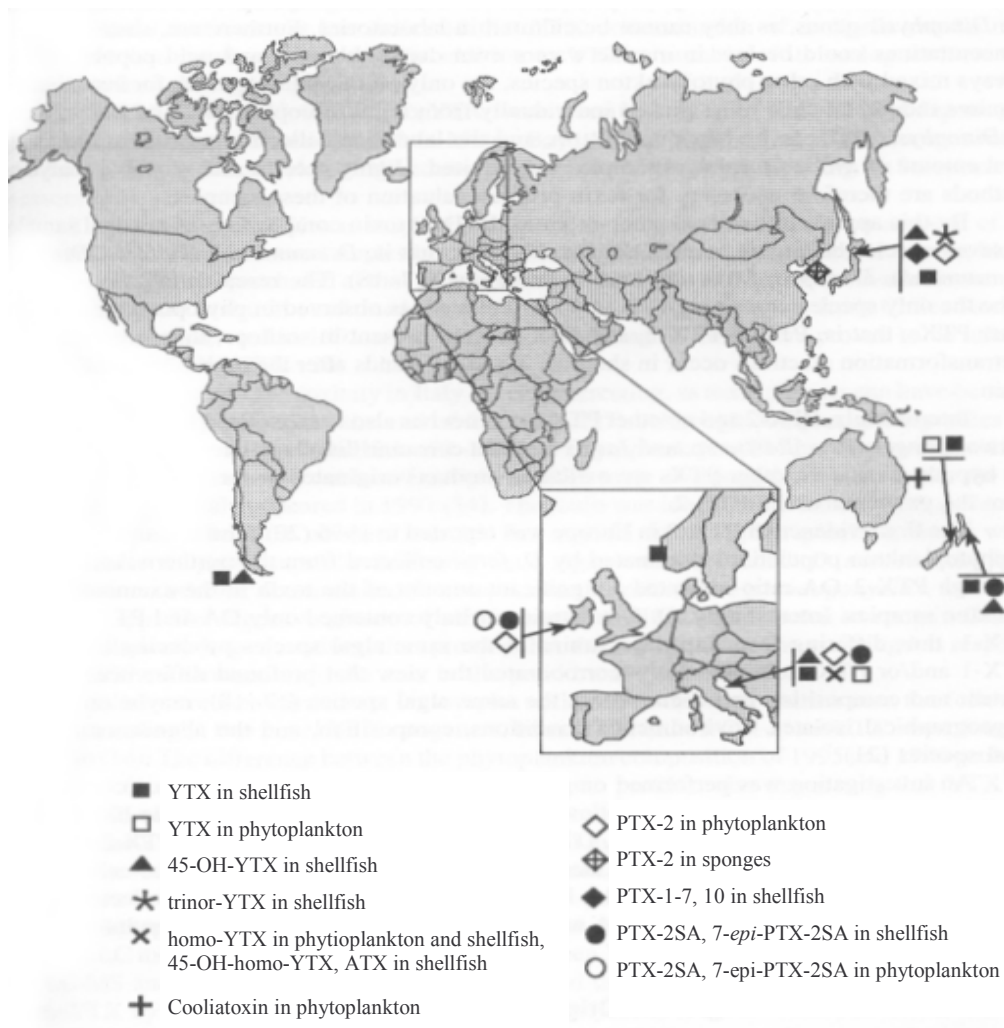


Abb. 2.4: Verbreitung von YTXs, PTXs sowie Cooliatoxin [Draisci et al., 2000]

Generell sind die prinzipiell weltweit vorkommenden *Prorocentrum* spp. für die Produktion von OA und DTXs, und *Dinophysis* spp. zusätzlich für PTXs verantwortlich. In Tabelle 2.3 wurden aber nur solche Spezies aufgenommen, die nachweislich mindestens einmal entsprechende Toxine produziert haben. *Protoceratium reticulatum* und *Lingulodinium polyedrum* stellen Quellen von YTXs dar.

Cooliatoxin wurde bisher ausschließlich in Australien im isolierten Dinoflagellat *Coolia monotis* gefunden, allerdings ist seine genaue Struktur bislang noch unbekannt [Holmes et al., 1995].

Tab. 2.3: Nachweislich toxinproduzierende Dinoflagellaten [Wright & Cembella, 1998; Draisci et al., 2000]

	OA	DTX	OA- diol- Ester	PTX- 2	PTX- 2SA	7- <i>epi</i> - PTX- 2SA	YTX	homo- YTX
<i>Dinophysis acuminata</i>	•	•						
<i>acuta</i>	•	•		•	•	•		
<i>caudata</i>	•							
<i>fortii</i>	•	•		•				
<i>mitra</i>		•						
<i>norvegica</i>	•	•						
<i>rotundata</i>		•						
<i>sacculus</i>	•							
<i>Prorocentrum belizeanum</i>	•							
<i>lima</i>	•	•	•					
<i>hoffmannianum</i> (= <i>P. concavum</i>)	•							
<i>maculosum</i>	•	•	•					
<i>Protoceratium reticulatum</i>							•	
<i>Lingulodinium polyedrum</i> (= <i>Gonyaulax polyedra</i>)							•	•

Der Übergang von Toxinen aus dem Phytoplankton in die Muschel ist ein komplexer und wohl auch speziesspezifischer Vorgang, da die Muschel als filtrierender Organismus Einfluss auf die von ihr aufgenommene Nahrung und somit auf die Anreicherung toxischer Algen besitzt [Sidari et al., 1998]. Aus dem Vorliegen toxischer Algen folgt also nicht zwingend eine Kontamination mit dem im Phytoplankton vorliegenden Toxin. Zusätzlich kann Metabolisierung von Toxinen in der Muschel (z.B. Bildung von DTX-3 aus anderen Toxinen der OA-Gruppe [Suzuki et al., 1999]) auftreten.

In den letzten Jahren ist deutlich häufiger über HABs berichtet worden als zuvor. Ob es sich tatsächlich oder nur scheinbar um einen Anstieg der Zahl der HAB-Ereignisse handelt, ist unklar [Hallegraeff, 2003]. Für einen nur scheinbaren Anstieg spricht die erhöhte wissenschaftliche Aufmerksamkeit für toxische Spezies in den letzten Jahrzehnten (z.B. im Rahmen von Monitoring-Programmen oder infolge der zunehmenden Verwendung von Gewässern für Aquakultur). Eine tatsächliche Zunahme von schädlichen Algenblüten könnte durch ihre Stimulation wegen Eutrophierung und/oder klimatischen Verhältnissen verursacht sein. Weitere mögliche Ursachen stellen der Transport von Dinoflagellatenzysten im Ballastwasser von Schiffen oder infolge der Verlegung von Schalentierkulturbeständen an einen neuen Ort [Hallegraeff, 1993] dar.

2.5. Detektionsmöglichkeiten für DSP-Toxine

Analytische Methoden für den Nachweis sowie die Bestimmung von DSP-Toxinen können in Bioassays (biologische Verfahren), biochemische Verfahren (inklusive Enzym- und Immunoassays) und physikalisch-chemische Methoden unterteilt werden.

2.5.1. Biologische Verfahren

Beim Bioassay werden nach Verabreichung der aufgearbeiteten Probe Verhalten und ggf. Überlebensdauer der Versuchstiere zur Feststellung typischer dosis- und zeitabhängiger Symptome beobachtet und zur Ermittlung der Toxingehalte mit Hilfe von Vergleichsdaten herangezogen [Quilliam & Wright, 1995; Fernandez et al., 2003a].

Ihre besonderen Vorteile liegen darin, dass eine toxische Wirkung und damit die Gesamtoxizität gemessen wird. Auch unbekannte Toxine werden mit erfasst.

Nachteilig hingegen wirken sich die unvermeidlichen Abweichungen zwischen den jeweiligen Versuchstieren aus, da letztere sich nicht standardisieren lassen (genetische Unterschiede; Geschlecht, Alter, Gewicht sowie individuelle Konstitution wie Ernährungs- und Stresssituation). Weiterhin kann es zu falsch positiven Ergebnissen aufgrund mitextrahierter -für den Menschen aber nicht toxischen- Substanzen kommen. Bioassays sind oft kostenintensiv und unempfindlicher als andere Methoden [Fremy et al., 1999]. In der Öffentlichkeit wächst der Widerstand gegen Tierversuche. Man unterscheidet im Wesentlichen zwischen den folgenden Bioassays:

Ratten-Bioassay

Nach Fütterungsexperimenten an Ratten wird die Toxizität anhand der diarrhöischen Wirkung der Probe durch Bewertung der Konsistenz der Faeces bestimmt [Kat, 1983]. Prinzipiell simuliert dieser Test die Wirkung einer Intoxikation im Menschen sehr gut und stellt deshalb ein biologisch realistisches Modell der akuten Toxizität dar, aber YTXs haben keine diarrhöische Wirkung und werden demzufolge mit diesem Test nicht erfasst. Umgekehrt

beeinflussen z.B. Toxine pathogener Mikroorganismen das Ergebnis [Fernandez et al., 2003a].

Intraperitonealer Maus-Bioassay

Bei diesem Verfahren werden aufgearbeitete Probenextrakte intraperitoneal jeweils drei Mäusen injiziert [Yasumoto et al., 1978; Hamano et al., 1985]. Als Toxizitätskriterium dient die Überlebensdauer, wobei die Beobachtungsdauer je nach Durchführung von 5 Stunden bis 24 Stunden reicht [Miguez et al., 1998]. Dieser Assay zeigt -im Gegensatz zu Fütterungstest- die Gesamtoxizität aller DSP-Toxine an [Cembella et al., 1995]. Bei Aufarbeitung der Probe können nach Ausschütteln mit Diethylether [Yasumoto et al., 1984] Minderbefunde an YTXs und falsch positive Befunde infolge nicht entfernter hoher Mengen ungesättigter Fettsäuren auftreten [Takagi et al., 1984]. Eine Flüssig-flüssig-Verteilung mit Petrolether entfernt zwar freie Fettsäuren, aber auch Acyl-Derivate von OA, DTX-1 und DTX-2. Weiterhin ist problematisch, dass es keine vereinheitlichte Durchführungsbestimmung gibt [Fernandez et al., 2003a].

Daphnia magna Bioassay

Dieser Bioassay basiert auf der Inhibition der Mobilität des Wasserfloh *Daphnia magna* in Anwesenheit von OA [Vernoux et al., 1993]. Diese Spezies wird üblicherweise als ökotoxikologischer Indikatororganismus verwendet [Adema, 1978].

2.5.2. Biochemische Verfahren

Biochemische Verfahren erfordern im Gegensatz zu Bioassays und physikalisch-chemischen Verfahren eine weniger aufwendige apparative und personelle Ausstattung. Ein geschulter Anwender kann diese Tests dezentral durchführen. Sie werden als sehr empfindliche Methoden vorrangig zum preiswerten Screening, d.h. wenn viele Proben in kurzer Zeit untersucht werden sollen und das Toxinprofil von untergeordnetem Interesse ist, eingesetzt.

Mittlerweile stehen einige bereits als kommerziell erhältliche Test-Kits zur Verfügung. Während die einzelne Bestimmung insbesondere bei großen Stückzahlen relativ preiswert ist, ist die Entwicklung solcher Tests sehr zeit- und kostenintensiv.

Protein phosphatase inhibitions assay

Proteine werden durch Proteinkinasen phosphoryliert. Diese Reaktion kann durch Proteinphosphatasen umgekehrt werden [Cohen, 1989]:

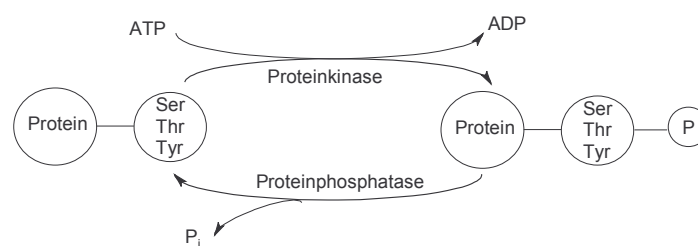


Abb. 2.5: Prinzip der Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Proteinen

Die Aktivität von PP1 und PP2A wird durch OA und DTXs gehemmt, wodurch es in der Zelle zu einer Konzentrationserhöhung an phosphorylierten Proteinen und infolgedessen einer gestörten Signalübertragung kommt [Bialojan & Takai, 1988; Takai, 1988; Haystead et al., 1989; Ishihara et al., 1989]. Basierend auf der Hemmung kann durch die Messung der Phosphataseaktivität eine quantitative Aussage über die toxische Wirkung erhalten werden [Shiraki et al., 1985]. Als Substrat für die Enzymreaktion wurde farbloses p-Nitrophenylphosphat gewählt, welches durch die Phosphataseaktivität zu gelbem p-Nitrophenol umgesetzt wird, was photometrisch einfach messbar ist [Simon & Vernoux, 1994]. Eine größere Empfindlichkeit erlaubt der Einsatz des Substrates 4-Methylumbelliferylphosphat, dessen dephosphoryliertes Produkt 4-Methylumbelliferol fluorimetrisch bestimmt werden kann [Vieytes et al, 1997; Shimizu et al, 1998]. Vorteile von Proteinphosphatase-Inhibitions-Assays [Mondeguer et al., 1998; Honkanen et al., 1996a; Honkanen et al. 1996b] sind ihre hohe Empfindlichkeit [Tubaro et al., 1996a] sowie ein großer Probendurchsatz beim Einsatz von Microplate-Readern. Nachteilig sind die nur summarische Bestimmung von OA und DTXs, sowie Kreuzreaktionen mit anderen Toxinen (z.B. Nodularin oder Microcystine).

Immunoassays

Levine et al. entwickelten einen kompetitiven Radioimmunoassay für die Bestimmung von OA [1988]. Nach der Produktion von monoklonalen Antikörpern gegen OA [Usagawa et al., 1989] wurden ELISA-Tests etabliert [Uda et al., 1989; Chin et al., 1995] und auf DTXs ausgeweitet [Carmody et al., 1995; Matsuura et al., 1994a; Matsuura et al., 1994b]. Kürzlich wurde zudem über die Entwicklung und Anwendung eines Immunoassays für YTX und seine Analoga berichtet [Briggs et al., 2002; Garthwaite et al., 2001].

Nach Herstellung eines Konjugates aus Antigen (Toxin) und Protein wird eine definierte Menge davon auf einem Träger (Mikrotiterplatte) fixiert. Während der Anwendung werden die auf das Antigen zu untersuchende Probe und enzymmarkierte Antikörper, die sowohl mit dem freien Antigen der Probe als auch mit dem auf der Trägersubstanz fixierten Antigen reagieren („kompetitiver Immunoassay“), zugegeben. Je mehr freies Antigen in der Probe vorhanden ist, desto mehr enzymmarkierter Antikörper bindet daran, und entsprechend weniger enzymmarkierter Antikörper reagiert mit dem auf der Trägersubstanz fixierten Antigen. Nach Auswaschen der nicht gebundenen enzymmarkierten Antikörper wird die Enzymaktivität der gebundenen enzymmarkierten Antikörper über eine Substratreaktion bestimmt. Daraus lässt sich indirekt über den Vergleich mit analog behandelten Standards bekannter Konzentration die Konzentration in der Probe ermitteln.

Andere biochemische Verfahren

Neben Cytotoxizitätstests für den Nachweis von OA [Amzil et al., 1992; Croci et al., 1997; Tubaro et al., 1996b] sind solche für andere DSP-Toxine vorgestellt worden. Sowohl OA, DTXs als auch PTX-6 induzieren die Depolymerisation von F-Actin in bestimmten Nerventumor-Zelllinien [Leira et al., 2002]. Darauf beruhend wurde ein neuer Cytotoxizitätsassay für diese Toxine entwickelt [Leira et al., 2003]. Pierotti et al. [2003] berichten über einen funktionalen Assay, der darauf basiert, dass YTX die Akkumulation von spezifisch fragmentiertem E-Cadherin in MCF-7-Zellen induziert. Nach der Behandlung der Zellkultur mit dem Hepatopankreas-Extrakt und 20 stündiger Inkubation werden Zellextrakte per Gelelektrophorese fraktioniert, und im Rahmen eines Immunoblottings mit Chemolumineszenzdetektion werden intaktes E-Cadherin sowie sein 100 kDa Fragment

bestimmt. Die Quantifizierung von YTX erfolgt über parallel mitlaufende Standards bei einem Detektionslimit von 100 ng g^{-1} Hepatopankreas.

2.5.3. Physikalisch-chemische Verfahren

Zu den physikalisch-chemischen Verfahren zählen die HPLC-Verfahren, aber auch die auf Algentoxine selten angewendeten Trennungen mit Hilfe der Kapillarelektrophorese.

2.5.3.1. HPLC-Verfahren

Die moderne Flüssigchromatographie stellt mit ihrer hohen Trennleistung, gekoppelt mit empfindlichen und selektiven Detektionsmethoden, ein leistungsfähiges Werkzeug für die Spurenanalytik dar. Ihre Vorteile gegenüber den biologischen und biochemischen Nachweistechiken liegen vor allem in der Möglichkeit, durch die Auftrennung komplexer Gemische Informationen in Hinblick auf Menge, Zusammensetzung und der Verteilung von Toxinkomponenten zu erhalten, sowie in ihrer Automatisierbarkeit. Die Kopplung mit massenspektrometrischer Detektion hat sich besonders bewährt, weil sie neben der geforderten Sensitivität eine hohe Selektivität aufweist und prinzipiell auch einen Nachweis beim Fehlen von Standardsubstanzen, z.B. beim Vorliegen neuer Strukturvarianten erlaubt.

OA und DTXs sind weder UV- noch fluoreszenzaktiv. YTXs und PTXs besitzen zwar Dien-Gruppen und damit UV-Aktivität, aber diese ist wenig geeignet für deren Bestimmung aus Schalentieren, da weder die Selektivität noch die Sensitivität ausreichen, um Algentoxine im Spurenbereich nachzuweisen, denn mitextrahierte Substanzen absorbieren ebenfalls stark im betreffenden Wellenlängenbereich. Deshalb lassen sich diese DSP-Toxine underivatisiert nur massenspektrometrisch nachweisen. Steht diese Art der Detektion nicht zur Verfügung, greift man auf Derivatisierungstechniken zurück, um UV-aktive oder fluoreszierende Gruppen in das Toxinmolekül einzubinden und die derivatisierten Analyten nach HPLC-Trennung in konventionellen Detektoren nachweisen zu können.

Derivatisierungsreagenzien für DSP-Toxine

Voraussetzung für die chemische Derivatisierung ist das Vorliegen einer geeigneten, reaktiven funktionellen Gruppe im Analyten und eines selektiven Reagenzes, das quantitativ unter milden Bedingungen innerhalb einer kurzen Zeit reagiert [Quilliam, 2003]. In Toxinen der OA-Gruppe und teilweise auch in PTXs sind die freien Carboxylgruppen Ziel der Derivatisierung, während in YTXs die konjugierte Dienfunktion den Angriffspunkt darstellt [Yasumoto & Takizawa, 1997].

Derivatisierungsreagenzien für Moleküle mit Carboxylgruppen

Für die freien Carboxylgruppen insbesondere der Toxine der OA-Gruppe sind eine ganze Reihe von Derivatisierungsreagenzien [Yasaka & Tanaka, 1994], die oft aus der Fettsäureanalytik stammen, vorgeschlagen worden, so dass hier nur auf einige von ihnen eingegangen werden kann. Einen kurzen Überblick zu einigen für OA und DTXs verwendeten Reagenzien geben Marr et al. [1994] und James et al. [1998].

Derivatisierung mit 9-Anthryldiazomethan (ADAM)

Barker et al. [1980] verwendeten ADAM zur HPLC/FLD-Bestimmung von Fettsäuren im Picomol-Bereich, welches später als erstes Reagenz für die Bestimmung von OA und DTX-1 vorgeschlagen wurde (siehe Abbildung 2.6) [Lee et al., 1987; Lee et al., 1989b]. ADAM wurde auch für PTXs mit Carbonsäurefunktion eingesetzt [Yasumoto et al., 1989; Daiguji et al., 1998b; James et al., 1999].

Nach Extraktion der Probe mit Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) erfolgt zwei Mal eine Flüssigflüssig-Verteilung mit Petrolether. Die gereinigte Phase wird mit Wasser verdünnt und die Toxine mit Chloroform extrahiert, bevor der eingeengte Rückstand mit ADAM derivatisiert wird [Lee et al., 1987]. Die Methode wurde mehrfach abgeändert [Stabell et al., 1991; Stockemer & Gürke, 1993; Suzuki, 1994; Pereira et al., 1995; Syhre & Unger, 1996; Aase & Rogstad, 1997]. Ein Vorteil von ADAM besteht darin, dass es ohne Katalysator und bereits bei Raumtemperatur reagiert. Als Nachteil erweist sich, dass es z.T. schwer erhältlich ist und aufgrund seiner Instabilität nicht in hoher Reinheit vorliegt, so dass im Anschluss an die

Derivatisierung zur Entfernung von Zersetzungsprodukten und damit in der Chromatographie einhergehenden Störpeaks entweder eine Aufreinigung an Kieselgel definierter Aktivität oder der Einsatz eines Säulenschaltsystems [Hummert et al., 1996] notwendig ist. Zwar kann ADAM auch *in situ* hergestellt werden [Nakaya et al., 1967; Yoshida et al., 1988; Quilliam et al., 1998], aber die Haltbarkeit der Derivate ist eingeschränkt.

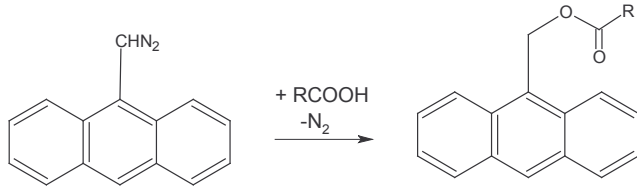


Abb. 2.6: Reaktion von ADAM mit Carbonsäuren

Derivatisierung mit 2-(2,3-Anthracendicarboximido)ethyltrifluormethansulfonat (AE-OTf)

Nachdem Akasaka et al. [1993] Fettsäuren mit AE-OTf und Tetraethylammoniumcarbonat (TEAC) als Katalysator zu fluoreszenzaktiven Estern umgesetzt hatten, wendeten sie das Reagenz (vgl. Abbildung 2.7) für die Bestimmung von OA, DTX-1 [Akasaka et al., 1996a] bzw. unhydrolysiertem 7-O-palmitoyl-OA [Akasaka et al., 1996b] an. Die Bestimmung der Algentoxine macht nach Derivatisierung eine Reinigung an Kieselgel und zusätzlich die Verwendung eines Säulenschaltsystems notwendig.

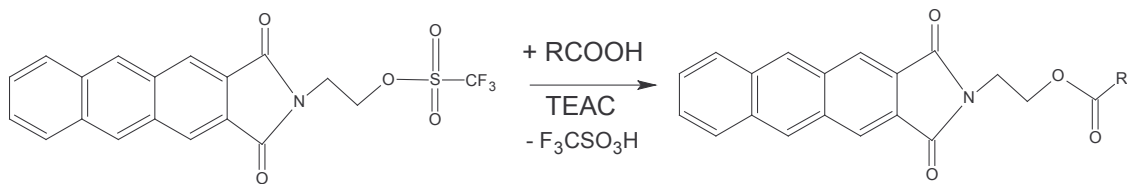


Abb. 2.7: Reaktion von AE-OTf mit Carbonsäuren

Derivatisierung mit 4-Brommethyl-7-methoxycumarin (BrMMC)

BrMMC hatte schon ein sehr breites Einsatzgebiet bei der Derivatisierung organischer Säuren [Wolf & Korf, 1992], insbesondere Fettsäuren [Dünges, 1977a; Dünges, 1977b; Dünges et al., 1977], als Shen et al. [1997] es zum ersten Mal für die Derivatisierung von OA und DTX-1 einsetzten. Die Reaktion erfolgt innerhalb von 2 Stunden mit dem Katalysator Triethylamin. Die Probenaufarbeitung gleicht derjenigen für ADAM. Nach der Flüssig-flüssig-Verteilung

erfolgen Aufreinigung mit Kieselgel und Derivatisierung. Gegenüber ADAM und AE-OTF bietet es den Vorteil, dass im Anschluß an die Derivatisierung keine Aufreinigung nötig ist. Allerdings verfügen die Derivate über eine geringe Stabilität, so dass schon nach ihrer kurzer Aufbewahrung selbst bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Chromatogramm die Intensität der Analytenpeaks ab- und diejenige von Störpeaks zunimmt. Deswegen ist die Durchführung von längeren Analysenserien kaum möglich.

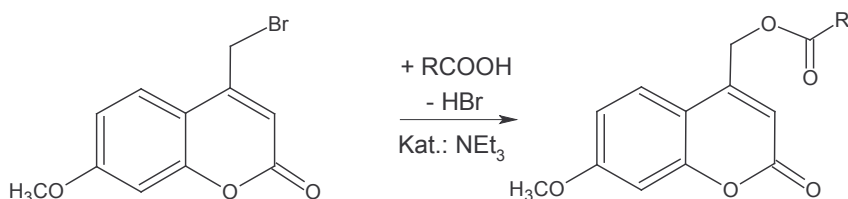


Abb. 2.8: Reaktion von BrMMC mit Carbonsäuren

Derivatisierung mit 3-Brommethyl-7-methoxy-1,4-benzoxazin-2-on (BrMB)

Nachdem BrMB zur Derivatisierung von Hydroxy-, Hydroperoxy- sowie Fettsäuren [Nakanishi et al., 1992; Yamada et al., 1991] mit fluorimetrischem bzw. massenspektrometrischen [Kusaka & Ikeda, 1993] Nachweis eingesetzt worden war, wurde es von Kastrup [1999] in die Analytik von OA und DTX-1 eingeführt.

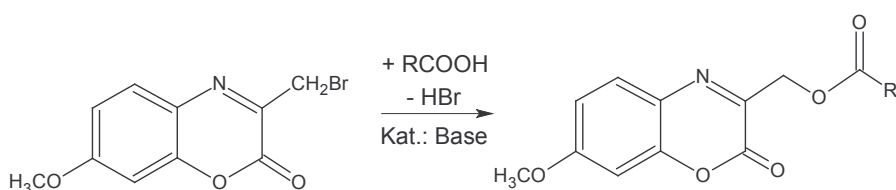


Abb. 2.9: Derivatisierung von Carbonsäuren mit BrMB

Dieses Reagenz besitzt alle von BrMMC bekannten Vorteile -insbesondere gegenüber ADAM und AE-OTf-, ohne die geringe Stabilität der Derivate aufzuweisen. Es ist keine Reinigung der Derivatisierungslösung nötig. Weiterhin können -ebenso wie bei BrMMC- als Katalysatoren organische Basen (z.B. Triethylamin) eingesetzt werden, die nach der

Derivatisierungsreaktion keine Abtrennung von festen Bestandteilen (z.B. Alkalicarbonaten) erforderlich werden lassen.

Dies sind zwei grundlegende Voraussetzungen für die von Kastrup entwickelte Methode, bei der die Proben unmittelbar im Anschluss an die Derivatisierungsreaktion ohne weitere Aufarbeitungsschritte injektionsfähig sind [Kastrup, 1999].

Neben der höheren Stabilität gegenüber Basen besitzt BrMB als Azacumarin höhere Reaktivität und Fluoreszenzintensität im Vergleich zu BrMMC [Yasaka & Tanaka, 1994]. Es setzt sich schnell zu den BrMB Estern um und diese sind für mindestens 24 Stunden stabil. Da in Proben native Fluoreszenzen mit Emissionswellenlängen im Bereich 300-400 nm auftreten können, ist es zur Vermeidung von Signalbeeinträchtigungen vorteilhaft, dass die fluoreszenzaktiven Derivate um 440 nm emittieren. BrMB ist preiswert und in ausreichender Reinheit erhältlich [Kastrup, 1999].

Derivatisierungsreagenzien für Diene

Von Yasumoto und Takizawa [1997] wurde für die HPLC/FLD-Bestimmung von YTXs, die mit Ausnahme der Carboxy-YTXs und von ATX ein konjugiertes Dien in der Seitenkette aufweisen, eine Derivatisierung mit dem dienophilen Reagenz 4-[2-(6,7-dimethoxy-4-methyl-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaliny)ethyl]-1,2,4-triazolin-3,5-dion, kurz DMEQ-TAD, zu fluoreszenzaktiven Derivaten vorgeschlagen. Für jedes Toxin ergeben sich zwei Epimere (vgl. Abbildung 2.10) und damit auch zwei Peaks im Chromatogramm.

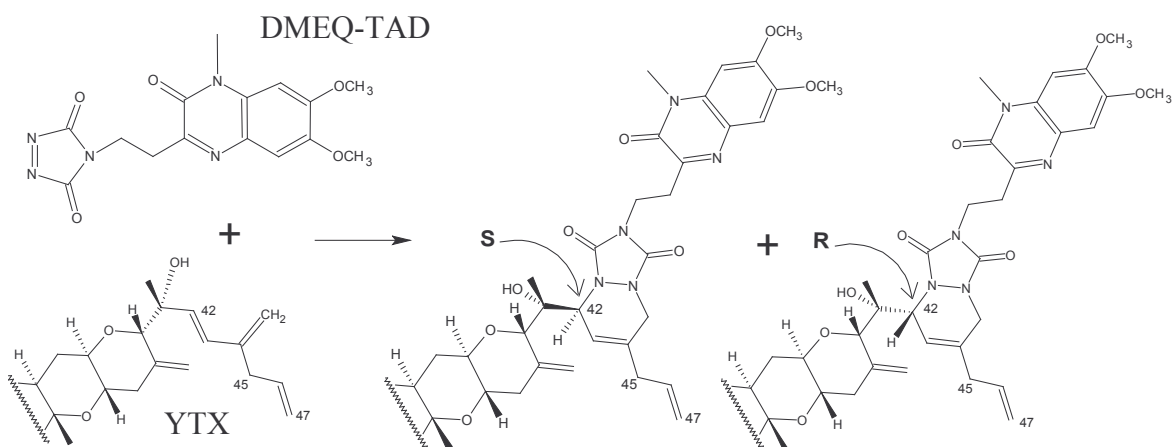


Abb. 2.10: Reaktion von YTX mit DMEQ-TAD [Yasumoto & Takizawa, 1997]

Für YTX wurde ein Detektionslimit von 1 ng entsprechend 100 ng g⁻¹ Schalentier angegeben. Die Methode wurde kürzlich erfolgreich validiert [Ramstad et al., 2001]. Sasaki et al. [1999] nutzten ebenfalls DMEQ-TAD für die fluorimetrische Bestimmung von PTXs, die konjugierte Dienfunktionen aufweisen.

Kopplung der HPLC mit massenspektrometrischer Detektion

Seit der Lösung der technischen Probleme der Kopplung von HPLC und Massenspektrometer durch die Anwendung der Ionisation unter Atmosphärendruck (atmospheric pressure ionization API [Bruins et al., 1987]) hat sich diese Technik zur leistungsfähigsten Analysetechnik im Bereich der Algentoxine entwickelt, was sich u.a. am zunehmenden Einsatz ablesen lässt. Die hervorstechenden Eigenschaften sind hohe Selektivität und Sensitivität sowie die Möglichkeit, Analyten in komplexen Gemischen nach HPLC-Trennung quantitativ bestimmen zu können. Insbesondere durch die Anwendung der MS/MS-Technik wird die Identifizierung und Strukturaufklärung unbekannter Toxine [Hu et al., 1992a; Marr et al., 1992], neuer Analoga oder von Metaboliten durch den Erhalt von Strukturinformationen erleichtert [Quilliam, 1995].

Die Kopplung von HPLC und Massenspektrometer erwies sich vor allem aus zwei Gründen als problematisch. Zum einen liegen die Analyten im Eluenten gelöst vor, welcher vor der Ionisierung entfernt werden muss [de Hoffmann & Stroobant, 1999]. Dies ist im Hinblick auf die Druckunterschiede bedeutsam, denn im Massenspektrometer liegt ein Hochvakuum vor, während die HPLC unter Normaldruck arbeitet. Zum anderen sind nicht alle per HPLC trennbaren Analyten unzersetzt verdampfbar, wodurch in diesen Fällen klassische Ionisationsmethoden wie die Elektronenstoß-Ionisierung oder die Chemische Ionisierung ausscheiden.

Die Lösung dieser Probleme erfolgte durch die API. Der von der HPLC kommende Eluatstrom wird im Bereich des Einlasssystems (Interface), d.h. der Verbindung zum Massenspektrometer auf eine beheizte Edelstahlplatte mit kreisförmigem Loch (curtain plate) gerichtet und dabei mit Hilfe einer Kapillare vernebelt. Die entstehenden feinen Tröpfchen werden durch die anliegende Hochspannung ionisiert. Der Eluent wird dabei durch zwei koaxial bzw. senkrecht zugeführte beheizte Stickstoffströme verdampft (pneumatisch unterstütztes Elektrospray, Turbo-Ionspray™ [Bruins et al., 1987]), so dass die Tröpfchen

kleiner werden und eine Erhöhung ihrer Ladungsdichte erfolgt. Wegen der Abstoßung gleichnamiger Ladungen zerfallen diese Tröpfchen weiter in Tröpfchen geringerer Größe (sog. Coulomb-Explosion). Dieser Prozess führt schließlich zur Bildung freier gasförmiger Ionen, die im Massenspektrometer nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) detektiert werden. Er wird noch dadurch unterstützt, dass auf dem Weg der Tröpfchen bzw. gasförmigen Ionen ins Massenspektrometer hinter der Curtain-Plate ein „Vorhang“, der durch senkrecht zur Flugrichtung strömenden Stickstoff (Curtaingas) realisiert wird, durchflogen wird. Dieser dient neben der Desolvatisierung u.a. zum Abtransport ungeladener Moleküle bzw. Matrixbestandteile (vgl. Abbildung 2.11). Über ein mehrstufiges Kammerensystem mit jeweils abnehmenden Druck erreichen die Ionen nach Durchquerung der Ionenoptik, bestehend aus Skimmer, Quadrupolstäben und Linsen schließlich den im Hochvakuum befindlichen Massenanalysator [Sciex (ed), 1990].

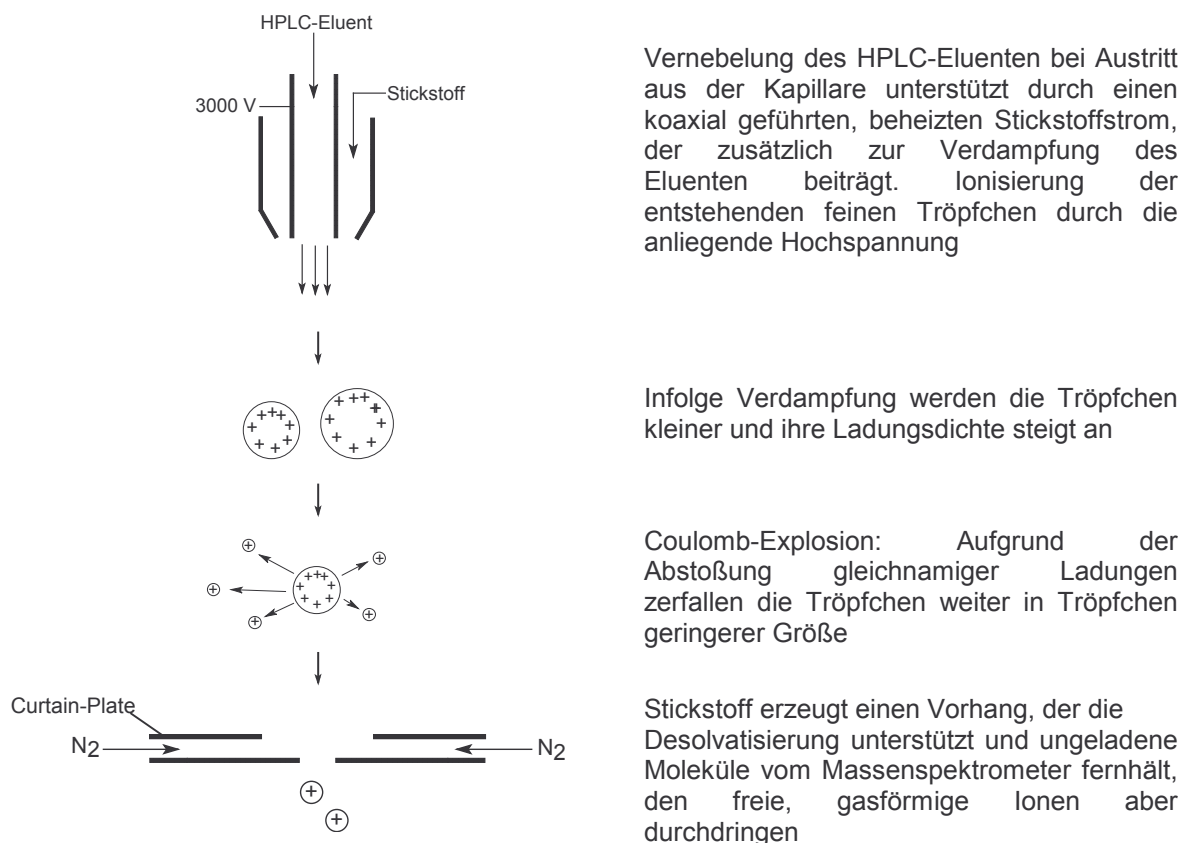


Abb. 2.11: Funktionsweise eines Elektrospray-Einlasssystems [Sciex (ed), 1990]

Beim hier beschriebenen Prozess der Elektrospray-Ionisierung (ESI) [Fenn et al., 1990] der Analyten im HPLC-Eluent ist die Flussrate für den im Einlasssystem ankommenden Eluentenstrom auf ca. 300 μL begrenzt. Bei der Kopplung von HPLC-Verfahren mit höheren

Flussraten wird die Verminderung der ankommenden Eluatmenge pro Zeiteinheit dadurch erreicht, dass der Eluatstrom zuvor kontinuierlich in einen zu verwerfenden und einen zu analysierenden Teilstrom aufgespalten wird [de Hoffmann & Stroobant, 1999]. Da es sich bei der ESI um ein sog. „sanftes“ Ionisierungsverfahren handelt, bei dem im Vergleich zu Elektronenstoß- oder chemischer Ionisierung relativ wenig Energie auf die Moleküle übertragen wird, werden diese meist unzersetzt in den Massenanalysator überführt [Herderich & Schreier, 1996; Niessen & Tinke, 1995] und können in Form ihrer Quasi-Molekülonen ($[M-H]^-$ bei negativer und $[M+H]^+$ bei positiver Ionisierung) oder als Addukte ubiquitärer Ionen wie Na^+ oder Cl^- detektiert werden. ESI ist vor allem für polare Analyten und damit für alle bekannten Algentoxine geeignet.

Daneben besteht noch ein weiteres API Verfahren, die chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck (atmospheric pressure chemical ionization, APCI [Bruins, 1994]), die aber im Falle von Algentoxinen seltener Anwendung gefunden hat.

Als Massenanalysatoren sind verschiedene Systeme genutzt worden, wie Single- und Triple-Quadrupol-Geräte, Ionenfallen- (ion trap), Flugzeitmassenspektrometer und Magnetsektorgeräte, die jeweils ihre spezifischen Vorteile für bestimmte Anwendungsbereiche besitzen [Herderich & Schreier, 1996].

Es gibt verschiedene Arten der Aufnahme von Daten: im sog. Full-Scan-Modus werden breite m/z -Bereiche erfasst, während man sich im Single Ion Monitoring (SIM)- bzw. Multiple Ion Detection (MID)-Modus auf die Überwachung eines bzw. mehrerer bestimmter m/z -Verhältnisse (Massenspuren) beschränkt.

In den letzten Jahren ist über eine Vielzahl von verschiedenen LC/MS-Verfahren mit positiver oder negativer Ionisierung für die Bestimmung von DSP-Toxinen berichtet worden [Quilliam, 2003]. Stellvertretend dafür sollen zwei Verfahren kurz beschrieben werden. Marr et al. [1992] haben 7-O-Acyl-Derivate der Toxine von OA; DTX-1 und -2 unhydrolysiert per LC/MS nachgewiesen. Der methanolische Extrakt aus 4,2 kg Hepatopankreasgewebe von *Mytilus edulis* wurde aufkonzentriert, an Kieselgel sowie Sephadex aufgereinigt bzw. OA, DTX-1 und DTX-2 separiert. Die Trennung der 7-O-Acyl-Ester erfolgte isokratisch mit wässrigem Acetonitril (3 : 7; v : v), welches 0,1 % Trifluoressigsäure enthielt, an einer C-4 Phase. Die Detektion erfolgte als $[M+H]^+$ -Ionen der Analyten im Full-Scan- und im MID-Modus.

Goto et al. [2001] beschrieben ein Verfahren zur Analyse von insgesamt 10 DSP-Toxinen, darunter auch 7-O-palmitoyl-OA und 7-O-palmitoyl-DTX-1 aus dotierten Kammuscheln

Patinopecten yessoensis. Nach Extraktion mit Methanol : Wasser (9 : 1; v : v) erfolgte eine Auftrennung in mehrere Fraktionen, die mit Hilfe von Flüssig-flüssig-Verteilungen sowie an Kieselgel aufgereinigt wurden. Es resultierten drei Fraktionen: eine enthielt PTX-1 und PTX-2, eine weitere YTX und 45-OH-YTX und die dritte OA, DTX-1, die 7-O-palmitoyl-Ester von OA und DTX-1 sowie PTX-6 und PTX-2SA. Zum Nachweis der Toxine wurden vier verschiedene stationäre Phasen mit drei unterschiedlichen Eluentensystemen benutzt. Toxine mit Carboxylfunktion wurden als ihre $[M-H]^-$, YTXs als $[M-Na]^-$, und PTX-1 sowie PTX-2 als $[M+NH_4]^+$ -Ionen im MID-Modus nachgewiesen.

Nachdem Methoden zunächst für einzelne Toxine bzw. Toxingruppen (z.B. OA-Gruppe) entwickelt wurden, werden zunehmend zeitsparende Verfahren für die simultane Bestimmung verschiedener Algentoxingruppen etabliert [Quilliam et al., 2001; Hummert et al., 2002; Dahlmann et al., 2003]. Neben Kompromissen bei der Nachweisempfindlichkeit stellt hier vor allem eine alle Analyten umfassende Extraktion und Probenaufarbeitung das Hauptproblem dar [Quilliam, 2003].

2.5.3.2. Kapillarelektrophorese

Als weitere physikalisch-chemische Methode sei die Kapillarelektrophorese genannt. Trotz ihrer prinzipiell hohen Trennkapazität und ihres besonders geringen Probeneinsatzes hat sie bei der Analytik von Algentoxinen bisher kaum Anwendung gefunden, was nicht zuletzt in der geforderten hohen Reinheit der aufzugebenden Proben liegt. Dennoch wurde ihre Kopplung mit der Massenspektrometrie für die Bestimmung von Algentoxinen eingesetzt [Pleasant et al., 1992]. Für die Bestimmung von OA wurde von Bouaicha et al. [1997] die Kapillarelektrophorese mit UV-Detektion benutzt, die allerdings aufgrund der schwachen UV-Absorption von OA nur eine sehr geringe Empfindlichkeit aufwies.

2.5.4. Strategien zur Bestimmung von DTX-3

In der Literatur wird nur vereinzelt über die Möglichkeit, DTX-3 als intaktes Molekül nach Derivatisierung und HPLC-Trennung nachzuweisen, berichtet. Wurde dieser Versuch unternommen, wie z.B. mit dem Reagenz AE-Otf, musste auf chromatographische Vor- und Haupttrennungen mittels zwei Säulen zurückgegriffen werden [Akasaka et al., 1996b]. Der Grund hierfür liegt in der niedrigen Polarität der 7-O-Acyl-Ester [Quilliam, 1995; Vale & Sampayo, 1999].

Bei der LC/MS-Bestimmung der underivatisierten Analyten sind ebenfalls nur wenige Methoden zur Erfassung von DTX-3-Vertretern beschrieben worden [Marr et al. 1992; Goto et al., 2001]. Außerdem stellt das Fehlen von Standardsubstanzen ein gewichtiges Problem dar, denn es sind nur einige wenige DTX-3 Verbindungen als Standardsubstanzen kommerziell erhältlich.

Von der Möglichkeit, diese Toxine zu hydrolysieren und anschließend die jeweiligen Muttertoxine OA, DTX-1 oder DTX-2 nachzuweisen, wird daher häufig Gebrauch gemacht [Suzuki, 1994; Fernandez et al., 1996; Vale & Sampayo, 1999; Vale & Sampayo, 2002]. Vorteilhaft daran ist, dass auch Diol-Ester erfasst werden, denn diese könnten sonst aufgrund der veresterten Carboxylgruppe nicht mit den an der Carboxylgruppe angreifenden Derivatisierungsreagenzien reagieren. Da in der Natur meist ein Gemisch verschiedener 7-O-Acyl-Ester mit Fettsäurekettenlängen im Bereich von 14 bis 22 C-Atomen vorkommt [Yasumoto et al., 1985], ist eine Detektion der einzelnen unhydrolysierten Ester in niedrig belasteten Proben schwierig, denn trotz höherer summarischer Gehalte treten die Einzelsubstanzen in nur geringen Konzentrationen auf.

Die analytische Bestimmung der durch Verseifung freigesetzten Fettsäuren ist zwar ebenfalls prinzipiell möglich [Suzuki, 1994], erweist sich in der Praxis aber aus dem gleichen Grund als diffizil. Wenn die Einzelsubstanzen vor Hydrolyse nur in geringen Konzentrationen vorliegen, entsteht bei der Hydrolyse die gleiche Stoffmenge (in Mol) an Fettsäuren, d.h. es resultieren nur geringe Mengen an Fettsäuren. Zusätzlich sind die gleichen Fettsäuren in der Muschelmatrix bereits vorhanden, so dass zum Nachweis eine signifikante Erhöhung ihrer Menge und nicht allein ein qualitativer Nachweis im Sinne des Vorhandenseins bzw. Nichtvorhandenseins erbracht werden muss. Zwar trifft das letztgenannte Argument auch auf

den Nachweis der Muttertoxine OA, DTX-1 und DTX-2 zu, denn in mit DTX-3 belasteten Proben findet man mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auch das Muttertoxin und evtl. weitere Toxine der OA-Gruppe, aber die Bestimmung einer signifikanten Erhöhung der Konzentration der Muttertoxine ist leichter möglich, da sie eben nur bei (mindestens einem der) drei Analyten (OA, DTX-1 oder DTX-2) nötig ist. Zudem tritt in einer bestimmten geographischen Region meist nur ein einziger Vertreter der drei genannten Muttertoxine auf. Es muss nur die Menge eines Analyten erhöht sein, um DTX-3 bzw. OA-Diolester nachzuweisen.

In der Literatur erfolgt die Extraktion von DTX-3 meist nach der Methode von Lee et al. [1987] mit 4 mL Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) je Gramm Hepatopankreas. Seltener werden 2-Propanol [Akasaka et al., 1996b] oder Aceton [Yasumoto et al., 1985] eingesetzt. Daran schließt sich in der Regel eine Flüssig-flüssig-Verteilung mit Hexan an, um die unpolaren DTX-3-Vertreter von den Muttertoxinen abzutrennen. Fernandez et al. [1996] verdampften die Hexanphase und im Rahmen der Hydrolyse wurde mit 0,5 mL 0,5 N NaOH in Methanol : Wasser (9 : 1; v : v) bei Raumtemperatur 1 Stunde gerührt, anschließend mit 2 mL 0,125 N HCl acidifiziert und die Lösung drei Mal mit 2 mL Chloroform extrahiert, um sie nach Trocknung über Na₂SO₄ und Evaporation der ADAM-Derivatisierung zuzuführen. Bei der Hydrolyse wurden von anderen Autoren z.T. abweichende Mengen und Konzentrationen an methanolischer Natronlauge angewendet und bisweilen bei erhöhter Temperatur (75 °C) verseift; anschließend wurde z.T. Essig- statt Salzsäure zugegeben.

2.6. Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die GPC wurde vor 45 Jahren als Aufreinigungstechnik für biologische Makromoleküle wie Enzyme, Polysaccharide, Nukleinsäuren und Peptide eingeführt [Porath & Flodin, 1959]. Vorteile der GPC sind, dass es sich um eine schonende, zuverlässige und dem Grundprinzip nach sehr einfache Technik handelt.

Der GPC liegen wie bei der Chromatographie zwei Phasen zugrunde, zwischen denen sich ein Verteilungsgleichgewicht der zu trennenden Substanzen einstellt. Das Gel stellt ein heterogenes Zweiphasensystem dar. Die flüssige Phase ist innerhalb der Poren der festen Phase enthalten. Bei den Gelen ist der Bereich der Porengrößen von großer Wichtigkeit, denn die Trennung erfolgt (vorrangig) nach Molekülgröße, indem Moleküle „passender“ Größe in die Poren hineindiffundieren und dadurch länger auf der Säule verweilen. Größere Moleküle dringen weniger tief oder gar nicht in die Poren ein und eluieren infolgedessen schneller. Weitere Kriterien für die Auswahl eines Gels sind u.a. seine chemische und physikalische Stabilität bzw. Inertheit.

Die festen Phasen der Gele werden z.B. durch Quervernetzung von Polymeren gewonnen. Die Polymere können aus gleichen Monomeren (Homopolymere, z.B. Sephadex aus quervernetztem Dextran) oder aus mehreren verschiedenen Grundbausteinen aufgebaut sein. Letztere werden als Copolymere bezeichnet.

Theoretisch ist die Art des Eluenten, (d.h. seine Zusammensetzung innerhalb der Grenzen, die das Säulenmaterial sowie die Analyten vorgeben) unerheblich, weil die Trennung nur von der Größe der zu trennenden Moleküle abhängig sein soll [Pharmacia Biotech, 1997]. In der Praxis hingegen müssen einige Aspekte beachtet werden, die für eine gute Trennung und damit für hohe Wiederfindungsraten von Bedeutung sind.

Bei der Wahl des Eluenten ist zu bedenken, dass sog. unspezifische Wechselwirkungen mit der stationären Phase auftreten können. Besonders kleinere Moleküle, zu denen auch die Substanzen der OA-Gruppe mit Molekulargewichten (MWs) um 1 kDa gerechnet werden müssen, sind häufiger von solchen Wechselwirkungen betroffen, vor allem wenn funktionelle Gruppen

mit der Geloberfläche in Kontakt treten können. Ionische oder hydrophobe Wechselwirkungen (sog. sekundäre Effekte) können die Folge sein.

Enthält die Säule Ionen, so kann wegen Wechselwirkungen zwischen diesen Ionen und den Analyt-Ionen eine reduzierte Wiederfindung aufgrund verringerter bzw. zeitlich verlängerter Elution resultieren. Denkbar sind solche Wechselwirkungen zwischen ubiquitären Alkalimetallionen wie Na^+ oder K^+ und den (ganz oder teilweise deprotonierten) Säureanionen der Toxine. Zur Vermeidung hydrophober Wechselwirkungen wird beispielsweise für stark hydrophobe Peptide der Einsatz von bis zu 70 % iger Ameisensäure empfohlen [Amersham Pharmacia Biotech, 1999].

In der HPLC-Analytik ist bei Proben biologischen Ursprungs die Festphasenextraktion eine weit verbreitete Aufreinigungsmethode. Zwar sind für diese personalintensive, zeitaufwendige und bisweilen schlecht reproduzierbare Technik schon automatisch arbeitende Roboter entwickelt worden, diese sind allerdings aufgrund ihres hohen Preises noch nicht sehr weit verbreitet. Die Anwendung der GPC in Form von (fertig gepackten) Säulen, die einfach mit bestehenden HPLC-Anlagen verbunden werden, welche über automatische Probenaufgabe und Fraktionssammlung verfügen, stellt also einen wesentlichen Fortschritt auf dem Weg zum vollständig automatisierten Analyseverfahren dar.

Die GPC wurde von Hummert et al. [2000a] im Rahmen der Probenvorbereitung eingesetzt, um OA, DTX-1 und DTX-2 aus Muschelextrakten sowie Algenzellen zu bestimmen. Bei der Detektion von OA per LC/MS direkt aus GPC-Eluaten wurden nach Aufreinigung von Muschelextrakten Wiederfindungen um 72 % erreicht. Kastrup [1999] erzielte nach Aufgabe toxinhaltiger, matrixbelasteter Lösungen Wiederfindungen im Bereich von ca. 40 % für OA bzw. DTX-1, wobei die Messung nach BrMB-Derivatisierung, HPLC und Fluoreszenzdetektion erfolgte.

Weiterhin beschrieben Hummert et al. [2000b] die Verwendung der GPC zur Aufreinigung von Cyanobakterienextrakten im Rahmen der Microcystinanalytik.

2.7. Interne Standards zur Bestimmung von OA und DTXs

Interne Standards helfen bei physikalisch-chemischen Verfahren, wie z.B. der Bestimmung nach HPLC-Trennung, möglichst exakte Analysenergebnisse für einen oder mehrere Analyten innerhalb eines Probenaufbereitungsverfahrens zu erhalten. Sie werden in einer bekannten Menge eingesetzt und im Anschluss an die Bestimmung wird ihre Wiederfindungsrate berechnet. Mit internen Standards lassen sich auf diese Weise unvollständige Wiederfindungen nach Extraktion, Aufreinigung und Derivatisierung sowie zufällige Fehler bei der Volumenmessung, Konzentrationsänderungen durch ungewollte Evaporation sowie die Instrumentendrift korrigieren [Quilliam, 1995]. Dazu ist es Voraussetzung, dass sich Analyt und interner Standard weitestgehend in ihren Strukturen gleichen, ohne ein identisches Messsignal, das zudem noch frei von Störungen sein muss, zu ergeben [Quilliam, 1995]. Dies trifft ideal nur bei der Verwendung von isotopenmarkierten Vertretern der eigentlichen Analytsubstanzen zu, welche den Nachteil aufweisen, dass sie oftmals teuer bzw. gar nicht erhältlich sind. Deshalb greift man in der Praxis auf Substanzen zurück, die den Analyten ähneln.

Im vorliegenden Fall von OA und DTXs wurden in der Literatur verschiedene Substanzen als interner Standard beschrieben:

Quilliam [1995] schlug 7-O-Acetyl-OA (vgl. Abbildung 2.12a) als internen Standard vor, welches auf reversed-phase Säulen kurze Zeit nach OA eluiert und sich sowohl nach Derivatisierung als fluoreszenzaktives ADAM-Derivat, als auch massenspektrometrisch nachweisen lässt. Auch Desoxycholsäure (3α , 12α -Dihydroxy- 5β -cholansäure; vgl. Abbildung 2.12b) wurde als interner Standard innerhalb der Probenaufarbeitung zugesetzt [Dickey et al., 1993]. Sie kommt natürlich neben Cholsäure in der Galle von Säugetieren vor [Falbe et al., 1995].

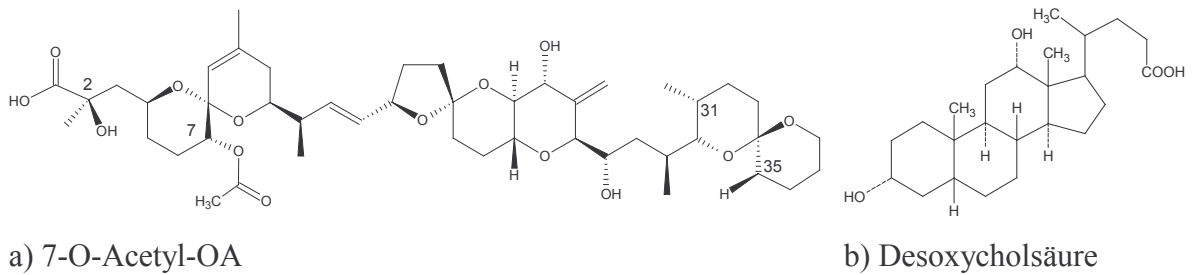


Abb. 2.12: Strukturen von: a) 7-O-Acetyl-OA b) Desoxycholsäure

Weitere denkbare interne Standards sind z.B. OA-Tetraacetat [Swain et al., 1991], bei dem alle freien Hydroxylgruppen der OA als Acetate vorliegen (vgl. Abbildung 2.13a) und 1-nor-Okadaon (vgl. Abbildung 2.13b), welches Proteinphosphatasen nicht inhibiert [Nishiwaki et al., 1990].

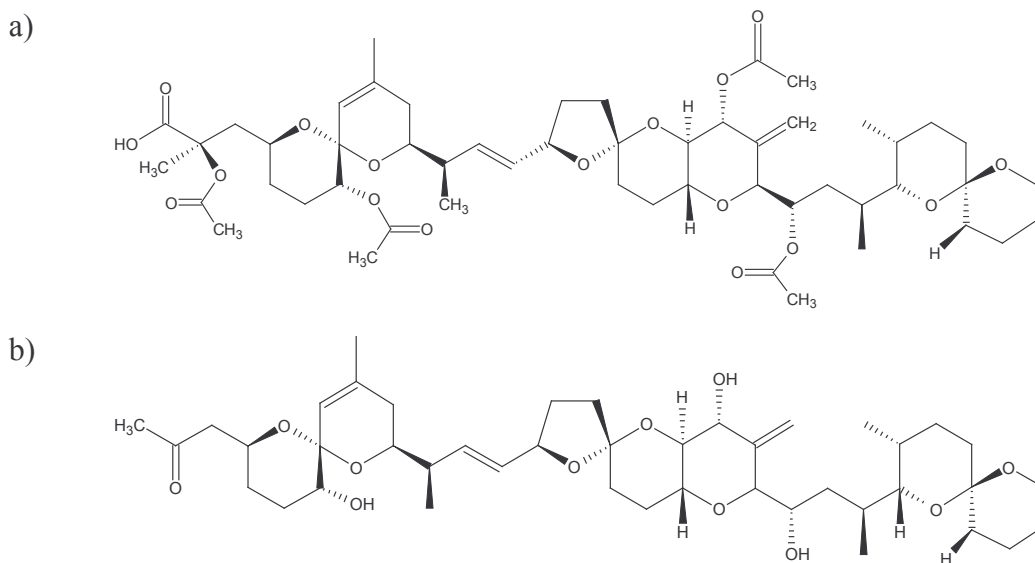


Abb. 2.13: Strukturen von: a) OA-tetraacetat b) 1-nor-Okadaon

Ein anderer Polyether, der kein Derivat der OA darstellt und somit –ähnlich wie Desoxycholsäure– nur eine „entferntere“ Verwandtschaft zu OA und DTXs aufweist, ist Monensin.

Monensin ist ein Polyether-Antibiotikum und Ionophor, welches von dem Bakterium *Streptomyces cinnamonensis* produziert wird. Es wurde zunächst in der Geflügelzucht als Futtermittelzusatz (Kokzidiostatikum) eingesetzt [Falbe et al., 1995]. In Kanada wird es seit 1977 auch bei zur Fleischproduktion vorgesehenen Rindern und seit 2000 zudem an Milchvieh zur Ertragssteigerung angewendet, da es den Energie- und Stickstoffstoffwechsel beeinflusst [Russell, 1997; Duffield & Bagg, 2000]. Die Verwendung von Monensin und anderen Kokzidiostatika in der Tiermast und Milchwirtschaft macht eine Rückstandsüberwachung und –analytik der Lebensmittel zum Schutz des Verbrauchers nötig. Dazu sind u.a. HPLC-Verfahren mit UV- oder Fluoreszenzdetektion nach Derivatisierung sowie LC/MS Methoden entwickelt worden. So berichten z.B. Matabudul et al. [2002] über die Anwendung der LC/MS/MS, um fünf Kokzidiostatika in verschiedenen Matrices nebeneinander nachweisen zu können.

Die Polyetherstruktur des Monensins besteht aus zwei Tetrahydropyran-, drei Tetrahydrofuranringen und weist eine Hemiketal- und eine Ketalfunktion sowie eine Carboxyl- und mehrere Hydroxylgruppen auf (vgl. Abbildung 2.14).

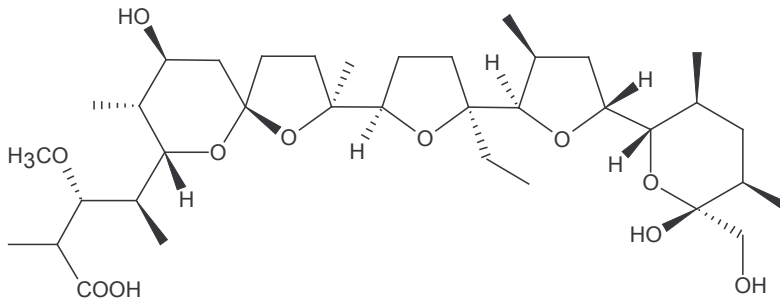


Abb. 2.14: Struktur von Monensin

2.8. Lebensmittelrechtliche Regelungen

Innerhalb der Europäischen Union durften DSP-Toxine entsprechend der Richtlinie 91/492/EWG im Tierversuch nicht nachweisbar sein, um die Eignung von Meeresfrüchten für den menschlichen Konsum sicherzustellen. Der deutsche Gesetzgeber hatte dies in §16 der Fischhygieneverordnung (FischHV) vom 31.03.1994 in Verbindung mit Anlage 3 zu §17 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes (LMBG), Kapitel 2 in nationales Recht umgesetzt. Danach kann der Nachweis von DSP-Toxinen auch mittels eines chemischen Analysenverfahren erbracht werden, wenn mehr als 400 µg DSP pro kg Hepatopankreas ermittelt werden.

Am 15. März 2002 erging durch die EU-Kommission die Entscheidung 2002/225/EG [Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, 2002], mittels derer die Richtlinie 91/492/EWG um weitere Algentoxine, deren Nachweismethoden sowie strengere Grenzwerte ergänzt wurde. Die im Folgenden wiedergegebenen Regelungen sind innerhalb von fünf Jahren nach ihrer Bekanntgabe von den Mitgliedsstaaten in nationales Recht umzusetzen:

Neben OA und DTXs müssen YTXs, PTXs und AZAs in Muscheln, Stachelhäutern, Manteltieren und Meeresschnecken bestimmt werden, wobei die folgenden Grenzwerte je kg Ganzkörper oder einzeln verzehrbare Teile gelten:

- Der Gesamtgehalt an OA, DTXs und PTXs wird auf maximal 160 µg OA-Äquivalent festgesetzt.
- Der YTXs-Gehalt wird auf maximal 1 mg YTX-Äquivalent festgelegt.
- Der Gehalt an AZAs wird auf 160 µg AZA-Äquivalent begrenzt.

Grundsätzlich sollen im Maus-Bioassay jeweils drei Tiere eingesetzt werden, wobei der Tod von mindestens zweier dieser Mäuse innerhalb von 24 Stunden nach Injektion des Extraktes von je 5 g Hepatopankreas oder 25 g Ganzkörper als positiver Nachweis für das Überschreiten der zulässigen Mengen mindestens eines der genannten Toxine angesehen wird. Die zugelassenen Maus-Bioassay-Verfahren unterscheiden sich weiterhin durch die zu verwendenden Extraktionsmittel und die für die Flüssig-flüssig-Verteilung benutzten Lösungsmittel. Der Einsatz eines Aceton-Extraktes ist für die Bestimmung aller Toxine

zugelassen, während bei nachfolgender Flüssig-flüssig-Extraktion mit Diethylether der Nachweis von YTXs und AZAs wegen möglicher Toxinverluste nicht erlaubt ist. Für AZAs wird generell die Ganzkörperuntersuchung vorgeschrieben.

Mit dem Ratten-Fütterungs-Bioassay kann der positive Nachweis für OA, DTXs und AZAs über eine diarrhäische Reaktion mindestens einer von drei eingesetzten Ratten geführt werden.

Als alternative Nachweismethoden werden Immunoassays, funktionale Assays wie der Phosphatase-Inhibitionsassay sowie flüssigchromatographische Verfahren mit fluorimetrischer oder massenspektrometrischer Detektion zugelassen, wobei hier mindestens die folgenden Analoga nachweisbar sein müssen:

- OA und DTXs (DTX-3 evtl. nach Hydrolyse nachzuweisen)
- PTXs: PTX-1 und PTX-2
- YTXs: YTX, 45-OH-YTX, Homo-YTX, und 45-OH-homo-YTX
- AZAs: Azaspirosäure-1, -2, und -3 (AZA1, AZA2 und AZA3)

Die Gesamttoxizität wird auf der Grundlage von Toxizitätsdaten für die einzelnen Toxine mittels Umrechnungsfaktoren berechnet. Auf die Notwendigkeit des Vorliegens von Standards für die chemische Analyse wird in diesem Zusammenhang hingewiesen. Wenn neue, für die öffentliche Gesundheit relevante Analoga bekannt werden, sollen diese in die Analysen mit einbezogen werden.

Falls sich zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Methoden Abweichungen ergeben sollten, wird der Maus-Bioassay als Referenzmethode festgeschrieben.

Die vollständige Umsetzung dieser Richtlinie auf der Basis von chemischen Methoden und/oder den genannten Assays wird große Anstrengungen im Hinblick auf die Produktion von Standardsubstanzen, toxikologische Studien sowie Validierung von Nachweismethoden erfordern. Dennoch stellt diese Richtlinie einen bedeutenden Schritt zur Harmonisierung der Lebensmittelüberwachung in Bezug auf Algentoxine dar [Fernandez et al., 2003b].

2.9. Statistische Prüfverfahren

In der analytischen Chemie tritt –ebenso wie in anderen Wissenschaftsdisziplinen- bei der Messung von Größen unvermeidbar ein Zufallsfehler auf, welcher beim Vergleich von Analysenwerten Berücksichtigung finden muss [Doerfel, 1990]. In der vorliegenden Arbeit ist dazu (in den Datentabellen) neben Mittelwert und Standardabweichung (SD) der Variationskoeffizient (VK), welcher der relativen SD entspricht und sich als Quotient aus SD und Mittelwert ergibt, in Prozent angegeben.

Statistische Tests erlauben anhand einer vorgegebenen statistischen Sicherheit eine objektive und allgemeingültige Interpretation von Analyseergebnissen. So wurde für den Vergleich von Mittelwerten der t-Test angewendet, und zwar in seiner zweiseitigen, ungepaarten Ausführung auf einem Signifikanzniveau von 95 %. Zur Überprüfung, ob sich die Varianzen signifikant unterscheiden, wurde der F-Test benutzt. Beide Tests wurden mit Hilfe des Computerprogramms „Graph Pad Prism 4.0“ durchgeführt. Neben den getroffenen Aussagen bezüglich der Signifikanz von Unterschieden zwischen Mittelwerten bzw. Varianzen sind die von der Software errechneten p-Werte in den Datentabellen zur Orientierung mit angegeben. Wurden im F-Test signifikant unterschiedliche Varianzen festgestellt, so wurde von den (vom Programm automatisch generierten) Aussagen zum Vergleich der Mittelwerte (t-Test) wegen Nichterfüllung der Voraussetzungen des letztgenannten Tests kein Gebrauch gemacht.

In der vorliegenden Arbeit ist die gebräuchliche Form der Kennzeichnung von Signifikanzniveaus benutzt [Köhler et al., 1995]: so kennzeichnet ein Stern („*“) „signifikante Unterschiede“ (95 % Signifikanzniveau), „**“ stehen für „sehr signifikante Unterschiede“ und „***“ für „hochsignifikante Unterschiede“ (99 bzw. 99,9 % Signifikanzniveau).

Will man die Gleichheit (Äquivalenz) zweier Größen auf einem bestimmten (festzulegenden) Signifikanzniveau nachweisen, d.h. dass die beobachteten Unterschiede zwischen ihnen lediglich zufallsbedingt auftreten, kann man das Prinzip des Intervall-Einschlusses („Intervall-Inklusion“) anwenden [Wellek, 1994]. Dabei wird ein beidseitig beschränktes Intervall („Äquivalenzintervall“) vorgegeben, innerhalb dessen sich die Differenz der Größen, z.B. der Mittelwerte bewegen darf, um der Forderung nach Äquivalenz zu genügen. Anschließend wird das Vertrauensintervall („Konfidenzintervall“) für ein bestimmtes Signifikanzniveau P , d.h. mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = (1 - P)$ bestimmt. Liegt das Konfidenzintervall

vollständig innerhalb des vor dem Test festgelegten Äquivalenzintervall, so gilt die Äquivalenz der beiden zu vergleichenden Größen als gegeben [Wellek, 1994]. Die Bestimmung des Konfidenzintervalls ist im Folgenden erläutert:

Sind x_{11}, \dots, x_{1n_1} Realisationen aus der normalverteilten Grundgesamtheit mit der Varianz s_1^2 und x_{21}, \dots, x_{2n_2} Realisationen aus der normalverteilten Grundgesamtheit mit der Varianz s_2^2 , so wird das $(1 - \alpha)$ -Konfidenzintervall für die Differenz der Mittelwerte $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$ nach folgender Gleichung berechnet:

$$(g_u, g_o) = \left(\bar{x}_1 - \bar{x}_2 - t_{f, 1-\alpha/2} \sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{f}} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}, \right. \\ \left. \bar{x}_1 - \bar{x}_2 + t_{f, 1-\alpha/2} \sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{f}} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}} \right)$$

wobei g_u die untere, g_o die obere Konfidenzintervallschranke, $t_{f, 1-\alpha/2}$ das t-Quantil (Anzahl der Freiheitsgrade $f = n_1 + n_2 - 2$) bezeichnet. Diese Gleichung gilt nur bei gleichen Varianzen $s_1^2 = s_2^2$; falls diese Voraussetzung nicht erfüllt ist, gilt die Gleichung

$$(g_u, g_o) = \left(\bar{x}_1 - \bar{x}_2 - t_{f, 1-\alpha/2} \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}, \bar{x}_1 - \bar{x}_2 + t_{f, 1-\alpha/2} \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}} \right)$$

und man berechnet die Anzahl der Freiheitsgrade nach [Vollandt: pers. Mitteilung, 2003]:

$$f_{\text{corr}} = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1-1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2-1)}}$$

Die Bestimmung, ob die Varianzen signifikant unterschiedlich sind, wurde mit Hilfe des F-Tests (vgl. oben) durchgeführt. Die Voraussetzung der Normalverteilung (hier: Gaußverteilung) wurde mit Hilfe des Lilliefors-modifizierten Kolmogorow–Smirnow Tests überprüft [Dallal & Wilkinson, 1986; Doerfel, 1990; Sachs, 2002].

3. Zielstellungen der Arbeit

Die von Kastrup [1999] und Hummert [2000a] eingeführte Aufreinigung der Probenextrakte mit Hilfe der GPC, gefolgt von einer massenspektrometrischen Bestimmung von OA und DTX-1 bzw. HPLC/FLD-Bestimmung in Form ihrer BrMB-Ester, war der Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit. Darauf aufbauend wurden die folgenden Zielstellungen benannt:

1.) Optimierung der GPC zur Aufreinigung OA- bzw. DTXs-haltiger Extrakte

Die GPC sollte optimiert werden, um möglichst hohe Wiederfindungen nach Aufreinigung matrixbelasteter OA- bzw. DTXs-haltiger Proben zu erreichen.

2.) Optimierung der Derivatisierung von Toxinen der OA-Gruppe mit BrMB nach Aufreinigung mittels GPC

Die je nach Detektionsart unterschiedlichen Wiederfindungen legten die Vermutung nahe, dass neben den im Rahmen der GPC auftretenden Verluste auch bei der HPLC/FLD-Bestimmung der BrMB-Derivate von OA und DTX-1 zusätzliche Minderbefunde auftreten. Das Ziel war es also, diese Minderbefunde zu reduzieren, um im Gesamtverfahren -auch nach Fluoreszenzdetektion der BrMB-Derivate- zu einer möglichst hohen Wiederfindung zu gelangen.

3.) Integration von DTX-3 in das Verfahren zur Bestimmung der Toxine der OA-Gruppe

Bislang waren die Vertreter der unter dem Sammelbegriff DTX-3 zusammengefassten 7-O-acyl-Ester nicht in die Probenaufarbeitung mittels GPC und demzufolge auch nicht in die eigentlichen Bestimmungsverfahren HPLC/FLD und LC/MS einbezogen. Deshalb sollte DTX-3 im Rahmen der vorliegenden Arbeit in das Verfahren integriert werden.

4.) Einführung eines internen Standards für die Bestimmung der Toxine der OA-Gruppe

Es sollte ein interner Standard eingeführt werden, der eine Kontrolle der Wiederfindung über alle Schritte des Probenaufbereitungsverfahrens (Extraktion, GPC, ggf. Derivatisierung mit BrMB) mit nachfolgender HPLC/FLD- bzw. LC/MS-Bestimmung ermöglicht. Wie für einen internen Standard notwendig, sollte er eine dem/den Analyt(en) möglichst ähnliche Struktur aufweisen und dennoch im Nachweisverfahren bestimmbar sein. Außerdem sollte er leicht zugänglich, d.h. kommerziell erhältlich sein.

5.) Ausweitung des Verfahrens zur Bestimmung von Toxinen der OA-Gruppe durch Einbeziehung weiterer DSP-Toxine

Aufgrund der steigenden Bedeutung von YTXs und PTXs und wegen ihrer Ähnlichkeit mit OA und DTXs in chemischer Hinsicht (Polyetherstrukturen) war es naheliegend, auch mit diesen DSP-Toxinen belastete Extrakte mit Hilfe der GPC aufzureinigen. Deswegen sollten zunächst Untersuchungen über eine Einbeziehung von YTX in das optimierte Verfahren für die Toxine der OA-Gruppe angestellt werden. Sollte eine gemeinsame Erfassung von OA und DTXs sowie von YTX nicht möglich sein, so waren zunächst getrennte Methoden zu entwickeln, um schnelle (d.h. automatisierbare) und eindeutige Bestimmungsmethoden für OA und DTXs sowie YTX zur Verfügung zu haben.

4. Entwicklung eines Analyseanges für OA und DTXs

4.1. Massenspektrometrische Detektion von OA und DTXs sowie möglicher interner Standards

Zum massenspektrometrischen Nachweis der underivatisierten Algentoxine bzw. von Monensin und Desoxycholsäure mussten zunächst die Polarität der Ionisierung sowie die zu detektierenden Ionen festgelegt werden. Für OA und DTX-1 bot sich die negative Ionisierung mit Bestimmung der Molekülionen $[M - H]^-$ an [Hummert et al., 2000a], wobei der Carboxylgruppe ein Proton entzogen wird. Dadurch wird im Vergleich zur positiven Ionisierung eine größere Nachweisempfindlichkeit erreicht. Da die gleichzeitig zu bestimmenden Substanzen 7-O-palmitoyl-OA, Monensin sowie Desoxycholsäure ebenfalls Carbonsäuregruppen im Molekül enthalten, wurde im Negativmodus ionisiert.

Im Experiment wurde das Applied Biosystems API 165 Massenspektrometer mit atmospheric pressure ionization (API) Einlasssystem und pneumatisch unterstütztem Elektrospray (N_2 , $400\text{ }^\circ\text{C}$) betrieben. Die Ionisationsspannung betrug -3500 V . Im Vergleich zu weiteren erhaltenen Peaks erwiesen sich auch im Falle von 7-O-palmitoyl-OA, Monensin sowie Desoxycholsäure die durch die Molekülionen $[M - H]^-$ verursachten Signale als am intensitätsstärksten. Somit wurden diese in Tabelle 4.1 aufgeführten Ionen für die späteren Messungen im MID Modus als zu überwachende Ionen festgelegt und es war möglich, das Massenspektrometer unter diesen Ionisierungsbedingungen als Detektor für die angeführten Verbindungen einzusetzen.

Tab. 4.1: Ionen und zugehörige m/z-Werte für die massenspektrometrische Detektion von OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA, Monensin und Desoxycholsäure sowie deren Molekulargewichte (MWs)

Nummer	m/z	Ion	M entspricht:	Summenformel	Molekulargewicht (MW) (g mol^{-1})
1	391,5	$[M - H]^-$	Desoxycholsäure	$C_{24}H_{40}O_4$	392
2	669,7	$[M - H]^-$	Monensin	$C_{36}H_{62}O_{11}$	670
3	803,4	$[M - H]^-$	OA	$C_{44}H_{68}O_{13}$	804
4	817,4	$[M - H]^-$	DTX-1	$C_{45}H_{70}O_{13}$	818
5	1042,1	$[M - H]^-$	7-O-palmitoyl-OA	$C_{60}H_{98}O_{14}$	1043

HPLC-Trennung der underivatisierten Analyte an einer C-8-Säule mit nachfolgender MS-Detektion

Zur HPLC-Trennung der (underivatisierten) Analyte OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA sowie Monensin mit nachfolgender massenspektrometrischer Detektion wurde ein C-8 Material in einer 50 mm Säule (Phenomenex Hypersil 3 μ C8 BDS 50 x 2,00 mm, 3 micron) gewählt. Durch ihre kurze Länge und die im Vergleich zu einer Octadecylphase [Hummert et al., 2000a] polaren Eigenschaften erlaubt diese Säule eine Trennung aller o.g. Analyte innerhalb von 25 Minuten.

Als Eluenten wurden Methanol sowie 0,1 M Essigsäure eingesetzt; der Gradient ist in Tabelle 4.2 gegeben. Die Kopplung des benutzten Chromatographen (PE Series 200 Autosampler sowie Series 200 Pump) mit dem Massenspektrometer erfolgte aufgrund der niedrigen Flussrate ohne Aufspaltung des HPLC-Eluatstroms.

Tab. 4.2: Gradient für die Trennung von OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin auf einer C-8-Säule (Phenomenex Hypersil 3 μ C8 BDS 50 x 2,00 mm 3 micron)

Zeit [min]	Methanol [%]	0,1 M Essigsäure [%]	Flussrate [ml min ⁻¹]
0	50	50	0,25
3	80	20	0,25
16	90	10	0,25
20	100	0	0,25
29	100	0	0,25
30	50	50	0,25
45	50	50	0,25

In Abbildung 4.1 ist das Totalionenstromchromatogramm (TIC) einer Standardmischung aus je 2 ng OA, DTX-1, Monensin und 7-O-palmitoyl-OA wiedergegeben:

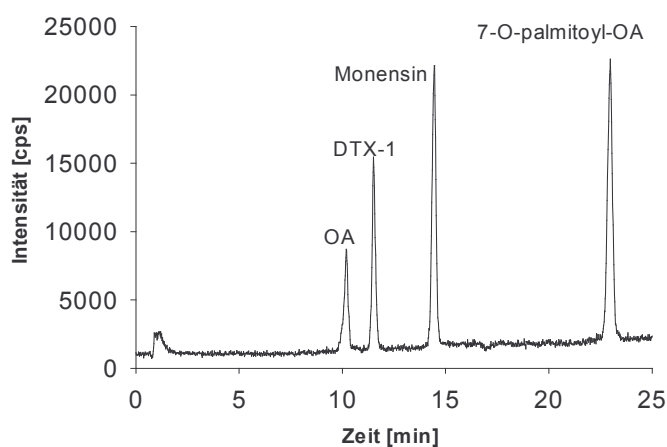


Abb. 4.1: Totalionenstromchromatogramm (TIC) einer Standardmischung aus je 2 ng OA, DTX-1, Monensin und 7-O-palmitoyl-OA nach Trennung mit Hilfe einer C-8-Säule (Phenomenex Hypersil 3 μ C8 BDS 50 x 2,00 mm 3 micron)

Kenndaten zu diesem Bestimmungsverfahren sind in Tabelle 4.3 angegeben.

Tab. 4.3: Kenndaten für die Trennung von OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin mit einer C-8-Säule (Phenomenex Hypersil 3 μ C8 BDS 50 x 2,00 mm 3 micron)

	OA	DTX-1	7-O-palmitoyl-OA	Monensin
Detektionslimit	0,07 ng o.c.	0,05 ng o.c	0,07 ng o.c.	0,03 ng o.c.
Bestimmungsgrenze	0,1 ng o.c.	0,08 ng o.c	0,1 ng o.c.	0,07 ng o.c.
linearer Bereich bis	2 ng o.c.	2 ng o.c	2 ng o.c	2 ng o.c

Durch die niedrige Flussrate von $0,25 \text{ ml min}^{-1}$ konnte der Lösungsmittelverbrauch im Vergleich zur Verwendung von Material größerer Partikeldurchmesser mit Flussraten um $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ [Hummert et al., 2000a] verringert werden. Allerdings ist bei höheren Flussraten mit einer deutlichen Verringerung der Equilibrierungsdauer zu rechnen. Um den Zeitbedarf von 15 Minuten für die Equilibration auf die Ausgangsbedingungen und die Retentionsdauer der Analyte, insbesondere von 7-O-palmitoyl-OA, weiter zu verringern, sollte eine neue Methode unter Einsatz einer stationäre Phase höherer Polarität in solchen Säulen- bzw. Partikeldimensionen, die eine höhere Flussrate erlauben, entwickelt werden.

HPLC-Trennung der underivatisierten Analyte an einer C4-Säule mit nachfolgender MS-Detektion

Im Rahmen der Methodenentwicklung fiel die Wahl auf ein mit kürzeren Alkylketten modifiziertes C4-Material (Jupiter 5 μ C4, 300 Å), welches zudem mit 5 % [Phenomenex, 2003b] eine niedrigere Kohlenstoffbeladung als das zuvor benutzte Hypersil-Material (7 %) aufweist [Phenomenex, 2003a]. Die Länge der Säule (50 mm) wurde beibehalten, aber ihr Innendurchmesser und die Partikelgröße zugunsten höherer Flussraten angepasst (Phenomenex Jupiter 5 μ micron C4, 300 Å 4,6 x 50 mm mit vorgeschalteter Vorsäule Security Guard Cartridge). Die Flussrate betrug nun 0,8 mL min⁻¹. Deshalb war es notwendig, das LC-Eluens vor dem Eintritt in das Massenspektrometer im Verhältnis 1 : 4 aufzuspalten; somit erreichten 20 % des HPLC-Eluates das Massenspektrometer. Der Eluent bestand aus Methanol sowie 0,1 M Essigsäure. In Tabelle 4.4 ist der Gradientenverlauf wiedergegeben.

Tab. 4.4: Gradient für die LC/MS-Bestimmung von OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin auf einer C-4-Säule (Phenomenex Jupiter 5 μ micron C4, 300Å 4,6 x 50 mm)

Zeit [min]	Methanol [%]	0,1 M Essigsäure [%]	Flussrate [ml min ⁻¹]
0	50	50	0,8
1	50	50	0,8
4	80	20	0,8
12	90	10	0,8
13	100	0	0,8
19	100	0	0,8
20	50	50	0,8
28	50	50	0,8

Bereits nach 28 Minuten war die chromatographische Trennung inklusive Equilibration der Säule abgeschlossen und ein neuer Analysenlauf möglich. Der Zeitbedarf je Analyse konnte um ca. 37 % gesenkt werden. Zur Veranschaulichung der HPLC-Trennung ist in Abbildung 4.2 das TIC einer Mischung aus je 3,3 ng o.c. OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA sowie 20 ng o.c. Monensin gezeigt.

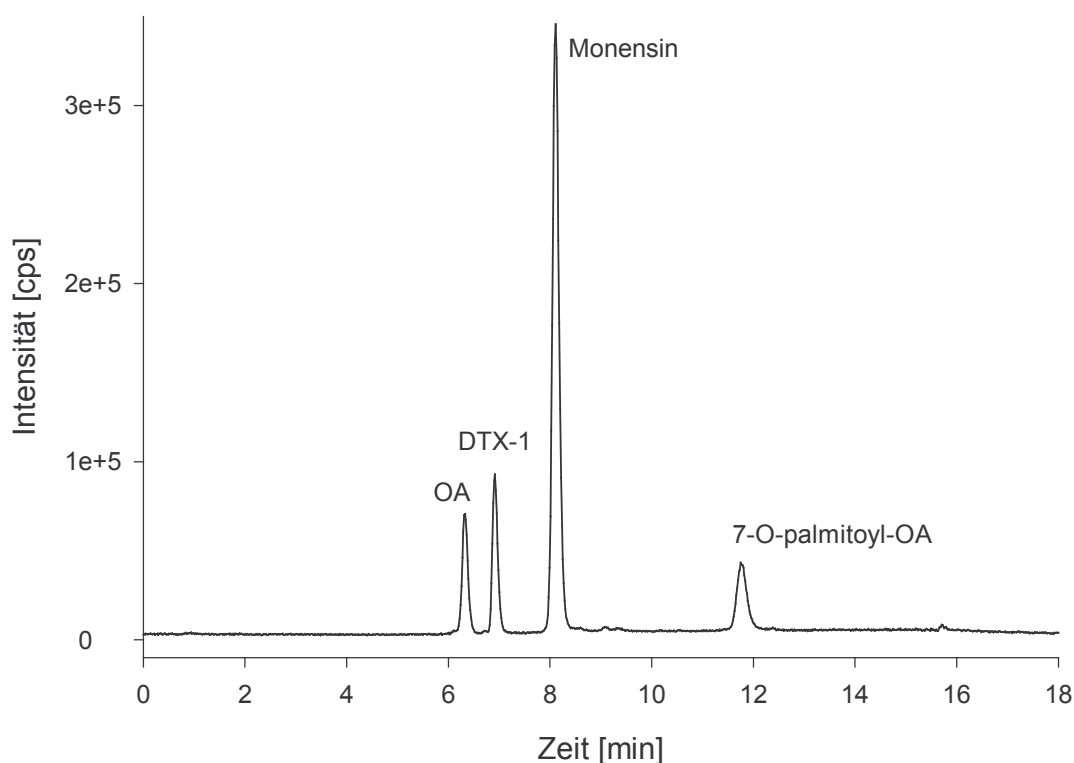


Abb. 4.2: TIC einer Mischung aus je 3,3 ng o.c. OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA sowie 20 ng o.c. Monensin auf einer C-4-Säule (Phenomenex Jupiter 5 μ micron C4, 300 \AA 4,6 x 50 mm)

Validierungsdaten zur Methode sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst. Die Detektionslimits lagen im Bereich derjenigen der Trennung mit der C-8-Säule. Für Monensin war die Methode unter Verwendung der C-8 Säule sogar um den Faktor drei (in Bezug auf Bestimmungsgrenze und Detektionslimit) empfindlicher.

Tab. 4.5: Kenndaten für die LC/MS Detektion von OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin (Säule: Phenomenex Jupiter 5 μ micron C4, 300 \AA 4,6 x 50 mm)

	OA	DTX-1	7-O-palmitoyl-OA	Monensin
Detektionslimit	0,05 ng o.c.	0,05 ng o.c.	0,05 ng o.c.	0,1 ng o.c.
Bestimmungsgrenze	0,1 ng o.c.	0,1 ng o.c.	0,1 ng o.c.	0,2 ng o.c.
linearer Bereich bis	20 ng o.c.	15 ng o.c.	3,3 ng o.c.	20 ng o.c.

4.2. Optimierung der GPC zur Aufreinigung DSP-haltiger Extrakte unter besonderer Berücksichtigung von OA und DTXs

4.2.1. Die stationäre Phase

Für die Trennungen im Rahmen der GPC wurden zwei verschiedene stationäre Phasen getestet: ein Styrol-Divinyl-Copolymer sowie eine Säule auf Agarose-Dextran-Basis.

4.2.1.1. Styrol-Divinyl-Copolymer Säule

Das Styrol-Divinyl-Copolymer (Phenomenex Phenogel 100Å, 300 x 7,8 mm, 4µ) eignet sich für Trennungen im MW-Bereich von 500 bis 6000 Dalton. Eine Reihe organischer Solventien kann eingesetzt werden. Allerdings ist der Wasseranteil in der mobilen Phase auf maximal ein Volumenprozent begrenzt [Phenomenex, 2003c]. Aufbauend auf den von Kastrup [1999] erhaltenen Ergebnissen mit diesem Material wurde als mobile Phase reines Methanol bei einer Flussrate von 1 mL min⁻¹ benutzt.

Die Säule wurde direkt mit dem Massenspektrometer als Detektor verbunden (80 % des LC-Eluates werden nach Aufspaltung des Eluatstroms verworfen). Eine Mischung aus OA und DTX-1 sowie 7-O-palmitoyl-OA Standard wurde injiziert (je 8 ng o.c.). OA und DTX-1 eluierten von 15 bis ca. 22 Minuten (Maximum nach ca. 17 Minuten, starkes Tailing), und für 7-O-palmitoyl-OA lag die Retentionszeit bei ca. 60 Minuten, wobei ebenfalls starke Peakverbreiterung auftrat. Zur Verkürzung der Retentionszeit insbesondere von 7-O-palmitoyl-OA wurde im folgenden Experiment die Flussrate auf 1,4 mL min⁻¹ erhöht. Die erhaltenen Massenspuren für die einzelnen Ionen (single ion current chromatograms) sind in Abbildung 4.3 dargestellt.

Durch die Erhöhung der Flussrate verringerten sich die Retentionszeiten insbesondere von 7-O-palmitoyl-OA, aber auch von OA und DTX-1. Die Elution von OA und DTX-1 erfolgte zwischen 8 und 15 Minuten wiederum gemeinsam, diejenige von 7-O-palmitoyl-OA zwischen 20 und 30 Minuten und damit über einen Zeitraum von 10 Minuten. Aufgrund

dieses langen Elutionszeitraumes war mit einer schlechten Abtrennung der Analyte von Matrixbestandteilen zu rechnen. Außerdem ergäbe sich bei einer Flussrate von $1,4 \text{ mL min}^{-1}$ ein recht großes Eluatvolumen, was ungünstig im Hinblick auf das Einengen der Fraktionen war.

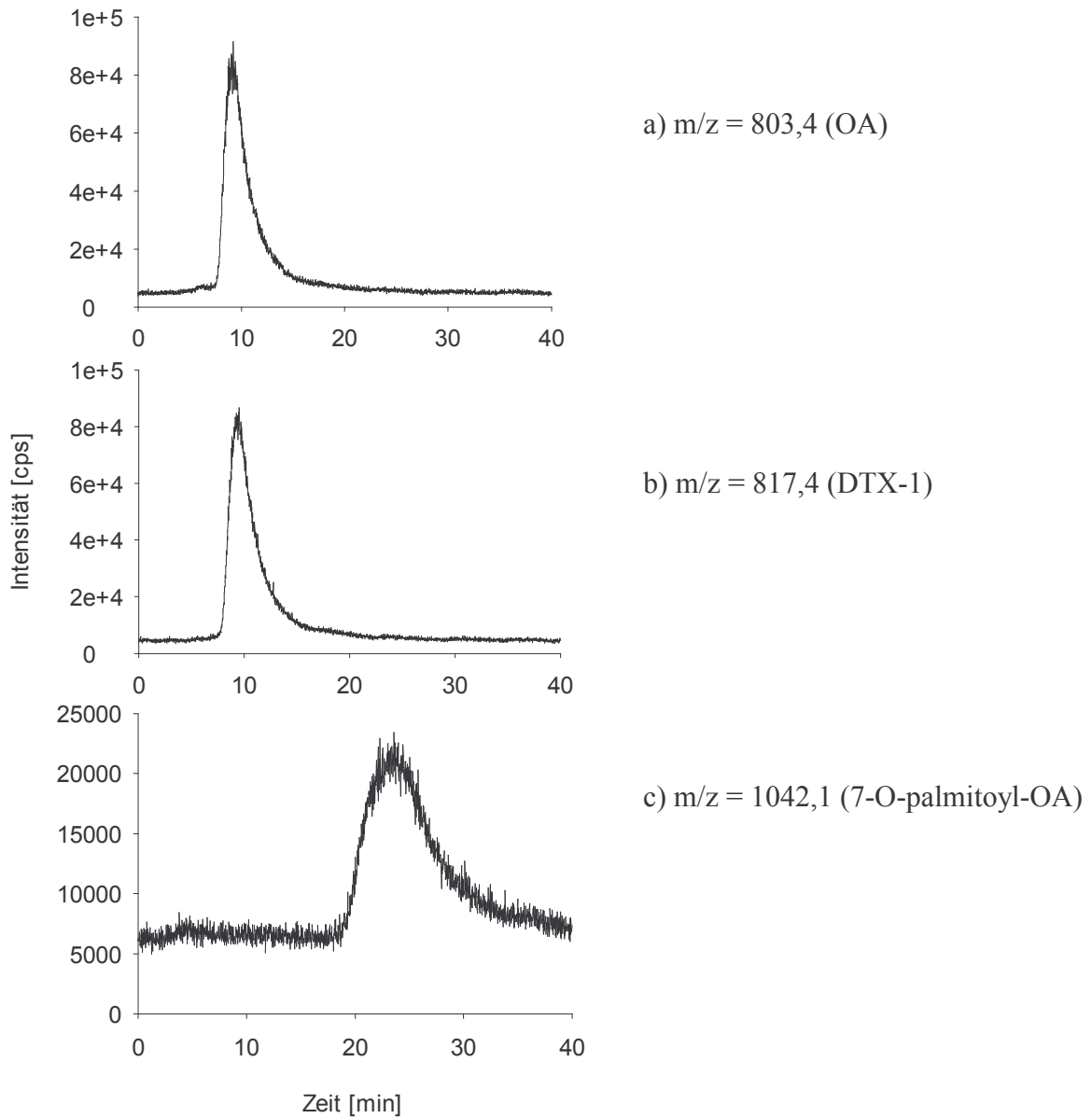


Abb. 4.3: Massenspektren für die Ionen a) $m/z = 803,4$ [OA - H]⁻, b) $m/z = 817,4$ [DTX-1 - H]⁻, sowie c) $m/z = 1042,1$ [7-O-palmitoyl-OA - H]⁻ bei Kopplung der Styrol-Divinyl-Copolymer Säule mit dem Massenspektrometer (Flussrate: $1,4 \text{ mL min}^{-1}$)

Es erschien wünschenswert, alle Analyten innerhalb einer einzigen Fraktion zu eluieren, denn dadurch kann der Elutionszeitraum inklusive seiner zur sicheren Erfassung der Analyte notwendigen Verbreiterungen so kurz wie möglich und damit das später zu evaporierende Volumen möglichst klein gehalten werden. Ein weiteres Argument für die Erfassung aller interessierender Analyte in einem einzigen „Elutionsfenster“ war die anvisierte Anwendung eines internen Standards. Um für Toxine sowie den internen Standard ähnliche Elutionsbedingungen zu gewährleisten, sollten diese möglichst zeitnah eluieren, was durch eine einzige Analytfraktion und maximal eine weitere Fraktion für den internen Standard eher gewährleistet sein dürfte als durch drei oder mehr Fraktionen. Eine gemeinsame Elution aller Toxine inklusive des internen Standards innerhalb einer einzigen Fraktion wäre unter diesem Gesichtspunkt als optimal anzusehen.

4.2.1.2. Agarose-Dextran Säule

Weitere Experimente wurden mit einer Agarose-Dextran Säule durchgeführt. Deren „Superdex“-Material besteht aus einer hochgradig quervernetzten Agarose-Matrix, auf die Dextran-Ketten über kovalente Bindungen aufgepfropft wurden. Solche zusammengesetzten Gele vereinen die günstigen Eigenschaften mehrerer Gel-Systeme und sind deshalb von besonderem Interesse [Pharmacia Biotech, 1997]. Weiterhin bieten sie den großen Vorteil, dass wässrige mobile Phasen eingesetzt werden dürfen, d.h. neben den vermehrten Variationsmöglichkeiten bezüglich der einsetzbaren mobilen Phasen können auch keine Probleme mit wasserhaltigen Lösungen wie z.B. Methanol : Wasser (4 : 1; v : v), die typische Lösungs- und Extraktionsmittel für Algtoxine darstellen, auftreten.

Das „Superdex“-Material kam in Form der Säule „Tricorn Superdex Peptide HR 10/30“ (Säulendimensionen: 300 x 10 mm), ausgestattet mit einem Vorfilter mit 0,5 µm Porenweite (Column Inlet filter, model 7335), zum Einsatz. Als mobile Phase wurde die bereits früher von Hummert et al. [2000a] benutzte Mischung aus Methanol : 0,1 M Essigsäure (13 : 7; v : v) verwendet. Die Flussrate wurde allerdings auf 0,7 mL min⁻¹ gesenkt, um ein Überschreiten des zulässigen Maximaldrucks der Säule sicher auszuschließen. Es wurde eine Mischung aus jeweils 10 ng OA, DTX-1 bzw. 7-O-palmitoyl-OA injiziert, die erhaltenen Massenspuren für die einzelnen Ionen (single ion current chromatograms) sind in Abbildung 4.4 dargestellt:

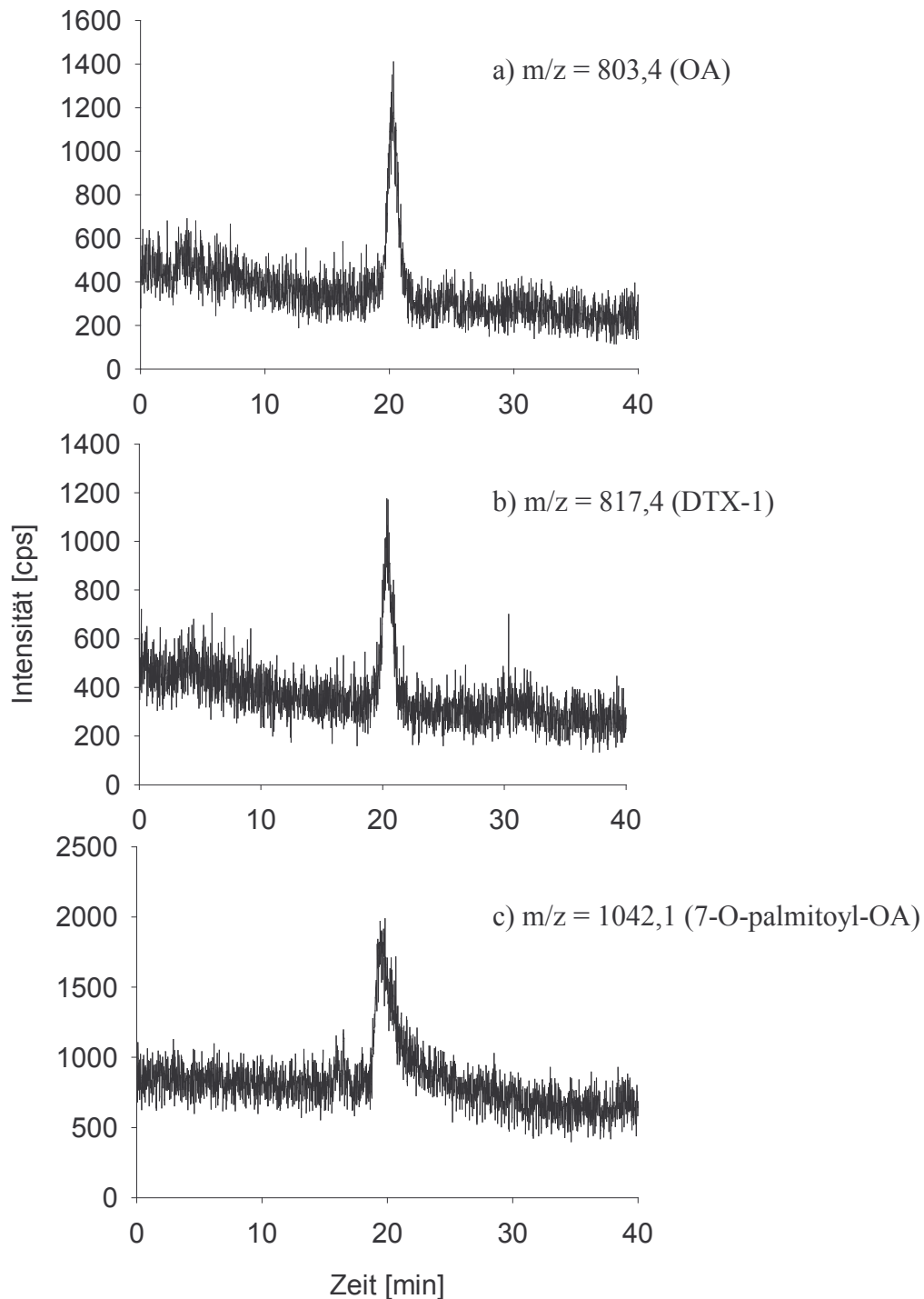


Abb. 4.4: Single ion current chromatograms für die Ionen a) $m/z = 803,4$ $[\text{OA} - \text{H}]^-$, b) $m/z = 817,4$ $[\text{DTX-1} - \text{H}]^-$, sowie c) $m/z = 1042,1$ $[\text{7-O-palmitoyl-OA} - \text{H}]^-$ bei Kopplung der Agarose-Dextran Säule mit dem Massenspektrometer (Flussrate: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$)

Die Retentionszeiten für OA und DTX-1 lagen bei ca. 20,4 Minuten und diejenige für 7-O-palmitoyl-OA bei etwa 19,9 Minuten. Demzufolge waren die Retentionszeitunterschiede ver-

gleichsweise gering, und die Säule eignete sich für die gemeinsame Elution von OA, DTX-1 und 7-O-palmitoyl-OA (als DTX-3-Vertreter) innerhalb einer einzigen Fraktion.

4.2.2. Wahl eines internen Standards

Bei den Vorüberlegungen zur Wahl des internen Standards für OA und DTXs schieden einige der in Kapitel 2.7. vorgestellten Substanzen aufgrund der sich aus der Methodik ergebenden Anforderungen aus. Während 1-nor-Okadaon aufgrund der fehlenden Carboxylgruppe, die für die Derivatisierung mit BrMB zwingend erforderlich ist, von vornherein als ungeeignet angesehen werden muss, können OA-Tetraacetat und 7-O-Acetyl-OA nur angewendet werden, wenn es im Rahmen der Probenaufarbeitung zu keiner Freisetzung von OA aus ihnen, z.B. durch Hydrolyse, kommt. Andernfalls kann nicht mehr zwischen OA aus der Probe bzw. freigesetzt aus dem internen Standard unterschieden werden. Da aber für eine vollständige Erfassung von möglichst vielen Vertretern der DTXs, d.h. auch zur Erfassung von DTX-3, eine Hydrolyse nötig sein kann, empfahl es sich, als internen Standard solche Moleküle auszuwählen, die unter den Bedingungen der Probenaufarbeitung nicht zu Analyten reagieren können. Dieses Kriterium erfüllen z.B. solche Substanzen, deren Grundstruktur sich von OA genügend unterscheidet, ohne gänzlich anders aufgebaut zu sein. Dazu gehören Desoxycholsäure und Monensin.

In den folgenden Schritten wurde die Elution der potentiellen internen Standards Desoxycholsäure und Monensin untersucht, um ihre Eignung im Rahmen der Probenaufarbeitung per GPC zu testen. Dazu wurde die massenspektrometrische Detektion um die Ionen $m/z = 391,5$ für das $[M - H]^-$ -Ion der Desoxycholsäure sowie $m/z = 669,7$, das $[M - H]^-$ -Ion des Monensin, erweitert.

Zunächst wurden 5 ng Desoxycholsäure injiziert. Die Retentionszeit betrug (im Peakmaximum) 25,5 Minuten. Desoxycholsäure eluierte über einen Zeitraum von fünf Minuten (vgl. Abbildung 4.5). Einer Verwendung als internem Standard im Rahmen der GPC stand dies entgegen, denn der Retentionszeitunterschied zu den übrigen Analyten von mehr als vier Minuten würde die zu sammelnde Fraktion stark verbreitern bzw. die Sammlung einer weiteren Fraktion erfordern.

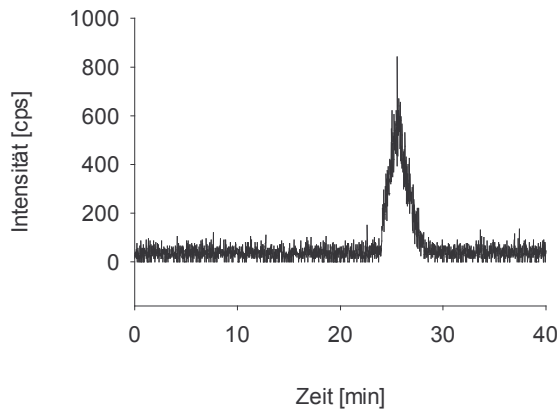


Abb. 4.5: Massenspur für das Ion $m/z = 391,5 [M - H]^-$ ($M = \text{Desoxycholsäure}$) bei Kopplung von Agarose-Dextran Säule und Massenspektrometer (Flussrate: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$)

Bei der Überprüfung von Monensin als möglichem internen Standard wurden 4 ng dieser Substanz injiziert. Deren Retentionszeit betrug 21 Minuten und Monensin eluierte in Form eines vergleichsweise scharfen Peaks innerhalb von ca. 3 Minuten (vgl. Abbildung 4.6). Die Retentionszeit von Monensin lag nicht nur sehr nahe an derjenigen der Analyte OA, DTX-1 und 7-O-palmitoyl-OA, sondern gleichzeitig wies seine schmale Elutionsbande den Vorteil auf, dass die Zeitspanne für die zu sammelnde Fraktion nicht unnötig aufgeweitet wurde, und daraus resultierten kleine Fraktionsvolumina und eine schnellere Evaporation der toxinhaltigen Fraktion.

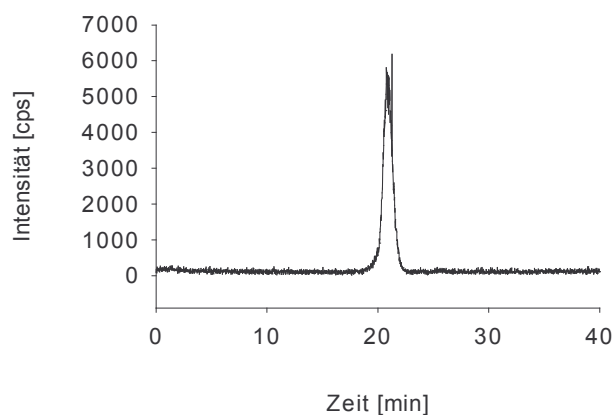


Abb. 4.6: Massenspur für das Ion $m/z = 669,7 [M - H]^-$ ($M = \text{Monensin}$) bei Kopplung der Agarose-Dextran Säule mit dem Massenspektrometer (Flussrate: $0,7 \text{ mL min}^{-1}$)

4.2.3. Optimierung der mobilen Phase der GPC im Hinblick auf die Wiederfindung der Analyte am Beispiel von OA

Nach der Etablierung der Methode unter Verwendung der Agarose-Dextran-Säule, die in der vorliegenden Arbeit von nun an in der GPC ausschließliche Verwendung fand, wurden im nächsten Schritt Messungen zur Wiederfindung der Toxine unternommen, welche aufgrund der beschränkten Verfügbarkeit von DTX-1 und 7-O-palmitoyl-OA allein mit OA durchgeführt wurden.

Dazu wurde die Säule mit einem HPLC-System bestehend aus Pumpe (Gilson Abimed pump 305), Autosampler (Gilson Abimed 234 sampling injector) sowie Fraktionssammler (Gilson Abimed fraction collector 202 mit Steuereinheit Abimed fraction collector 201-202) verbunden. Bei gleichen chromatographischen Bedingungen wie im letzten Experiment wurden in Fünffachbestimmungen jeweils 400 µL eines gefilterten Methanol : Wasser-Extraktes (4 : 1; v : v) aus toxinfreier Muschelmatrix, welcher mit jeweils 40 ng OA versetzt worden war, injiziert. Der Fraktionssammler wurde so programmiert, dass 18,5 Minuten nach der Injektion für 4,2 Minuten („Hauptfraktion“ gewonnen durch Vereinigung zweier Fraktionen [Hauptfraktionen 1 u. -2] von jeweils 2,1 Minuten Länge) das toxinhaltige Eluat aufgefangen wurde. Daran schloss sich jeweils unmittelbar davor und danach die Sammlung einer Vor- bzw. Nachfraktion von jeweils 2,1 Minuten Dauer an.

Bei der Bestimmung des OA-Gehaltes per LC/MS wurden 100 µL des jeweiligen Eluates injiziert. Die Wiederfindungen in der Hauptfraktion lagen mit durchschnittlich 48,4 % ± 4,8 % bei knapp der Hälfte der eingesetzten Menge (vgl. Tabelle 8.1 (Anhang)), während in Vor- und Nachfraktion keine OA nachweisbar war. Da Hummert et al. [2000a] über Wiederfindungen um 70 % berichtet hatten und eine möglichst hohe Wiederfindung generell wünschenswert erschien, wurden Schritte zu ihrer Erhöhung angestrebt. Dazu wurde zunächst die mobile Phase optimiert, im Anschluss daran wurden auch weitere Schritte des Probenaufarbeitungsverfahrens überprüft und verbessert.

Da die Toxine der OA-Gruppe mit MWs um 1 kDa einen hydrophoben Charakter aufweisen und bei den hier durchgeführten Experimenten mit der Matrix Alkalimetallionen wie Na⁺, K⁺ auf die Säule gelangen, bestand die Möglichkeit des Auftretens sekundärer Effekte (vgl. Kapitel 2.6). Um letztgenannte Erscheinungen zu minimieren, hatte sich bei der Trennung von Biomolekülen eine Ionenstärke der mobilen Phase vergleichbar der physiologischen

Konzentration von 0,9 % NaCl im Blut (entspricht rund 150 mM NaCl) z.B. im Menschen, als wirksam erwiesen [Blaicher, 2001]. Normalerweise wird ein Salz, z.B. NaCl, zum Eluenten zugegeben, um diese Konzentration von Ionen einzustellen. Da aber Salze nach der Evaporation der Eluates im Anschluss an die GPC-Reinigung und während der Ionisierung in der LC/MS Kopplung stören würden, wurde eine Erhöhung der Konzentration an gelösten Teilchen durch Zugabe von Essigsäure bevorzugt. Hierdurch konnte mit einem weiteren positiven Nebeneffekt gerechnet werden, denn durch eine einhergehende Erniedrigung des pH-Wertes resultierte gleichzeitig eine stärkere Protonierung der Säureanionen der Toxine und damit eine verringerte Möglichkeit für unerwünschte ionische Wechselwirkungen.

In den folgenden Experimenten wurde eine Konzentration von 150 mmol Essigsäure pro Liter mobile Phase eingestellt, was auf eine Eluentenzusammensetzung von Methanol : 0,43 M Essigsäure (13 : 7; v : v) hinauslief, denn nur 35 Volumenprozent der Mischung bestanden aus (wässriger) Essigsäure. Zu beachten war, dass Essigsäure als schwache Säure in Wasser nicht vollständig dissoziiert, die Teilchenkonzentration also nicht ganz bei 300 mM, d.h. 150 mM für Hydroniumionen + 150 mM für Acetat-Anionen lag.

4.2.3.1. Überprüfung der OA-Wiederfindung nach Erhöhung der Essigsäurekonzentration der mobilen Phase der GPC

Dieser Test wurde mit zwei verschiedenen OA-Konzentrationsbereichen durchgeführt. Zur Simulation hochbelasteter Proben wurden je Injektion 400 ng OA auf die GPC-Säule gebracht und für den niedrigeren Konzentrationsbereich wurden jeweils 20 ng OA benutzt.

In Dreifachbestimmungen wurden jeweils 400 µL einer 400 ng OA enthaltenden Methanol : Wasser Lösung (4 : 1; v : v) („Durchführung ohne Matrix“) der GPC unterzogen, wobei Methanol : 0,43 M Essigsäure (13 : 7; v : v) als mobile Phase diente. Die zuvor benutzte Flussrate und die Zeiträume für die Sammlung der Fraktionen wurden beibehalten. Zusätzlich wurden 400 µL Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) als Blindwert der gleichen Versuchsdurchführung unterworfen wie die mit OA dotierten Proben. In jeweils 100 µL des GPC-Eluates wurde die Menge an OA per LC/MS bestimmt.

Nach Extraktion von 1 g OA- und DTXs-freiem Muschelhepatopankreas mit 2 mL Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) wurde der erhaltene Extrakt über Spritzenaufsatzfilter (0,2 µm Porenweite) filtriert und mit OA dotiert, so dass eine Lösung der OA-Konzentration 1 ng µL⁻¹ resultierte. Das Experiment wurde drei Mal mit je 400 µL davon durchgeführt. Durch die Verwendung von matrixbelastetem Material sollte eine eventuell auf die Anwesenheit von mitextrahierten Muschelbestandteilen zurückzuführende Beeinflussung der OA-Wiederfindung bestimmt werden. Aus technischen Gründen wurden dieses und die nachfolgenden GPC-Experimente unter Verwendung einer anderen HPLC-Anlage durchgeführt, die aus Pumpe (Merck-Hitachi L6200A Intelligent Pump), zugehörigem Autosampler (Merck-Hitachi AS4000 Intelligent Autosampler) nebst Steuereinheit (Merck-Hitachi D-6000 Interface mit Steuerungssoftware Model D-6000 HPLC Manager Version 2) und dem schon zuvor benutzten Fraktionssammler bestand. Deshalb musste mit einer Verschiebung der Zeiträume für die Elution der OA gerechnet werden, und so wurden zusätzlich je eine Kontrollfraktion von 2,1 Minuten Länge vor der Vorfraktion bzw. im Anschluss an die Nachfraktion gesammelt und alle aufgefangenen Eluate einzeln vermessen.

Bei der Durchführung ohne Matrix wurde in der Hauptfraktion eine Wiederfindung von 97,8 % ± 1,5 % erhalten (vgl. Tabelle 8.2 (Anhang)). In Vor- und Nachfraktion war keine OA nachweisbar. Damit konnte so gut wie die gesamte Menge der eingesetzten 400 ng OA, die für die Experimente eingesetzt worden war, wiedergefunden werden. Gleichzeitig ergab sich eine gute Reproduzierbarkeit.

Für die Reinigung von je 400 ng OA enthaltenden Muschelextrakten sind in Abbildung 4.7 die Gehalte der einzeln vermessenen Fraktionen gegen die Retentionszeiten aufgetragen: Vorfraktion (16,4 min bis 18,5 min), Hauptfraktion 1 (18,5 min bis 20,6 min) und -2 (20,6 min bis 22,7 min), Nachfraktion (22,7 min bis 24,8 min) sowie die beiden Kontrollfraktionen (14,3 min bis 16,4 min bzw. 24,8 min bis 26,9 min).

Als Summe der Gehalte der Vor- und Nachfraktion sowie der Hauptfraktionen 1 und -2 wurden 88,3 % ± 3,1 % der eingesetzten OA wiedergefunden (vgl. Tabelle 8.3 (Anhang)), wobei auf die Nachfraktion nur noch ca. 0,5 % der eingesetzten OA-Menge entfielen. In den Kontrollfraktionen war ebenso wie in den GPC-Eluaten des Blindwertes keine OA nachweisbar. Es konnte gezeigt werden, dass die Methode reproduzierbare Ergebnisse für die Wiederfindung liefert.

Die Wiederfindung lag um ca. 10 % niedriger als diejenige der nicht matrixbelasteten Probe. Trotzdem konnte im Vergleich zu den von Hummert [2000a] erzielten Wiederfindungen von knapp über 70 % (maximal 72,8 %) eine deutliche Steigerung erreicht werden.

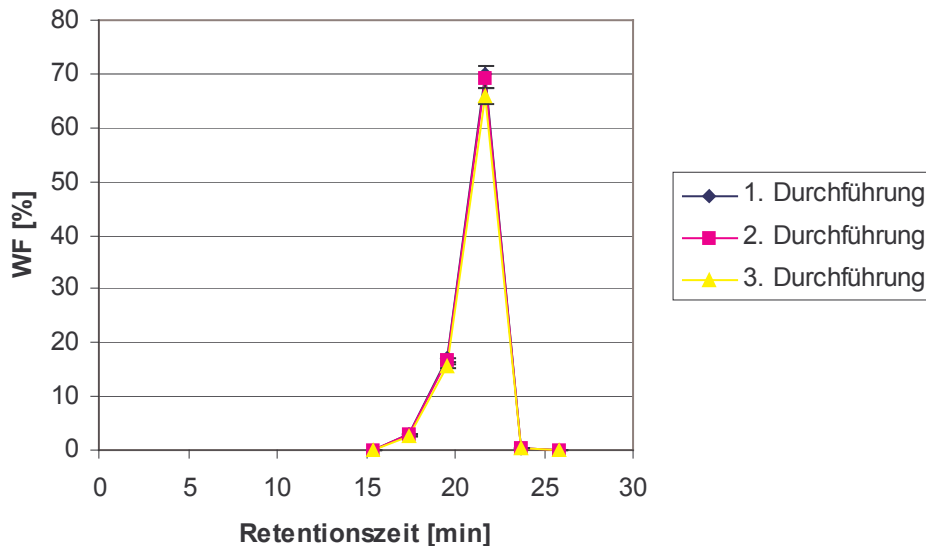


Abb. 4.7: OA-Wiederfindung der verschiedenen Eluatfraktionen bei Anwendung der GPC auf je 400 ng OA enthaltende Muschelextrakte

Für die Überprüfung des Verfahrens im Bereich niedriger OA-Konzentrationen wurden bei ansonsten gleichem Versuchsaufbau je 20 ng OA in drei Mal 400 μ L matrixfreier- bzw. drei Mal matrixhaltiger Lösung eingesetzt.

Die sich ergebenden Wiederfindungen betragen $88,5 \% \pm 0,9 \%$ (Durchführung mit Matrix), bzw. $95,9 \% \pm 4,9 \%$ (Durchführung ohne Matrix) (vgl. Tabelle 8.4 (Anhang)) als Summe der Gehalte in Vor- sowie Hauptfraktion-1 und -2. In allen übrigen Fraktionen einschließlich des Blindwertes war OA nicht nachweisbar. Das Niveau der ermittelten Wiederfindungen war also vollkommen vergleichbar mit denjenigen, die für jeweils 400 ng OA gemessen wurden, und lagen ebenfalls um ca. ein Fünftel über den von Hummert [2000a] gefundenen.

Da weiterhin mit der Kombination aus Merck-Hitachi-HPLC-Apparatur und Gilson-Abimed Fraktionssammler gearbeitet wurde, erfolgte eine Anpassung des Sammelzeitraums daran. Er wurde aus Gründen der verlässlichen Erfassung der Analyte angepasst: die Sammlung begann nun 17,7 Minuten nach Injektion und erfolgt in zwei Schritten (Hauptfraktionen 1 und 2) zu je 2,5 Minuten Länge, so dass eine Gesamtzeit von 5 Minuten resultierte. Unmittelbar davor und

danach wurden Vor- bzw. Nachfraktionen von gleicher Zeit, d.h. 2,5 Minuten, aufgefangen, um die Methode zu überprüfen.

4.2.4. OA-Wiederfindung in auf die GPC folgenden Probenaufarbeitungsschritten

Bisher wurden bei den Bestimmungen der Mengen an OA stets Aliquote der GPC-Eluate direkt, d.h. ohne vorherige Aufkonzentrierung, per LC/MS vermessen. Sollen niedrig belastete Proben vermessen werden, so ist es empfehlenswert, die Eluate durch Entfernen von Lösungsmittel aufzukonzentrieren, um das Detektionslimit so günstig wie möglich zu gestalten. Auch muss die mobile Phase für die Fluoreszenz-Bestimmung der Analyte als BrMB-Derivate entfernt werden, um die (trockenen) Rückstände mit Hilfe der acetonischen Reagenzienlösungen derivatisieren zu können. Es war also zu prüfen, ob und falls ja, in welchem Ausmaß das Einengen die Wiederfindung beeinträchtigt.

Evaporation des OA-haltigen GPC-Eluenten

Zu diesem Zweck wurden in Fünffachbestimmungen jeweils 100 μL eines $0,1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ OA-Standards (gelöst in Methanol : Wasser [4 : 1; v : v]) mit 3400 μL GPC-Eluent (Methanol : 0,43 M Essigsäure [13 : 7; v : v]) gemischt und anschließend bei 40 °C unter Stickstoffstrom im Braunglasvial zur Trockne eingengt. Zur Resuspension der trockenen Rückstände wurden die Vials mit je 1 mL Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) gefüllt und im Ultraschallbad fünf Minuten lang behandelt. Aus den dabei erhaltenen Lösungen wurde OA per LC/MS bestimmt.

Zum Vergleich wurden jeweils 100 μL des $0,1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ OA-Standards (gelöst in Methanol : Wasser [4 : 1; v : v]) unter den gleichen Bedingungen aber ohne Zugabe von GPC-Eluent zur Trockne eingedampft und wieder gelöst, um einen eventuellen Einfluss der bei der GPC eingesetzten mobilen Phase auf mögliche Verluste nachweisen zu können. Auch dieses Experiment wurde in Fünffachbestimmung durchgeführt.

Nach Einengen des Lösungsmittelgemisches, bestehend aus dem Methanol-Wasser-Gemisch sowie dem GPC-Eluenten, wurden $114,9 \% \pm 3,1 \%$ der eingesetzten OA bestimmt, während die Wiederfindung im Vergleichsexperiment ohne Zugabe von GPC-Eluent $113,5 \% \pm 3,0 \%$ betrug (vgl. Tabellen 8.5 bzw. 8.6 (Anhang)). Beide Wiederfindungen lagen sehr dicht

beieinander, woraus man zum einen schließen kann, dass die Anwesenheit des GPC-Eluenten offenbar keinen Einfluss auf die Wiederfindung von OA hat, und zum anderen, dass die Wiederfindung nach Evaporation und Aufnahme mit Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) nicht verringert ist.

Aufnahme von evaporiertem OA-haltigen GPC-Eluent in (simulierten) acetonischen Derivatisierungslösungen

Für die Bestimmung des BrMB-Esters ist es von Bedeutung, ob bei der Derivatisierung bzw. den zugehörigen vorbereitenden Probenaufarbeitungsschritten Verluste an Analyt zu erwarten sind. Deshalb sollte in einem Experiment geklärt werden, ob nach der Resuspension trockener Rückstände mittels Aceton mit ungeschmälerten Analytmengen gerechnet werden kann. Die Aufnahme des Rückstandes erfolgt normalerweise mit Lösungen des Derivatisierungsreagenzes BrMB bzw. organischer Base in Aceton. Aber hier wurde Aceton ohne Zugabe dieser Substanzen benutzt, um die Ausbeute an OA bei der LC/MS-Bestimmung nicht durch die einsetzende Derivatisierungsreaktion von OA zu verringern.

Dazu wurden in Fünffachbestimmung jeweils 100 μL eines $0,1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ OA-Standards (gelöst in Methanol : Wasser [4 : 1; v : v]) mit 3400 μL GPC-Eluent (Methanol : 0,43 M Essigsäure [13 : 7; v : v]) gemischt und wie oben erwähnt in einem 1,8 mL Braunglasvial zur Trockne eingengt. Analog den Bedingungen der BrMB-Derivatisierung wurden die Rückstände mit je 100 μL Aceton aufgenommen und nach Schütteln (Vortex-Mixer: IKA- Works MS1, IKA Works Inc., Wilmington, NC, USA) sowie fünfminütiger Behandlung der Vials im Ultraschallbad für 20 Minuten auf $70 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die acetonische Phase zwecks Entfernung des Lösungsmittels bei Raumtemperatur abgedampft, um anschließend den Rückstand mit je 1 mL Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) aufzunehmen. Die Resuspension mit dem Methanol-Wasser-Gemisch erfolgte mit Unterstützung von Vortex-Mixer und Ultraschallbad (5 Minuten).

Ähnlich wie beim letzten Experiment wurden zu Vergleichszwecken in Dreifachbestimmung jeweils 100 μL des $0,1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ OA-Standards (gelöst in Methanol : Wasser [4 : 1; v : v]) der gleichen Prozedur (mit Ausnahme der Resuspension in Aceton) unterworfen, jedoch wurden die Rückstände direkt in 1 mL Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) aufgenommen und per LC/MS vermessen.

Bei den Vergleichsbestimmungen betrug die Wiederfindung $94,2 \% \pm 2,9 \%$ (vgl. Tabelle 8.7 (Anhang)). Es ist also nach dem Einengen und der Wiederaufnahme noch etwa die gesamte

eingesetzte Menge an OA vorhanden, und die Reproduzierbarkeit kann als gut bezeichnet werden.

Die Wiederfindungen lagen bei den Experimenten mit Aufnahme des Rückstandes in Aceton bei $84,7\% \pm 2,5\%$ und damit knapp 10 % niedriger als im vorangegangenen Vergleichsexperiment (vgl. Tabelle 8.8 (Anhang)). Setzt man die letztgenannte Wiederfindung in Relation zu der in der Vergleichsbestimmung erhaltenen, dann resultiert eine Wiederfindung von $89,9\% \pm 2,6\%$, d.h. gegenüber dem Vergleichsexperiment werden rund neun Zehntel der OA auch nach Aufnahme in Aceton mit anschließendem Wechsel des Lösungsmittels zu Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) wiedergefunden.

Der Lösungsmittelwechsel, d.h. das durchgeführte Einengen des Acetons mit anschließender Resuspension in Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) diente in diesem Experiment allein dazu, die Bestimmung per LC/MS zu ermöglichen, denn wegen der schlechten Mischbarkeit des Acetons mit der mobilen Phase der LC/MS-Bestimmungsmethode gestaltet sich die OA-Bestimmung aus 100 μ L Aceton schwierig.

4.3. Extraktion von OA, DTXs und Monensin aus Muschelmaterial

Detektions- sowie die Bestimmungsgrenzen des Gesamtverfahrens sind u.a. davon abhängig, wie groß die Wiederfindungen bei Extraktionen aus Muschelmaterial sind. Deshalb wurden die Wiederfindungen der Extraktion von OA, DTXs und Monensin anhand von dotiertem Muschelmaterial überprüft. Zwar sind besonders für OA und DTX-1 als am weitesten verbreitete Vertreter der Toxine der OA-Gruppe schon Studien, z.B. von Lee et al. [1987], veröffentlicht worden, und danach werden OA und DTX-1 aus 1 g Muschelhepatopankreashomogenisat quantitativ mit 4 mL Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) extrahiert, aber für DTX-3 und Monensin lag kein umfassendes Datenmaterial vor.

Im Experiment wurden 1,0175 g bzw. 1,0047 g des zuvor als toxisch getesteten Muschelhepatopankreashomogenisats (*Mytilus edulis*, Nordsee, 2001) in Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit je 80 ng Monensin, OA, DTX-1 und 7-O-palmitoyl-OA (als DTX-3-Vertreter) versetzt und gut gemischt. Im Anschluss daran erfolgte die Extraktion mit Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) in mehreren Schritten. Dem dotierten Muschelhomogenisat wurden 0,95 mL Extraktionsmittel zugesetzt, durch Schütteln (Vortexmischer für 60 Sekunden)

gemischt, anschließend 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt und 5 Minuten bei 3500 min^{-1} zentrifugiert. Dieses Extraktionsverfahren wurde drei Mal durchgeführt und die vereinigten Überstände in einem Maßkolben gesammelt. Nach Auffüllen mit dem Extraktionsmittel auf exakt 3 mL und Mischen stellte die erhaltene Lösung die erste Fraktion („1.-3. mL“) dar. Anschließend wurden dem Rückstand 0,95 mL Extraktionsmittel zugesetzt, weiter wie oben behandelt und der Überstand nach Zentrifugation auf 1 mL aufgefüllt (Fraktion „4. mL“ und folgende). Auf analoge Art und Weise wurden die Fraktionen „5. mL“ und „6. mL“ erhalten. Die Extrakte aller genannten Fraktionen wurden durch Spritzenaufsatzfilter mit $0,2 \mu\text{m}$ Porenweite filtriert, um sie von nicht gelösten Partikeln bzw. Schwebstoffen zu befreien, bevor Aliquote ($20 \mu\text{L}$ bzw. $50 \mu\text{L}$) per LC/MS in Dreifachbestimmung vermessen wurden.

Die OA-Wiederfindung (vgl. Tabelle 8.9 (Anhang)) war mit 96,9 % in den ersten drei Millilitern Extrakt (Durchführung A) bzw. 99,1 % (Summe über 1.-3. mL und 4. mL; Durchführung B) praktisch vollständig, wobei der Großteil bereits in den zuerst gewonnenen drei Millilitern Extrakt nachgewiesen werden konnte. Die Standardabweichungen (SDs) der Einzelmessungen beliefen sich auf Werte zwischen 0,3 % und 6,4 %. Für DTX-1 (Tabelle 8.10 (Anhang)) ergab sich eine ähnliche Situation: Auch hier war die aufsummierte Wiederfindung mit 98,9 % (Durchführung A) bzw. 101,6 % (Durchführung B) nach der Extraktion mit dem vierten Milliliter als vollständig zu bezeichnen. Bei den einzelnen Bestimmungen lagen die SDs zwischen 1,1 % und 8,9 %.

Im zuerst gewonnenen Extrakt „1.-3. Milliliter“ konnte kein 7-O-palmitoyl-OA (Tabelle 8.11 (Anhang)) nachgewiesen werden. In den darauffolgenden Extraktionsschritten wurden jeweils bis zu 31,3 % der eingesetzten Menge dieses Analyts bei SDs im Bereich von 0,8 % bis zu 15,3 % gefunden, so dass aufsummierte Wiederfindungen von insgesamt 63,8 % (Durchführung A) bzw. 82,7 % (Durchführung B) bezogen auf jeweils 6 Milliliter Gesamtextrakt resultierten.

Die bei der Extraktion von Monensin erreichten aufsummierten Wiederfindungen (Tabelle 8.12 (Anhang)) lagen –bzgl. vier Milliliter (Durchführung A) bzw. sechs Milliliter Gesamtextrakt- im Durchschnitt um 81 %, wobei im ersten Extrakt (1.-3. mL) ca. zwei Drittel des eingesetzten Monensin, anschließend je um 10 % (4. mL) bzw. um 4 % (5. mL und 6. mL) herausgelöst wurden. Die SDs für die einzelnen Messungen lagen zwischen 0,8 % und 7,8 %.

OA und DTX-1 wurden praktisch vollständig wiedergefunden. Die Wiederfindung des Monensin als internem Standard lag zwischen derjenigen von OA sowie DTX-1 einerseits und derjenigen von 7-O-palmitoyl-OA andererseits. Bei der Extraktion verhielt sich 7-O-palmitoyl-OA offenbar deutlich anders als OA und DTX-1, denn während letztere bereits in den ersten Extraktionsschritten nahezu vollständig aus dem Muschelmaterial herausgelöst wurden, schien dabei kein bzw. nur eine geringe unter dem Detektionslimit liegende Menge an 7-O-palmitoyl-OA extrahiert worden zu sein. Erst später gingen jeweils größere Mengen dieser Substanz in die flüssige Phase über und waren detektierbar.

Die Gründe dafür liegen in der unterschiedlichen chemischen Natur der Analyte: Der Fettsäurerest als wesentliches Unterscheidungsmerkmal von 7-O-palmitoyl-OA im Vergleich zu OA bzw. DTX-1 macht das Molekül stärker lipophil, so dass die Extraktion mit dem vergleichsweise polaren Methanol-Wasser-Gemisch offenbar nicht ideal verläuft. Die Tatsache, dass erst im Anschluss an die dreimalige Behandlung mit je 1 mL Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) im darauffolgenden Extrakt DTX-3 nachweisbar war, lässt vermuten, dass zunächst andere lipophile Substanzen in die flüssige Phase übergangen, bevor in den darauffolgenden Schritten 7-O-palmitoyl-OA mit frischem Extraktionsmittel herausgelöst werden konnte. Weitergehende Untersuchungen, insbesondere zur Steigerung der Wiederfindung von 7-O-palmitoyl-OA waren aus Mangel an Standard bzw. Zeit nicht möglich.

Die Extraktion mit Aceton [Yasumoto et al., 1985] weist den Nachteil auf, dass hierbei sehr viel mehr unerwünschte Begleitstoffe, wie Fette und andere unpolare Lipide mitextrahiert werden [Quilliam, 2003], deren Abtrennung von den Analyten durch die GPC fraglich ist.

Für weitere Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurde daher das Extraktionsverfahren mit einem Gesamt-Extraktionsmittelvolumen von 6 mL Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) angewendet.

4.4. Bestimmung von OA, DTXs sowie Monensin nach Derivatisierung mit 3-Brommethyl-7-methoxy-1,4-benzoxazin-2-on (BrMB)

4.4.1. Bestimmung der BrMB Derivate nach HPLC-Trennung und Fluoreszenzdetektion (HPLC/FLD)

Aufbauend auf einer von Kastrup [1999] angewendeten chromatographischen Methode zur Trennung von OA und DTX-1 in Form ihrer BrMB-Derivate wurde der Gradient modifiziert und um die HPLC-Trennung der BrMB-Ester von 7-O-palmitoyl-OA sowie Monensin erweitert.

Die Derivate wurden an einer C18 reversed phase Säule (Phenomenex Luna 3 μ C18 (2), 150 x 4,6 mm mit Vorsäule Phenomenex Luna 3 μ C18 (2), 30 x 4,6mm) bei einer Flussrate von 1,2 mL min⁻¹ und einer Säulentemperatur von 35 °C (Säulenofen) getrennt. Der Gradient, bestehend aus Acetonitril, Methanol sowie 0,01 M Essigsäure (versetzt mit 10 mg L⁻¹ Natriumazid gegen Bakterienbefall) ist in Tabelle 4.6 wiedergegeben.

Tab. 4.6: Gradient für die HPLC/FLD-Bestimmung der BrMB-Derivate von OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin

Zeit [min]	Acetonitril [%]	Methanol [%]	0,01 M Essigsäure [%]
0	53	16	31
9	53	16	31
20	60	16	24
28	60	16	24
50	90	0	10
70	100	0	0
85	100	0	0
86	53	16	31
95	53	16	31

Es kam ein Merck-Hitachi Chromatograph, bestehend aus Pumpe (L-6200A Intelligent Pump), Autosampler (AS 4000 Intelligent Autosampler), Säulenofen (L 5025 Column Thermostat) und Steuereinheit (D-6000 Interface mit Steuersoftware Model D-6000 HPLC Manager Version 2) zum Einsatz. Die Detektion erfolgte mit dem Fluoreszenzdetektor Techlab RF 551 Spectrofluorometric Detector bei einer Anregungswellenlänge von

$\lambda_{\text{Ex}} = 345 \text{ nm}$ und einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{\text{Em}} = 440 \text{ nm}$. Wie im Chromatogramm (vgl. Abbildung 4.8) ersichtlich, eluieren die BrMB-Derivate von OA nach 19 Minuten, DTX-1 nach 29 Minuten, Monensin nach 50 Minuten und 7-O-palmitoyl-OA nach 79 Minuten.

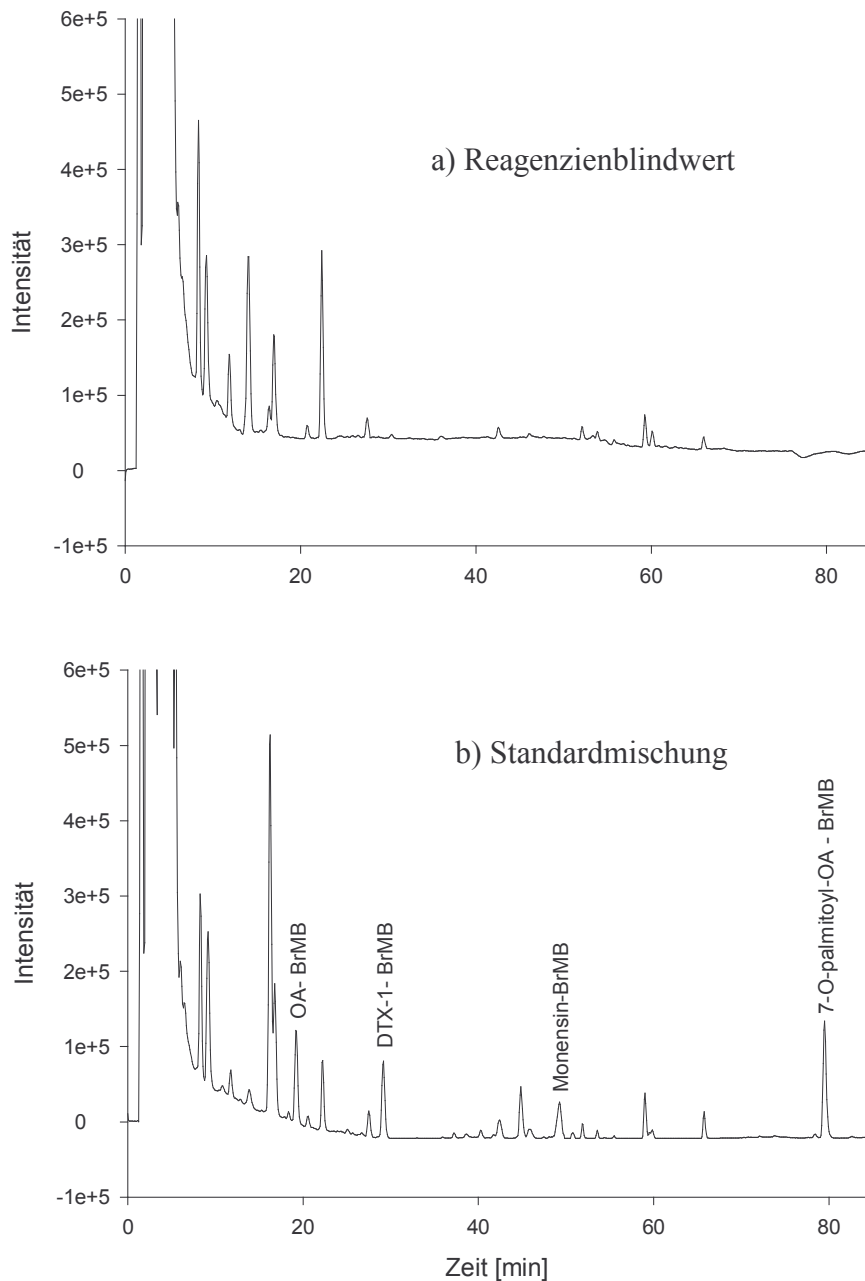


Abb. 4.8: Fluoreszenzchromatogramme nach Trennung der BrMB-Derivate a) eines Reagenzienblindwertes bzw. b) einer Standardmischung bestehend aus je 2,5 ng o.c. OA bzw. DTX-1, 7,5 ng o.c. Monensin und 15 ng o.c. 7-O-palmitoyl-OA

Während der Gradient innerhalb der ersten 28 Minuten dieser chromatographischen Trennmethode mit der von Kastrup [1999] vorgeschlagenen übereinstimmt, musste für die Trennung von Monensin sowie 7-O-palmitoyl-OA in Form ihrer BrMB-Ester eine Weiterentwicklung durchgeführt werden. Im Mittelpunkt stand dabei das Bestreben, störungsfreie Analytenpeaks zu erhalten. Insbesondere bei der Anwendung auf Derivate aufgereinigter Muschelextrakte wurden bei schnellerem Anstieg des organischen Anteils mit dem Ziel einer Verkürzung der Retentionszeit des BrMB-Esters von Monensin Koelutionen mit anderen Peaks beobachtet, so dass eine Verkürzung der Retentionszeit zu Lasten einer störungsfreien Elution des internen Standards gegangen wäre und davon Abstand genommen wurde.

Für die Bestimmung von OA und DTX-1 neben Monensin kann die chromatographische Trennung nach der Elution von Monensin abgebrochen und sofort im Anschluss der Spülschritt mit Acetonitril eingeleitet werden. Dadurch verkürzt sich die Trennung auf 50 Minuten bzw. inklusive Spülschritt und Reequilibration der Säule unter Anfangsbedingungen auf 77 Minuten.

Zur Überprüfung des Verfahrens wurden verschiedene Mengen (zwischen 0,1 ng o.c. und 50 ng o.c.) an OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA sowie Monensin derivatisiert und per HPLC/FLD vermessen, um Angaben über Kenndaten der Methode zu erhalten (Tabelle 4.7).

Tab. 4.7: Kenndaten für die HPLC/FLD Detektion von OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin als BrMB-Derivate

	OA	DTX-1	7-O-palmitoyl-OA	Monensin
Detektionslimit	0,1 ng o.c	0,1 ng o.c	0,1 ng o.c	0,1 ng o.c.
Bestimmungsgrenze	0,2 ng o.c	0,15 ng o.c	0,2 ng o.c	0,15 ng o.c.
linearer Bereich bis	40 ng o.c.	40 ng o.c.	40 ng o.c.	40 ng o.c.

4.4.2. Bestimmung der BrMB Derivate mit Hilfe der LC/MS-Kopplung

Um die Identität der Analytenpeaks in den recht komplexen HPLC/FLD-Chromatogrammen abzusichern, wurde die Anwendung der vorgestellten Trennung auf ein HPLC-System mit einer alternativen von der Fluoreszenz unabhängigen Detektionsart angestrebt.

Dafür bot sich das Massenspektrometer als Detektor an, denn die für die Fluoreszenzdetektion etablierte chromatographische Trennung war aufgrund des Fehlens nichtflüchtiger Eluentenbestandteile mit dem Massenspektrometer kopplungsfähig.

Für die Experimente wurde das Applied Biosystems API 165 Massenspektrometer mit dem atmospheric pressure ionization (API) Interface und pneumatisch unterstütztem Elektrospray unter Verwendung von auf 450 °C heißem Stickstoff betrieben. Die Ionisationsspannung betrug +5500 V.

Im Rahmen der Direktinjektionen der BrMB-Derivate der Einzelsubstanzen wurden die m/z-Werte der Ionen für die späteren Messungen im MID Modus bestimmt. Es zeigte sich, dass neben den Molekülonen $[M + H]^+$ die $[M - H_2O + H]^+$ sowie $[M - 2 H_2O + H]^+$ -Ionen der BrMB-Derivate der Algentoxine nachweisbar waren. Für den Monensin-BrMB-Ester wurden als intensivitätsstärkste Peaks diejenigen von $[M + Na]^+$ sowie $[M - 2 H_2O + H]^+$ gefunden. Das $[M - H_2O + H]^+$ -Ion trat nur mit einer sehr geringen Intensität auf. Die für den MID Mode gewählten m/z-Werte sind in Tabelle 4.8 aufgeführt.

Tab. 4.8: Ionen und zugehörige m/z-Werte für die massenspektrometrische Detektion der BrMB-Derivate von OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin sowie deren MWs

Nummer	m/z	Ion	M entspricht:	MW (g mol ⁻¹)
1	824,7	$[M - 2 H_2O + H]^+$	Monensin-BrMB-Ester	859,7
2	882,7	$[M + Na]^+$		
3	958,8	$[M - 2 H_2O + H]^+$	OA-BrMB-Ester	993,8
4	976,8	$[M - H_2O + H]^+$		
5	994,8	$[M + H]^+$		
6	972,8	$[M - 2 H_2O + H]^+$	DTX-1-BrMB-Ester	1007,8
7	990,8	$[M - H_2O + H]^+$		
8	1008,8	$[M + H]^+$		
9	1197,5	$[M - 2 H_2O + H]^+$	7-O-palmitoyl-OA-BrMB-Ester	1232,5
10	1215,5	$[M - H_2O + H]^+$		
11	1233,5	$[M + H]^+$		

Bei der Anwendung der im vorangehenden Kapitel beschriebenen HPLC-Trennung zusammen mit nachfolgender massenspektrometrischer Detektion wurden über einen Split 20 % des Eluatstroms in das MS überführt. Eine Mischung aus den BrMB-Derivaten der o.a. Substanzen wurde injiziert. Ein typisches TIC ist in Abbildung 4.9 gezeigt.

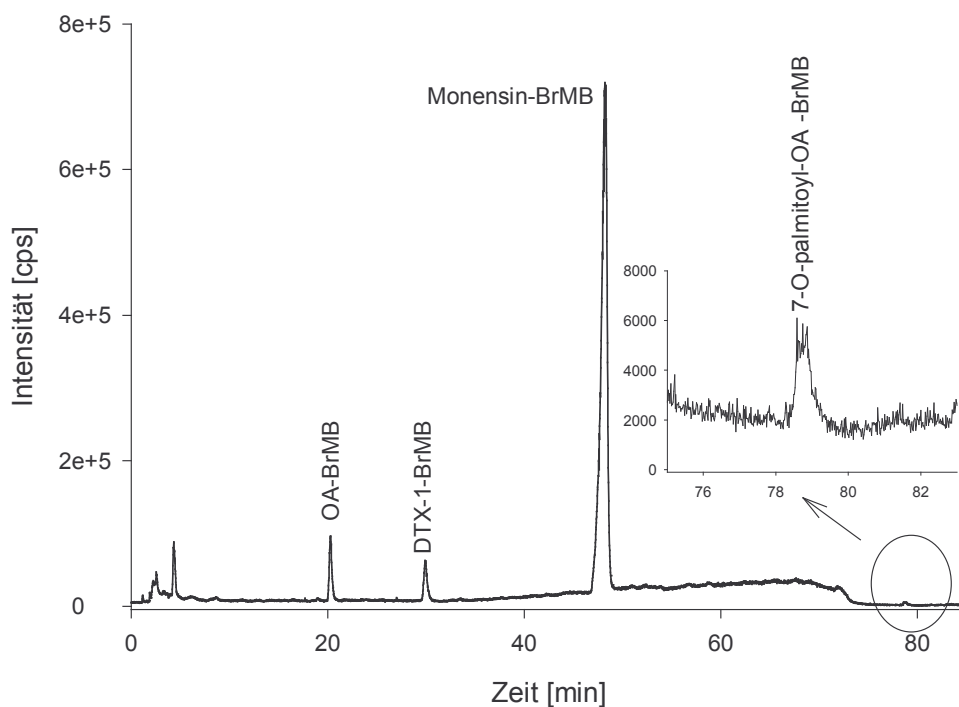


Abb. 4.9: LC/MS-TIC einer Reaktionslösung mit je 20 ng o.c. OA, DTX-1 bzw. 7-O-palmitoyl-OA sowie 2 ng o.c. Monensin als BrMB Derivate

Die Absicherung der HPLC/FLD-Bestimmung mit Hilfe der LC/MS-Kopplung verlief erfolgreich. Um Angaben über die Nachweisgrenzen der LC/MS-Detektion zu erhalten, wurden verschiedene Mengen an BrMB-Derivaten vermessen, die Ergebnisse sind in Tabelle 4.9 zusammengefasst:

Tab. 4.9: Kenndaten für die LC/MS Detektion von OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin als BrMB-Derivate

	OA-BrMB-Ester	DTX-1-BrMB-Ester	7-O-palmitoyl-OA-BrMB-Ester	Monensin-BrMB-Ester
Detektionslimit	0,3 ng o.c	0,3 ng o.c	1,0 ng o.c	0,03 ng o.c.
Bestimmungsgrenze	0,5 ng o.c	0,5 ng o.c	1,5 ng o.c	0,05 ng o.c.
linearer Bereich bis	20 ng	20 ng o.c.	40 ng	2 ng o.c.

4.4.3 Optimierung der Derivatisierungsbedingungen

Experimente zur Derivatisierung mit verschiedenen Basen als Katalysatoren wurden durchgeführt. Dabei sollte sich vor allem eine möglichst große Signalintensität (bzw. Signal-zu-Rausch-Verhältnis) für die Analytenpeaks ergeben. Durch Kastrup [1999] wurden bereits Untersuchungen in dieser Richtung vorgenommen. Von den vier durch ihn getesteten Basen Triethylamin, Hünig-Base (N,N-Diisopropylethylamin), Pyridin und 4-Dimethylaminopyridin erwiesen sich die beiden erstgenannten als am besten geeignet, wobei die Wahl aufgrund der besseren Peaksymmetrie auf Triethylamin fiel.

Für die Experimente wurden je 50 ng OA und DTX-1 eingesetzt. Es wurde a) mit 100 μL 10 μM Hünig-Base in Aceton, b) mit 100 μL 10 μM Triethylamin in Aceton bzw. c) mit 100 μL 5 μM Triethylamin und 5 μM Hünig-Base Mischung in Aceton, jeweils unter Zugabe von 100 μL 1 mg mL^{-1} BrMB in Aceton derivatisiert. Die Reaktionsmischungen wurden für 20 Minuten auf 70 $^{\circ}\text{C}$ erhitzt und nach zehnminütigem Abkühlen auf Raumtemperatur je 20 μL injiziert. Nach 90 und 180 Minuten Standzeit der Proben bei Raumtemperatur wurde erneut injiziert, um die Zeitstabilität des Fluoreszenzsignals zu untersuchen.

Die ermittelten Peakflächen von je 5 ng o.c. OA sowie DTX-1 für die Derivatisierung mit unterschiedlichen Basen sind in Abbildung 4.10 in Abhängigkeit von der Standzeit aufgetragen (vgl. Tabellen 8.13a und 8.13b (Anhang)):

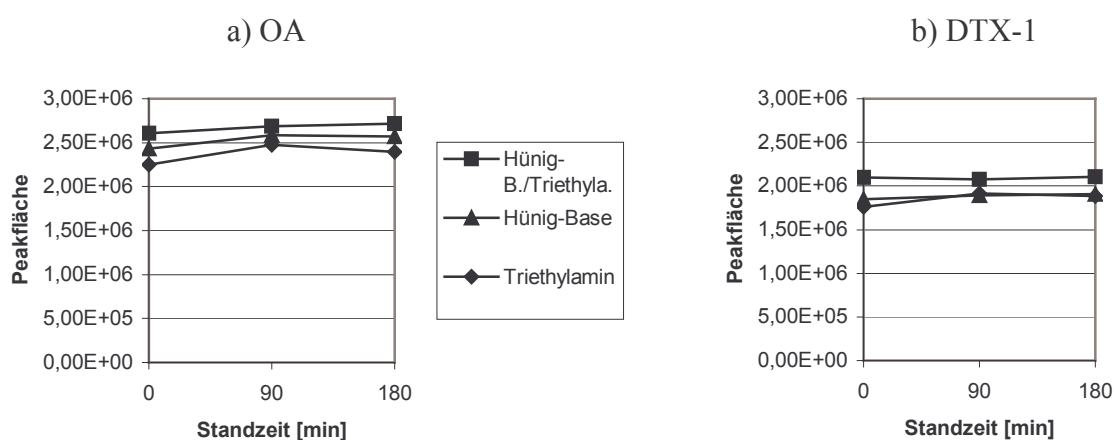


Abb. 4.10: Peakflächen von a) OA bzw. b) DTX-1 als BrMB-Derivate in Abhängigkeit von der Standzeit bei Verwendung unterschiedlicher Basen zur Derivatisierung

Es zeigte sich, dass sowohl für OA als auch für DTX-1 die Peakflächen bei der Derivatisierung mit dem Gemisch aus 5 μ M Hünig-Base und 5 μ M Triethylamin am größten waren. Die Peakflächenunterschiede bewegten sich im Bereich von 4 bis 16 %; d.h. bei OA betrug die kleinste gemessene Fläche (Derivatisierung mit Triethylamin) noch 86 % des Wertes für die Derivatisierung mit der Mischung der beiden Basen. Bei DTX-1 wurden entsprechend mindestens 84 % des Maximalwertes bestimmt. Deshalb wurde im Folgenden statt der von Kastrup vorgeschlagenen 10 μ M Triethylaminlösung die äquimolare Mischung aus gleichen (molaren) Teilen Triethylamin und Hünig-Base eingesetzt. Kastrup [1999] hatte berichtet, dass die Signalintensitäten bei Nutzung von acetonischer Triethylamin- bzw. Hünig-Basenlösung jeweils in etwa untereinander vergleichbar waren, wenn bei der Derivatisierungsreaktion auf 50 °C erhitzt wurde. Diese Aussage konnte für die hier gewählten Bedingungen (Derivatisierung bei 70 °C) bestätigt werden. Kastrup arbeitete allerdings nicht mit Mischungen der Basen.

Aus Abbildung 4.10 ist auch ersichtlich, dass sich die Größe der Peakflächen bei der jeweiligen Derivatisierungsmethode nur unwesentlich nach 90 bzw. 180 Minuten geändert hat. Hier offenbarte sich ein weiterer Vorteil der Derivatisierung mit der Mischung der beiden Basen, denn die Abweichung der Peakflächen betrug maximal 4,2 % (OA) bzw. 1,1 % (DTX-1) vom Anfangswert, während bei der Verwendung von Triethylamin 9,8 % (OA) bzw. 8,9 % (DTX-1) und bei Hünig-Base 6,3 % (OA) und 3,0 % (DTX-1) zu verzeichnen waren. Das Fluoreszenzsignal ist also über längere Zeiträume stabil, so dass auch bei Standzeiten im Autosampler bei Raumtemperatur nicht mit einer deutlichen Änderung der Signalintensität zu rechnen ist.

Optimierung der Derivatisierung im Anschluss an die GPC

Nachdem Kastrup Wiederfindungen unter 40 % bei HPLC/FLD-Bestimmungen nach GPC-Aufreinigung bestimmt hatte [1999], wurden Experimente zur Steigerung der Wiederfindung nach Derivatisierung von OA im Anschluss an die GPC durchgeführt. Durch Vergleich der OA-Wiederfindungen nach Einengen von dotiertem GPC-Eluent sowie von dotierten GPC-Eluaten, erhalten nach Aufarbeitung von Muschelextrakten bzw. von Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) konnte geklärt werden, dass die niedrigen Wiederfindungsraten durch den GPC-

Eluenten selbst verursacht wurden (Daten nicht gezeigt). Nach Einengen von 3,5 mL GPC-Eluent und Wiederaufnahme in Wasser wurde der pH-Wert mittels pH-Meter (WTW Multical pH-Meter pH526, Wissenschaftlich-technische Werkstätten) ermittelt. Er betrug $\text{pH} = 5,4$, d.h. durch das Einengen war nicht die gesamte Essigsäure entfernt worden. Da die Derivatisierungsreaktion basenkatalysiert abläuft, lag es nahe, dass die Essigsäurereste die Reaktion störten.

Zur Neutralisation wurde verdünnte Natronlauge zum GPC-Eluent zugegeben, was zum Auskristallisieren von Salz während des Einengens und nach der anschließenden Derivatisierung zu sehr niedrigen Wiederfindungen um 10 % führte (Daten nicht gezeigt). Schließlich gelang es, die OA-Wiederfindung zu steigern, indem während des Einengens abwechselnd gleiche Volumina Methanol bzw. Lösung von OA im GPC-Eluenten zugefügt wurden. In Doppelbestimmung wurde so bei $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter N_2 -Strom eine Lösung aus 50 ng OA in 3500 μL GPC-Eluent in Schritten zu je 500 μL im Vial eingeengt, und der trockene Rückstand anschließend mit je 50 μL acetonischer äquimolarer Basenmischung und BrMB-Lösung derivatisiert. Das Injektionsvolumen bei der HPLC/FLD-Bestimmung betrug 20 μL . Die Wiederfindung belief sich auf $70,6 \pm 6,2\%$ bzw. $69,7 \pm 8,0\%$ (vgl. Tabelle 8.14 (Anhang)). Der im Parallelversuch bestimmte pH-Wert betrug nach Wiederaufnahme in Wasser im Anschluss an das Einengen $\text{pH} = 6,9$.

Durch die Zugabe von Methanol wurde das Verdampfen beschleunigt, weswegen diese Verfahrensweise fortan zum Einengen von essigsäurehaltigen GPC-Eluaten eingesetzt wurde.

4.5. Hydrolyse von DTX-3

Neben der Bestimmung von DTX-3 als intaktem Ester kann dieses DSP-Toxin auch nach Hydrolyse über den Nachweis des Muttertoxins (s. Kapitel 2.5.4.) OA, DTX-1 oder DTX-2 nachgewiesen werden. Insbesondere aufgrund des Problems fehlender DTX-3-Standardsubstanzen wurde im Rahmen dieser Arbeit vorrangig die zweite Strategie verfolgt. Allerdings wurde auch die Möglichkeit des Nachweises von intaktem 7-O-palmitoyl-OA, welches als Standard zur Verfügung stand, genutzt. Unabhängig davon wurde jedoch ein Hydrolyseverfahren für DTX-3 anhand von 7-O-palmitoyl-OA entwickelt.

4.5.1. Etablierung eines Hydrolyseverfahrens für DTX-3 (am Beispiel von 7-O-palmitoyl-OA)

Stellvertretend für eine Reihe von Substanzen, die unter dem Sammelbegriff DTX-3 zusammengefasst werden, wurde 7-O-palmitoyl-OA eingesetzt, um die Bedingungen für eine vollständige Hydrolyse zu studieren. Dazu wurden 500 ng dieser Substanz in einem Braunglasvial bei 40 °C unter Stickstoffstrom zur Trockne evaporiert, mit 100 µL einer 0,2 M NaOH- Lösung in Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) versetzt, fünf Minuten im Ultraschallbad behandelt und anschließend für eine Stunde unter gelegentlichem Schütteln auf 75 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 200 µL 0,1 M HCl zur Neutralisation zugesetzt und anschließend drei Mal mit je 400 µL Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroformphasen wurden bei 40 °C unter Stickstoff zur Trockne eingengt und der Rückstand unter Verwendung des Ultraschallbades mit 200 µL Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) resuspendiert. Bei der folgenden LC/MS-Bestimmung stellte sich heraus, dass immer noch 7-O-palmitoyl-OA nachweisbar war. Deshalb wurde der Versuch unter veränderten Bedingungen erneut durchgeführt:

Zwecks möglichst vollständiger Verschiebung des Hydrolysegleichgewichts auf die Produktseite wurde die Reaktionszeit auf zwei Stunden erhöht. Außerdem wurden 400 µL einer methanolischen 1 M NaOH Lösung benutzt. Um die entstehende OA für den Extraktionsschritt zu protonieren und damit die Lipophilie der Substanz zu verstärken, wurde der pH-Wert durch die Erhöhung der Konzentration der Salzsäure auf 2 M und die Zugabe

von 300 μL erniedrigt. Die Extraktion erfolgte wiederum mit drei Mal 400 μL Chloroform. Unter diesen Bedingungen war 7-O-palmitoyl-OA nicht mehr nachweisbar, und zusätzlich konnte die entstandene OA nachgewiesen werden. Eine vollständige hydrolytische Spaltung wurde erreicht.

Im folgenden Schritt wurde die Wiederfindung von OA nach Hydrolyse von 7-O-palmitoyl-OA bestimmt. Theoretisch wird pro Mol 7-O-palmitoyl-OA ein Mol OA freigesetzt, aber in absoluten Mengen (in ng) entstehen (bei vollständiger Ausbeute) nur rund 77 % der eingesetzten Menge 7-O-palmitoyl-OA an OA entsprechend dem Verhältnis der molaren Massen der beiden Substanzen. In der praktischen Untersuchung ergab sich allerdings das Problem, dass der Gehalt des 7-O-palmitoyl-OA Standards nicht zertifiziert war. Somit war man bei der Kalibrierung auf die Übereinstimmung der Herstellerangabe mit dem tatsächlichen Gehalt angewiesen. Für die Quantifizierung der freigesetzten Menge an OA wurde ein (ebenfalls nicht zertifizierter) OA-Standard benutzt.

Um der damit verbundenen Einbuße an Aussagekraft von damit erhaltenen Ergebnissen zu begegnen, wurde auch OA parallel zu 7-O-palmitoyl-OA der gleichen Behandlung unterzogen. Damit konnten quantitative Aussagen zur Wiederfindung nach einer Hydrolyse erhalten werden.

Je 30 ng 7-O-palmitoyl-OA wurden in Fünffachbestimmung in einem Braunglasvial wie oben angegeben mit 400 μL methanolischer 1 M NaOH Lösung hydrolysiert, mit 300 μL 2 M HCl angesäuert und drei Mal mit je 400 μL Chloroform extrahiert. Der trockene Rückstand wurde mit je 200 μL Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) resuspendiert und per LC/MS vermessen, wobei jeweils 20 μL injiziert wurden. Die gleiche Prozedur wurde mit je 20 ng OA in Vierfachbestimmung durchgeführt.

Die Wiederfindung für OA aus 7-O-palmitoyl-OA (bezogen auf die theoretische Ausbeute von 23,1 ng OA aus 30 ng 7-O-palmitoyl-OA) lag bei 26,4 % \pm 6,0 % (vgl. Tabelle 8.15a (Anhang)). Die Wiederfindung für OA, bezogen auf ihre eingesetzte Menge, lag mit 18,6 % \pm 3,7 % im gleichen Bereich (vgl. Tabelle 8.15b (Anhang)).

Weil der Hydrolyseschritt aus zwei Teilen besteht, nämlich der eigentlichen Hydrolyse und der anschließenden Extraktion, war zunächst zu klären, in welchem der beiden Schritte (vorrangig) Optimierungsbedarf hinsichtlich der Wiederfindung bestand. Da Bestimmungen nach Hydrolyse nicht ohne nachfolgende Extraktion vorgenommen werden können, wurde zunächst der Extraktionsschritt untersucht: In Dreifachbestimmung wurden je 50 ng OA zu

einer Mischung aus 400 μL der methanolischen 1 M NaOH Lösung und 300 μL 2 M HCl gegeben und anschließend sofort drei Mal mit je 400 μL Chloroform extrahiert. Durch die Minimierung der Einwirkzeit sollte der Einfluss der Hydrolysechemikalien auf die OA so gering wie möglich gehalten werden, um (im Idealfall) allein den Einfluss der Extraktion zu untersuchen. Die zur Trockne eingedampften vereinigten Chloroformphasen wurden in 200 μL Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) aufgenommen und per LC/MS vermessen (Injektionsvolumina jeweils 20 μL).

Die Wiederfindungen lagen bei $21,7\% \pm 1,2\%$ (vgl. Tabelle 8.16 (Anhang)). Somit waren die Werte mit denen vergleichbar, die im vorangegangenen Experiment für die Hydrolyse von OA mit $18,6\%$ bestimmt wurden. Dies ließ darauf schließen, dass überwiegend die Extraktion für die Verluste bei der gesamten Hydrolyseprozedur verantwortlich war. Dieser Befund wurde auch dadurch gestützt, dass die eingesetzten Mengen an Reagenzien mehr als ausreichend (vgl. oben) für eine vollständig verlaufende Hydrolyse waren.

Es wurde vermutet, dass die geringen Volumina von wässriger und organischer Phase die Gleichgewichtseinstellung beim Extraktionsprozess gestört und damit die niedrige Wiederfindung verursacht hatten. Deshalb wurden die eingesetzten Volumina vergrößert.

Des Weiteren sollte die OA-Wiederfindung in den einzelnen Extraktionsschritten verfolgt werden. Damit sollten einerseits Verluste durch zu wenige Ausschütteloperationen vermieden, andererseits überflüssige Ausschüttelschritte verhindert werden.

Zusätzlich wurde der Einsatz von GPC-Eluaten simuliert, indem zu Beginn des Experiments GPC-Eluent in den Extraktionsgefäßen vorgelegt und getrocknet wurde.

In zwei Vials, in denen zuvor je 3,5 mL GPC-Eluent (Methanol : 0,43 M Essigsäure [13 : 7; v : v]) zur Trockne eingengt worden waren, wurde jeweils 100 ng OA mit 1000 μL der methanolischen 1 M NaOH, 750 μL 2 N HCl sowie mit 1250 μL Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) ad 3 mL Gesamtvolumen aufgefüllt. Die anschließende Extraktion erfolgte in vier Schritten mit je zwei Mal 1 mL Chloroform. Die vereinigten Chloroformphasen eines jeden Schrittes wurden unter Stickstoffstrom bei 40 °C eingedampft, in je 200 μL Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) resuspendiert, und anschließend mit der LC/MS Kopplung vermessen.

Mit $71,6\% \pm 9,9\%$ wurde der Hauptanteil der OA im Verlauf der ersten Extraktion dem Hydrolysegemisch entzogen. Im zweiten Schritt lagen die Mengen deutlich niedriger, nämlich um $1\% \pm 0,03\%$. Da im (resuspendierten) dritten und vierten Extrakt keine OA mehr nachweisbar war, reichten somit zwei (bzw. zur Sicherheit drei) Extraktionsoperationen aus,

um fast die gesamte Menge (entspricht mehr als 98,6 %) der mit diesem Verfahren aus dem Hydrolysegemisch extrahierbaren OA zu gewinnen (vgl. Tabelle 8.17 (Anhang)).

Es wurden weitere Versuche unternommen, das Niveau der Wiederfindung von hier durchschnittlich 72 % (Summe aus den zwei Extraktionsschritten) zu erhöhen, indem andere Lösungsmittel als Extraktionsmittel eingesetzt wurden. Zunächst wurde Chloroform durch Dichlormethan bei ansonsten gleicher Versuchsdurchführung ersetzt. Mit 67,8 % durchschnittlicher Wiederfindung über die drei Extraktionsschritte lag sie unterhalb derjenigen von Chloroform (vgl. Tabelle 8.18 (Anhang)). Zudem war bei der Benutzung von Chloroform bereits im ersten Extraktionsschritt ein höherer relativer Anteil der OA nachweisbar.

Als weitere Alternative zu Chloroform wurde tertiär-Butyl-Methyl-Ether (TBME) getestet. Bei ansonsten unveränderter Versuchsdurchführung wurde dieser zum Ausschütteln eingesetzt. Dabei ergab sich das Problem, dass sich nach Zugabe von 2 mL TBME zum Hydrolysegemisch keine Phasentrennung einstellte. Deshalb wurden zusätzlich je 3 mL TBME zugefügt, bis sich im System wieder zwei Phasen einstellten.

Es wurden in einer der beiden in Doppelbestimmung ausgeführten Proben in der zweiten Fraktion ca. 1 % der eingesetzten Menge an OA wiedergefunden, während in allen anderen Fraktionen keine OA nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Damit erwies sich der Einsatz von TBME als nicht geeignet, und in allen folgenden Experimenten wurde Chloroform eingesetzt.

4.5.2. Überprüfung der Stabilität von OA und DTX-1 sowie Monensin während der Hydrolyse

Wenn das Vorliegen von DTX-3 über eine Erhöhung der Menge der Muttertoxine OA, DTX-1 oder DTX-2 nach Hydrolyse nachgewiesen werden soll, muss sichergestellt sein, dass diese Muttertoxine nicht während der Hydrolyse abgebaut werden. Aus diesem Grund sollte die Stabilität von OA und DTX-1 als verfügbaren Muttertoxinen neben der von Monensin als internem Standard getestet werden.

Wegen des bereits früher genannten Fehlens von gehaltzertifizierten Standards für DTX-3 (z.B. 7-O-palmitoyl-OA) konnten die nach der Hydrolyse gemessenen OA-Mengen nicht

problemlos mit der theoretisch berechenbaren freizusetzenden Menge verglichen werden. Auch lässt sich OA aus der Verseifungslösung nicht direkt bestimmen, so dass beim deshalb notwendigen Extraktionsprozess Verluste auftreten können. Zur Beantwortung der Frage, ob diese Verluste allein vom Extraktionsprozess herrühren oder auch auf Abbau unter den Hydrolysebedingungen zurückzuführen sind, wurden die Analyte einmal direkt zu Beginn der Hydrolyse zugesetzt und der gesamten Hydrolyseprozedur sowie der Extraktion unterworfen („Durchführung mit Hydrolyse“), während im Vergleichsexperiment die gleiche Menge an Analyten nach der Hydrolyse zugefügt wurde, um sofort und allein der Extraktion unterworfen zu werden („Durchführung ohne Hydrolyse“). Anschließend sollte verglichen werden, wie hoch die Wiederfindung bei den beiden unterschiedlichen Verfahrensweisen war.

Dazu wurden in Doppelbestimmung (je zwei Mal mit bzw. ohne Hydrolyse) jeweils 3,5 mL GPC-Eluent (Methanol : 0,43 M Essigsäure [13 : 7; v : v]) mit je 20 ng OA bzw. DTX-1 sowie 8 ng Monensin („Durchführung mit Hydrolyse“) zur Trockne eingeengt, anschließend je 1000 μL der methanolischen 1 M NaOH zugegeben (pH = 11), zwei Stunden auf 70 °C erhitzt, nach Abkühlen auf Raumtemperatur 750 μL 2 N HCl (pH = 1) sowie 1250 μL Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) ad 3 mL Gesamtvolumen zugefügt. Bei der „Durchführung ohne Hydrolyse“ wurden die o.a. Mengen an OA, DTX-1 und Monensin erst an dieser Stelle der Versuchsdurchführung zugefügt. Die Extraktion erfolgte in beiden Fällen in drei Schritten mit je 2 x 1 mL Chloroform und anschließendem Einengen zur Trockne. Die Rückstände wurden mit jeweils 200 μL Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) resuspendiert und in je 5 μL per LC/MS die Gehalte an OA, DTX-1 und Monensin bestimmt.

Für OA betrug die Wiederfindung 105,1 % \pm 5,9 % bzw. 100,4 % \pm 1,1 %, bei DTX-1 wurden 95,2 % \pm 3,8 % bzw. 95,8 % \pm 3,0 % mit bzw. ohne Hydrolyse gefunden. Im Falle von Monensin konnte nach der Hydrolyse kein Analyt nachgewiesen werden, ohne Hydrolyse wurden 94,6 % \pm 1,8 % wiedergefunden (vgl. Tabelle 8.19 (Anhang)).

Es fiel auf, dass die Wiederfindungen für alle Analyten mit Ausnahme von Monensin nach der Hydrolyse nahe an 100 % lagen. Es traten offenbar weder mit noch ohne Hydrolyse kaum Verluste an OA sowie DTX-1 auf. Es stellte sich die Frage, ob ein signifikanter Unterschied zwischen ihnen bzw. ob ihre Gleichheit (im Rahmen der zufallsbedingten Unterschiede bei Messungen) nachweisbar sei. Läge Äquivalenz der Werte bei Einbeziehung bzw. Nichteinbeziehung der Analyte in die Hydrolyse vor, so hieße dies, dass der Hydrolyseprozess keinen Einfluss auf die Wiederfindung von OA sowie DTX-1 hat. Damit könnte bei erhöhten Gehalten dieser Analyte nach Hydrolyse davon ausgegangen werden,

dass DTX-3 oder eine andere zu OA/DTX-1/DTX-2 hydrolysierbare Verbindung vorgelegen hat.

Bei Monensin lagen die Verhältnisse etwas anders: ohne Hydrolyse wurden noch knapp 95 % wiedergefunden, während nach der Hydrolyse kein Monensin mehr nachweisbar war. Monensin ist zwar unter basischen Bedingungen inert (bis ca. pH = 11) [Falbe et al., 1995], aber im sauren Milieu ist es offenbar instabil. Eine Verwendung als interner Standard ist daher bei der Bestimmung nach Hydrolyse nicht möglich.

Zur Überprüfung der vermuteten Äquivalenz der Gehalte vor bzw. nach Hydrolyse wurde der Äquivalenztest nach dem Intervallinklusionsprinzip (Signifikanzniveau 90 %) durchgeführt. Das Äquivalenzintervall wurde auf (-10%, +10%) festgelegt; d.h. die Differenz der beiden Mittelwerte der Wiederfindungen (in %) darf um bis zu 10 % nach unten bzw. nach oben von Null abweichen, wobei noch Gleichheit der beiden Mittelwerte angenommen werden soll.

Die Konfidenzintervalle für DTX-1 errechneten sich zu (-3,60 , 4,79) und für OA zu (-9,48 , 0,06). Da beide Konfidenzintervalle vollständig innerhalb des Äquivalenzintervalls lagen, konnte die Äquivalenz der Wiederfindungen jeweils vor und nach der Hydrolyse mit 90 % iger Sicherheit nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 8.19 (Anhang)). Man kann also bei der Bestimmung erhöhter Werte für die Muttertoxine nach Hydrolyse im Vergleich zu vorher davon ausgehen, dass DTX-3 oder eine andere zu OA/DTX-1/DTX-2 hydrolysierbare Substanz vorgelegen hat.

4.5.3. Optimierung der Hydrolyse im Hinblick auf die nachfolgende Derivatisierung mit BrMB

Im Hinblick auf die Bestimmung der BrMB-Derivate mittels HPLC/FLD musste die Eignung des bisher entwickelten Hydrolyseverfahrens überprüft werden, um die Methodik ggf. anzupassen.

Zwecks Testung wurden in Dreifachbestimmung je 40 ng OA dem in Kapitel 4.5.2 beschriebenen Verfahren zur Hydrolyse unterworfen. Nach dem Einengen der vereinigten Chloroformphasen erfolgte anstelle der Aufnahme in Methanol : Wasser [4 : 1; v : v] die Derivatisierung mit je 100 μ L der Mischung aus acetonischer 5 μ M Hünig-Base und 5 μ M Triethylamin sowie je 100 μ L 1 mg mL⁻¹ BrMB in Aceton. Im HPLC/FLD-Chromatogramm

war kein Peak für OA erkennbar, offenbar hatte die Derivatisierung der OA unter den gegebenen Bedingungen nicht funktioniert.

Im folgenden Experiment wurde der pH-Wert unmittelbar vor der Derivatisierung bestimmt. Die eingegangenen Chloroformphasen des für die Derivatisierung vorbereiteten Probenextraktes wurden mit je 200 μL Wasser und Ultraschallunterstützung resuspendiert und in den vereinigten Extrakten der pH-Wert mit dem pH-Meter ermittelt. Mit $\text{pH} = 5,8$ lag eine leicht saure Umgebung vor, deren Säuregehalt aber aufgrund der niedrigen Konzentration an Triethylamin bzw. Hünig-Base bei der Derivatisierung wahrscheinlich ausreichte, um die Derivatisierungsreaktion zu unterbinden bzw. das Reaktionsgleichgewicht nicht weit genug auf die Produktseite zu verschieben, weil z.B. entstehender Bromwasserstoff nicht abgefangen werden konnte.

Um vor der Derivatisierung zu einem neutralen pH-Wert zu gelangen, gab es theoretisch drei Möglichkeiten:

- 1.) Nach der Hydrolyse wird im Anschluss an die Acidifizierung der pH-Wert der Mischung durch Basenzugabe erneut erhöht, um zu $\text{pH} = 7$ zu gelangen. Dies hat aber den Nachteil, dass der Grad der Protonierung bei den Analytenmolekülen (z.B. OA) absinkt, mit der möglichen Folge, dass die Effizienz der nachfolgenden Extraktion mit Chloroform negativ beeinflusst wird.
- 2.) Analog der Vorgehensweise bei der Derivatisierung der GPC-Eluate konnte durch abwechselnde Zugabe von Chloroform-Extrakt und Chloroform eventuell eine Erhöhung des pH-Wertes herbeigeführt werden.
- 3.) Der Einsatz einer Base bietet die Möglichkeit, den pH-Wert anzuheben, um die Derivatisierung in (möglichst) pH-neutraler Umgebung stattfinden zu lassen.

Während die erste Möglichkeit schon aus theoretischen Erwägungen ausschied, musste die zweite nach experimenteller Überprüfung abgelehnt werden, da der pH-Wert nicht nennenswert anstieg.

Stattdessen wurde wasserfreies Kaliumcarbonat (K_2CO_3) zur Erhöhung des pH-Wertes eingesetzt.

Zur Überprüfung des pH-Wertes bei Einsatz von 0,1 g K_2CO_3 wurde die o.a. Versuchsdurchführung gewählt. Allerdings wurden die vereinigten Chloroformphasen 30 Minuten über 0,1 g K_2CO_3 stehen lassen, bevor nach Filtration (Faltenfilter rund, Schleicher & Schuell) das Filtrat zur Trockne eingengt wurde. Nach Wiederaufnahme in Wasser betrug der pH-Wert in den vereinigten wässrigen Extrakten $pH = 6,8$. Somit wurde durch den Einsatz von 0,1 g K_2CO_3 eine fast vollständige Neutralisation erreicht.

Im folgenden Experiment sollte die Derivatisierung unter diesen neuen Bedingungen getestet werden. Im Rahmen einer Dreifachbestimmung wurden zu je 20 ng OA jeweils 3,5 mL GPC-Eluent gegeben und zur Trockne eingedampft. Anschließend wurden zur Hydrolyse 1000 μ L der methanolischen 1 M NaOH Lösung zugesetzt, im verschlossenen Vial zwei Stunden auf 70 °C erhitzt und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur 750 μ L 2 M HCl sowie 1250 μ L Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) ad 3 mL Gesamtvolumen zugegeben. Die Extraktion erfolgte in drei Schritten mit zwei Mal je 1000 μ L Chloroform. Die vereinigten Chloroformphasen wurden über jeweils 0,1 g K_2CO_3 30 Minuten lang getrocknet. Anschließend wurde der feste Rückstand abfiltriert, das Filter mit je drei Mal 2 mL Chloroform nachgewaschen und das Filtrat im Spitzkolben mit Hilfe des Rotationsverdampfers bis auf wenige hundert Mikroliter eingengt, die nun in einem Braunglasvial unter Stickstoff zur Trockne evaporiert wurden. Der Spitzkolben wurde noch drei Mal mit je 500 μ L Methanol nachgespült und das Methanol im selben Braunglasvial zur Trockne eingedampft. Anschließend wurde mit je 50 μ L BrMB-Lösung bzw. Basenmischung derivatisiert. Das Injektionsvolumen bei der HPLC/FLD-Bestimmung betrug jeweils 20 μ L.

Die Wiederfindung lag mit $84,4 \pm 2,7$ % (vgl. Tabelle 8.20 (Anhang)) im Bereich derjenigen, die mit Hilfe der MS-Detektion bestimmt wurde (72 %), und deshalb wurde diese Methodik mit Hydrolyse bei allen folgenden DSP-Bestimmungen mit BrMB-Derivatisierung angewendet.

4.6. Überprüfung und Anwendung des Gesamtverfahrens

4.6.1. HPLC/FLD-Bestimmung der BrMB-Derivate bzw. massenspektrometrischer Nachweis der underivatisierten Analyte

Das entwickelte Gesamtverfahren, bestehend aus Extraktion, GPC, Evaporation, Hydrolyse und anschließender Bestimmung der Analyte wurde auf dotiertes Muschelmateriale, zertifiziertes Referenzmateriale sowie auf eine natürlich belastete Muschelprobe angewendet. Die Bestimmung erfolgte nach chromatographischer Trennung sowohl durch Fluoreszenzdetektion der BrMB-Derivate als auch durch LC/MS-Bestimmung der underivatisierten Analyte. Zur besseren Übersicht ist in Abbildung 4.11 ein Fließschema zum Ablauf der Gesamtmethode gegeben.

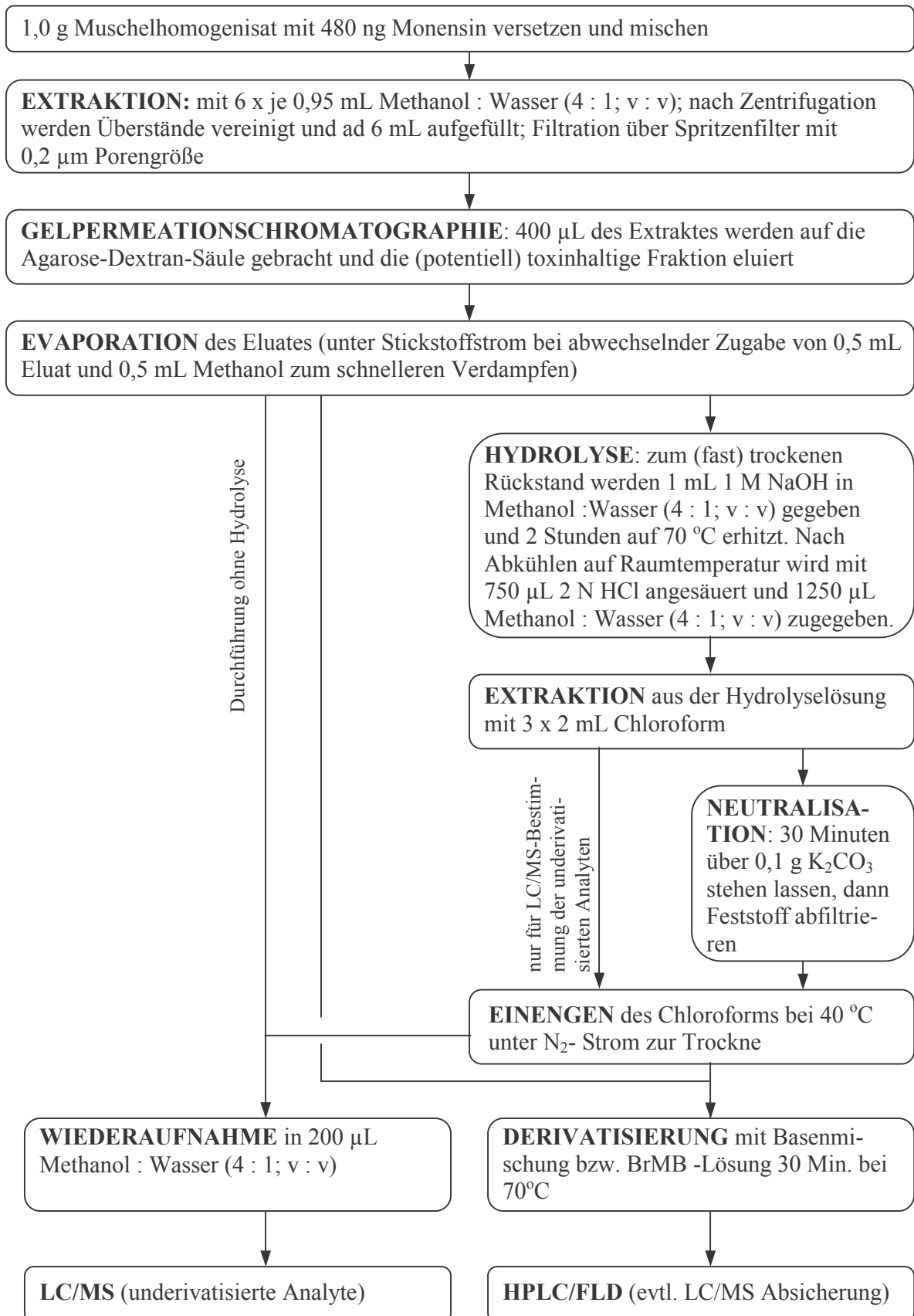


Abb. 4.11: Methodik zur Bestimmung von OA und DTXs

4.6.1.1. Überprüfung anhand eines dotierten Muschelmaterials

Zur Ermittlung der Wiederfindung von OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA (als DTX-3-Vertreter) sowie des internen Standards Monensin wurde ein Gramm toxisches Muschelhepatopankreashomogenisat mit je 80 ng OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA sowie 480 ng Monensin versetzt. Die Probenaufarbeitung erfolgte im Rahmen von Doppelbestimmungen (Durchführungen A und B) wie in Abbildung 4.11 angegeben. Nach Einengen des Eluenten unter Stickstoffstrom wurde mit je 50 µL BrMB-Lösung bzw. Basenmischung derivatisiert. Für die HPLC/FLD-Bestimmung wurden je 15 µL davon injiziert.

Parallel wurden je 20 µL der nach Einengen in 200 µL Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) resuspendierten GPC-Eluat unterderivatisiert per LC/MS untersucht.

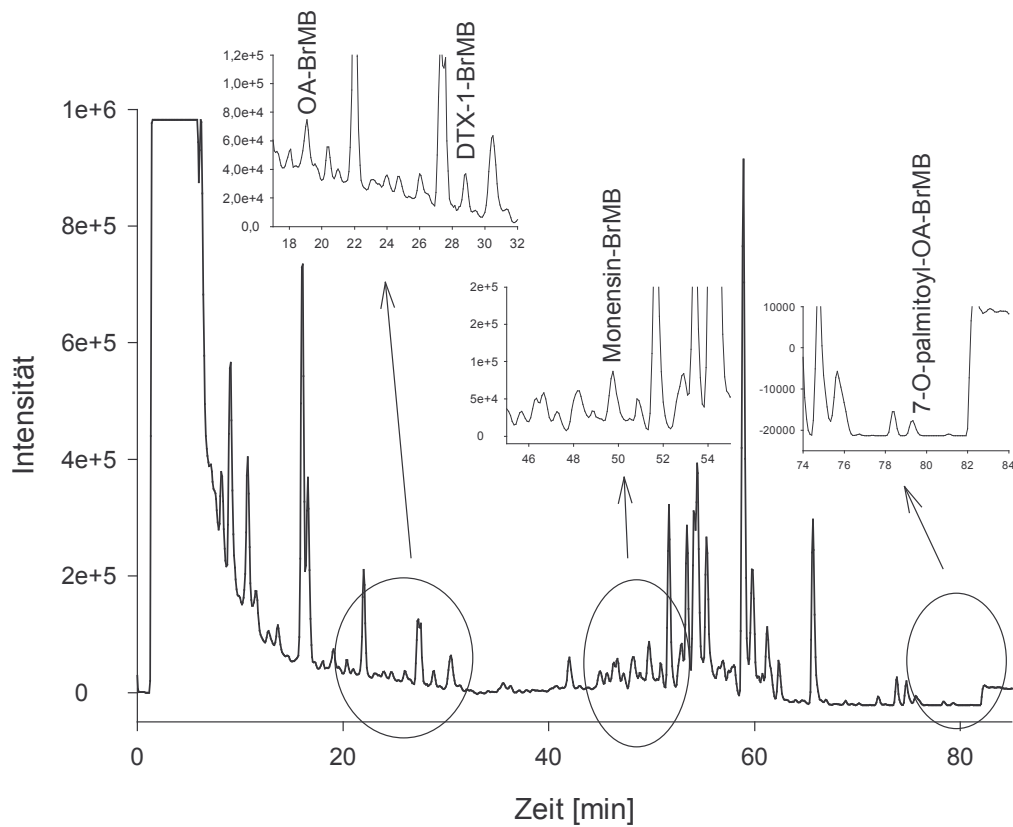
Nach Hydrolyse erfolgte die Derivatisierung ebenfalls mit je 50 µL BrMB-Lösung und Basenmischung mit nachfolgender Injektion von je 15 µL in die HPLC/FLD-Apparatur. In Abbildung 4.12 sind die Fluoreszenzchromatogramme der aufgereinigten und derivatisierten Muschelhepatopankreasextrakte mit (a) bzw. ohne (b) Hydrolyse wiedergegeben.

Im Rahmen der Paralleluntersuchung der underivatisierten Analyte mit LC/MS betrug das Injektionsvolumen 20 µL.

Die Wiederfindungen sind in Abbildung 4.13 zusammengefasst. Ohne Hydrolyse wurden für die zugesetzten Algentoxine bei der HPLC/FLD-Bestimmung ihrer BrMB-Derivate Wiederfindungen im Bereich von 46 % bis 60 % erzielt; hier bildete nur die Durchführung B im Falle von 7-O-palmitoyl-OA mit 35 % eine Ausnahme. Im Durchschnitt wurden 71 % des internen Standards Monensin detektiert, was eine höhere durchschnittliche Wiederfindung als bei der HPLC/FLD-Bestimmung der Algentoxine war. Die SDs bewegten sich meist um 5 – 10 %, in Einzelfällen bis 17,7 %.

Nach Hydrolyse sank die DTX-1-Wiederfindung auf Werte um 30% (SD kleiner 8,9 %). Im Gegensatz dazu wurden in beiden Durchführungen (A und B) sehr signifikant bzw. hochsignifikant erhöhte OA-Mengen (80 % bzw. 110 % in Bezug auf die eingesetzte Menge an OA) gemessen. Dennoch blieben die Werte unter den aus den Vorversuchen erwarteten Wiederfindungen. Erwartungsgemäß waren 7-O-palmitoyl-OA und der interne Standard Monensin nicht mehr nachweisbar (ebenso nach LC/MS-Bestimmung).

a) dotierte Muschel vor Hydrolyse



b) hydrolysierte dotierte Muschel

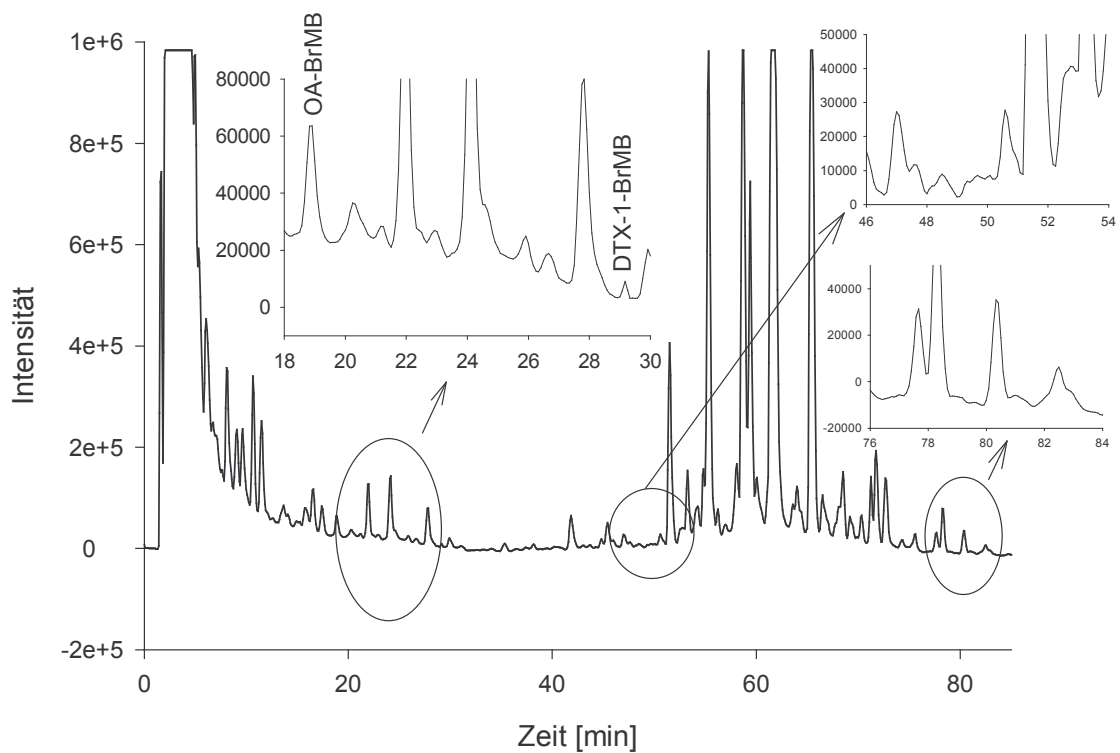


Abb. 4.12: HPLC/FLD Chromatogramme der Derivate der a) unhydrolysierten bzw. b) hydrolysierten dotierten Muschelprobe

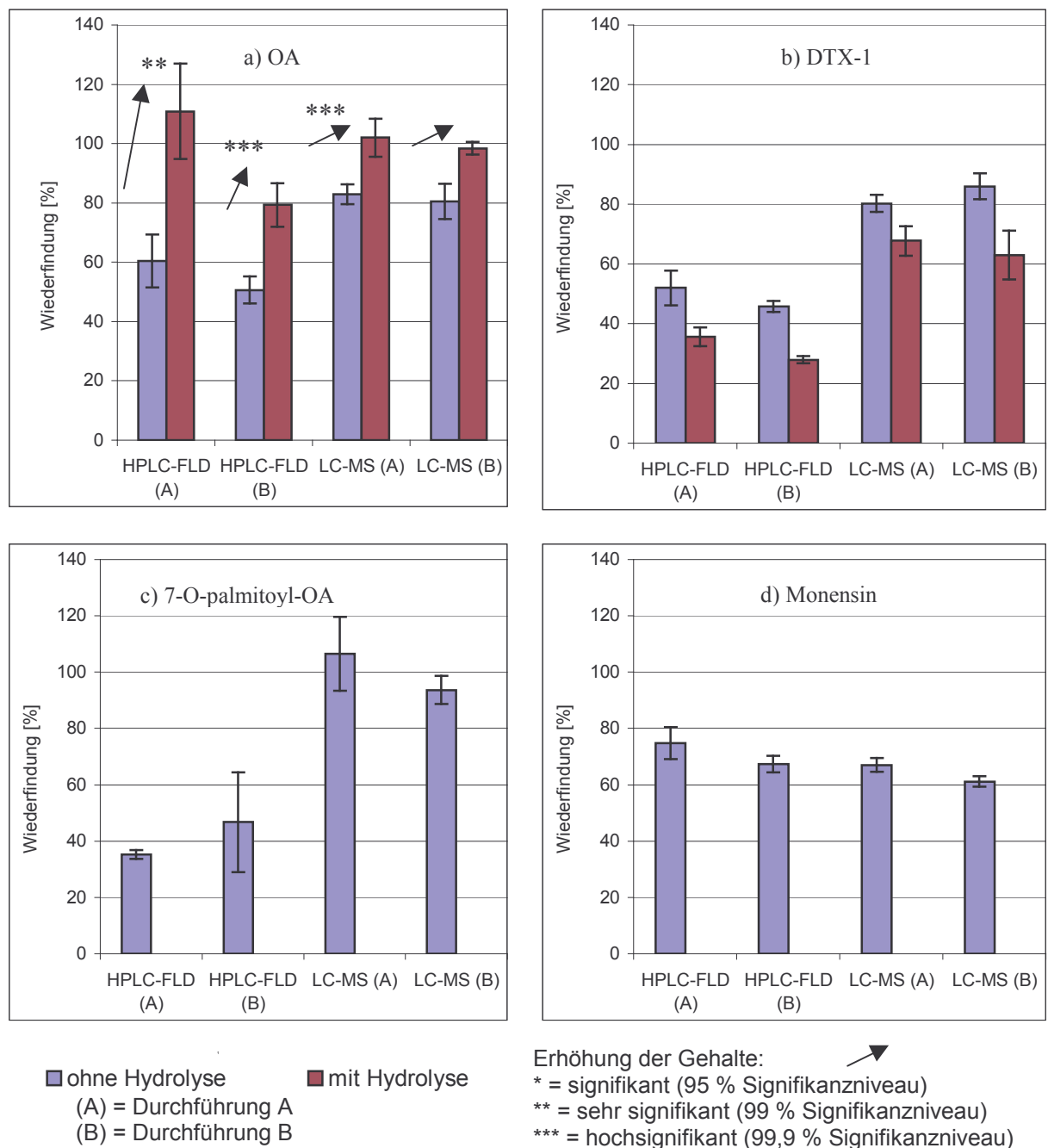


Abb. 4.13: Überprüfung des Gesamtverfahrens mit dotiertem Muschelmaterial: Wiederfindungen für a) OA, b) DTX-1, c) 7-O-palmitoyl-OA und d) Monensin als BrMB-Derivate nach Fluoreszenzdetektion bzw. underivatisiert mit massenspektrometrischer Detektion

Bei der LC/MS-Bestimmung der underivatisierten Substanzen lagen die Wiederfindungen für die zugesetzten Algentoxine ohne Hydrolyse durchweg höher als 80 % (in grober Übereinstimmung mit dem in Kapitel 4.2.3.1 ermittelten Wert von 88,5 %), für Monensin

über 60 %, die SDs bis auf eine Ausnahme (LC/MS-Bestimmung von 7-O-palmitoyl-OA, Durchführung A) unter 6 %.

Die Wiederfindung des internen Standards Monensin ist nach LC/MS-Bestimmung kleiner als diejenige von OA und DTXs, während nach Fluoreszenzdetektion prozentual mehr Monensin als OA und DTXs gefunden wurde. Als problematisch für einen Einsatz von Monensin als internem Standard erweisen sich die deutlichen Unterschiede (teilweise mehr als 25 %) zwischen den Wiederfindungen von Monensin einerseits und der Algentoxine andererseits. Auffallend in Bezug auf die Wiederfindung von Monensin selbst ist, dass nach seiner Bestimmung mittels Fluoreszenzdetektion tendenziell höhere Wiederfindungsraten als mit LC/MS ermittelt wurden. Dies widerspricht dem bei den übrigen Analyten gefundenen Trend, welcher in die umgekehrte Richtung weist. Trotz intensiver Überlegungen konnte keine aus der Durchführung begründbare Ursache ermittelt werden. Aus Zeitmangel wurden keine weiteren experimentellen Untersuchungen dieser Phänomene durchgeführt.

Im Anschluss an die Hydrolyse wurden bei DTX-1 noch rund zwei Drittel der anfangs zugesetzten Menge wiedergefunden. Dies entsprach in etwa den Erwartungen ($89 \% * 72 \% = 64 \%$) aus den Versuchen zur Hydrolyse in Kapitel 4.5.1 und zur Wiederfindung von Algentoxinen nach GPC-Aufreinigung matrixbelasteter Muschelextrakte. Ebenso wie bei den HPLC/FLD-Messungen konnten im Falle der LC/MS-Bestimmung der underivatisierten OA nach Hydrolyse höhere OA-Gehalte (Anstieg von ca. 80 % auf ca. 100 %) gezeigt werden. Die nach Hydrolyse gemessene Erhöhung der Mittelwerte der OA-Menge war offensichtlich auf die aus 7-O-palmitoyl-OA freiwerdende OA zurückzuführen. Theoretisch müsste nach Hydrolyse die Summe aus den Mengen der anfangs zugesetzten OA sowie der aus 7-O-palmitoyl-OA freiwerdenden OA, d.h. $80 \text{ ng} + 77\% * 80 \text{ ng} = 141,6 \text{ ng}$, entsprechend 177 % vorliegen. In diesem Experiment waren Verluste von ca. 10 % gegenüber der unter Einbeziehung der o.g. Versuche zur Hydrolyse bzw. GPC-Aufreinigung berechenbaren Menge ($113 \% = 64\% \text{ von } 177 \%$) feststellbar.

Dennoch konnte sowohl nach HPLC/FLD-Bestimmung als auch nach LC/MS Messungen nachgewiesen werden, dass die ermittelten OA Mengen nach Hydrolyse erhöht und bis auf eine Ausnahme die Unterschiede sehr signifikant (Signifikanzniveau 99 %) waren. Für eine detaillierte Datenzusammenstellung sei auf die Tabellen 8.21 (Anhang) bis 8.26 (Anhang) verwiesen.

Zusammenfassend lagen die Wiederfindungen nach HPLC/FLD-Bestimmung z.T. unter den nach den Vorversuchen erwarteten Werten.

4.6.1.2. Überprüfung anhand von zertifiziertem Referenzmaterial

Als Referenzmaterial wurde Probenmaterial („MUS-2“, National Research Council of Canada), dessen Gehalt an OA und DTX-1 zertifiziert war, zusammen mit einem OA-Standard („OACS-1“, zertifizierte Konzentration $25,3 \mu\text{g OA mL}^{-1}$, National Research Council of Canada) eingesetzt. Für die Quantifizierung des DTX-1- sowie Monensingehaltes wurden nicht zertifizierte Standards eingesetzt. Das Probenmaterial, das $11 \mu\text{g OA g}^{-1}$ und $1 \mu\text{g DTX-1 g}^{-1}$ enthielt und in Gebinden zu je 4 g vorlag, stellte eine Mischung aus belastetem Muschelmateriale und Phytoplankton dar. Der Inhalt eines Gebindes wurde nach Überführung in ein Zentrifugenglas mit 1920 ng Monensin vermischt und mit 6 x 4 mL Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden ad 25 mL aufgefüllt. Die genaue Einwaage wurde durch Rückwägung des entleerten Gebindes bestimmt und betrug 3,5227 g.

Die Bestimmung der Analyte erfolgte unter Anwendung der entwickelten Gesamtmethode, die in Abbildung 4.11 als Fließschema wiedergegeben ist. Nach Evaporation des GPC-Eluenten wurden die trockenen Rückstände mit je 100 μL BrMB-Lösung bzw. Basenmischung derivatisiert und jeweils 5 μL per HPLC/FLD untersucht. Für die Bestimmung der underivatisierten Analyte wurden die trockenen Rückstände in jeweils 200 μL Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) aufgenommen; das Injektionsvolumen betrug hier ebenfalls 5 μL . Abbildung 4.14 fasst die Ergebnisse, die im Detail in den Tabellen 8.27 (Anhang) bis 8.29 (Anhang) aufgeführt sind, zusammen.

Während nach HPLC/FLD Bestimmung der derivatisierten Analyte ca. ein Viertel der OA, um 14 % des DTX-1 und ca. 22 % des zugesetzten Monensins bei SDs kleiner als 2,7 % wiedergefunden wurden, lagen alle Wiederfindungen bei der LC/MS-Bestimmung der underivatisierten Substanzen über 83 % (SDs unter 4,0 %). Für DTX-1 und Monensin wurden sogar knapp 100 % gemessen. Bei der Bewertung der Wiederfindungen war zu beachten, dass für DTX-1 kein zertifizierter Standard eingesetzt wurde, so dass man bei der Kalibrierung auf die Übereinstimmung der Herstellerangabe mit dem tatsächlichen Gehalt angewiesen war. Im Falle des Monensins war die Verwendung eines nicht zertifizierten Materials unproblematisch, da sowohl für die Dotierung als auch für die Kalibration der gleiche Standard benutzt wurde und somit mögliche Unterschiede in den Gehalten der für Dotierung bzw. Kalibrierung benutzten Standards prinzipiell ausgeschlossen sind.

Bei beiden Bestimmungsverfahren (HPLC/FLD der BrMB-Derivate bzw. LC/MS der underivatisierten Proben) entsprachen die Wiederfindungen des internen Standards Monensin weitgehend denjenigen von OA und DTX-1. Deshalb kann der (angenäherte) Gehalt an OA bzw. DTX-1 rechnerisch ermittelt werden.

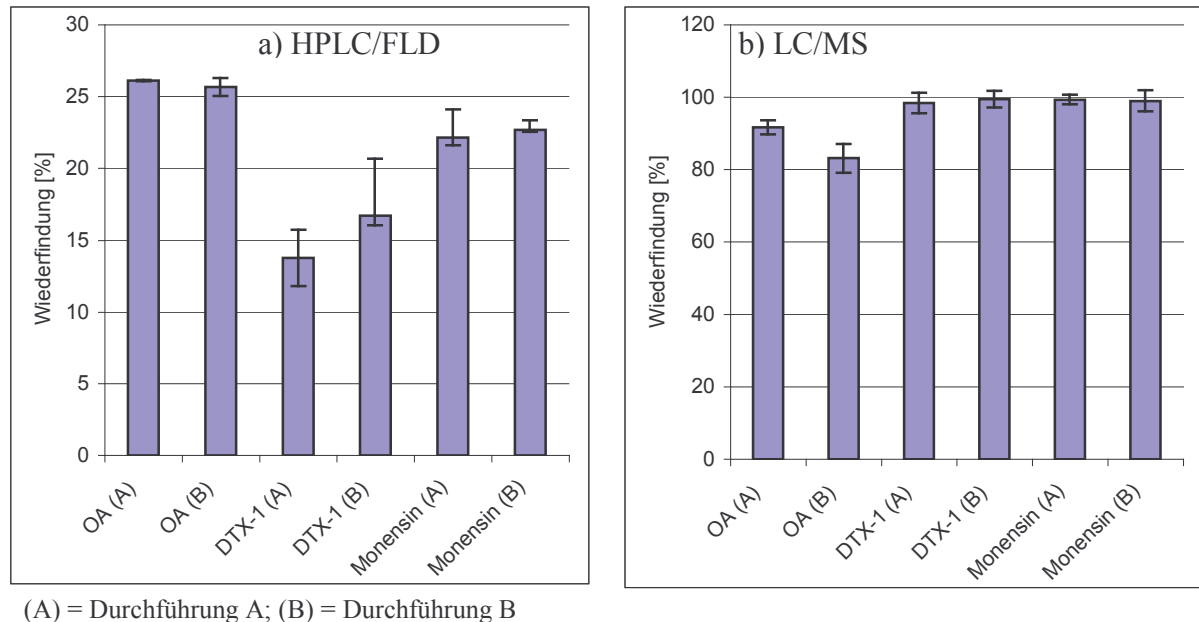


Abb. 4.14: Überprüfung des Gesamtverfahrens mit zertifiziertem Referenzmaterial MUS-2: Wiederfindungen für OA, DTX-1 und Monensin nach a) HPLC/FLD-Bestimmung der BrMB-Derivate bzw. b) massenspektrometrischer Detektion der underivatisierten Analyten

Für alle Analyte war ein deutlicher Unterschied zwischen den Wiederfindungsniveaus beider Bestimmungsverfahren erkennbar, was wahrscheinlich mit der Derivatisierung und/oder nachfolgenden HPLC/FLD-Bestimmung zusammenhängt, denn während der Probenvorbereitung (Extraktion und GPC) wurden alle Parallelproben gleich behandelt. Weitergehende experimentelle Untersuchungen waren mangels Zeit nicht möglich.

Aufgrund der niedrigen Wiederfindung nach HPLC/FLD-Bestimmung der BrMB-Derivate erweist sich die Bestimmung der Analyte nach Derivatisierung in Kombination mit der beschriebenen Probenaufarbeitung im Hinblick auf den quantitativen Nachweis als problematisch.

4.6.1.3. Anwendung auf natürlich belastetes Muschelmateriale

Die entwickelte Gesamtmethode wurde auch auf natürlich belastetes Muschelmateriale von der schwedischen Westküste angewendet. Dabei handelte es sich um homogenisierten Hepatopankreas von 10 Individuen der Miesmuschel *Mytilus edulis* (aus 1-2 m Tiefe des Björnsunds, gesammelt am 01.10.2001; freundlicherweise von Herrn Bengt Lundve [Forschungsstation in Kristineberg, Schweden] zur Verfügung gestellt). 1,5612 g Homogenisat wurde mit 5000 ng Monensin gemischt und weiter wie im Fließschema für die Gesamtmethode (Abbildung 4.11) verfahren. Das Injektionsvolumen betrug bei der HPLC/FLD-Bestimmung jeweils 8 μL , bei der LC/MS-Messung je 10 μL .

Bei den Untersuchungen wurde eine Belastung des Materials mit OA ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.15 graphisch dargestellt; detaillierte Daten finden sich in den Tabellen 8.30 bis 8.32 (Anhang).

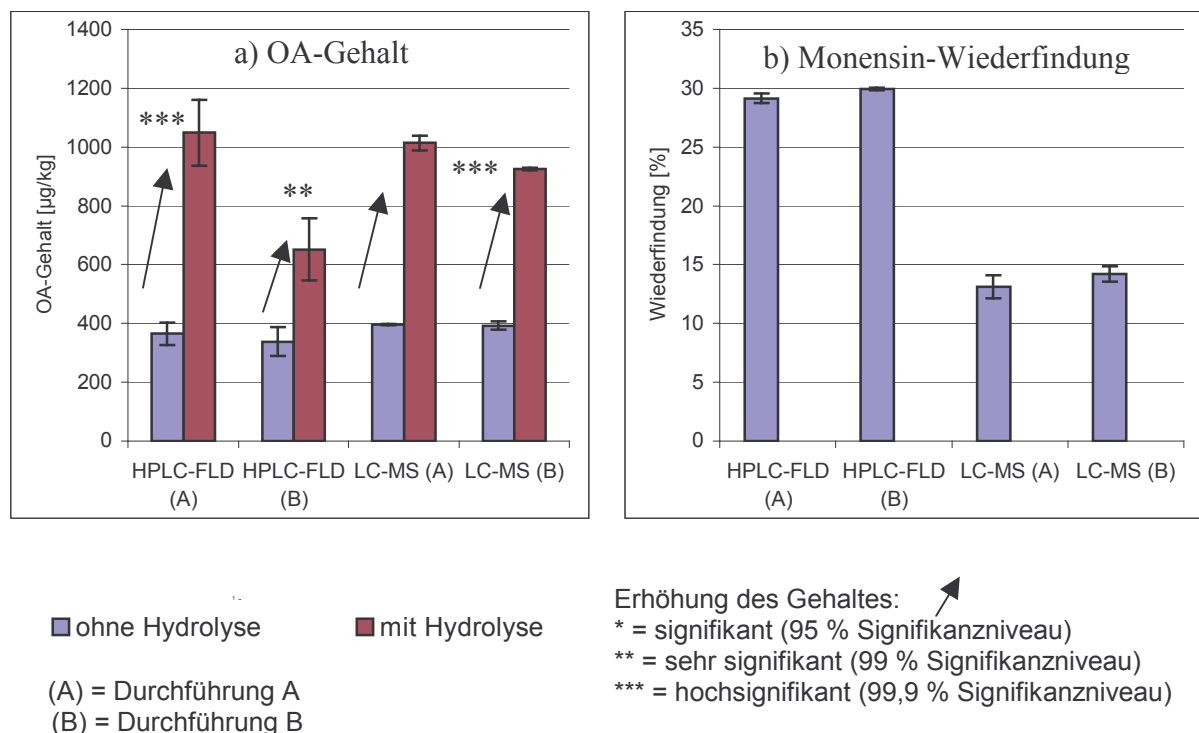


Abb. 4.15: Anwendung des Gesamtverfahrens auf natürlich belastetes Muschelmateriale: a) OA-Gehalt und b) Monensin-Wiederfindung nach HPLC/FLD-Bestimmung der BrMB-Derivate bzw. nach massenspektrometrischer Detektion der underivatisierten Analyten

Der ohne Hydrolyse ermittelte OA-Gehalt lag bei beiden Bestimmungsverfahren im Bereich von ca. 340-400 $\mu\text{g kg}^{-1}$, wobei nach Derivatisierung und Fluoreszenzdetektion etwas niedrigere Werte ($365,2 \pm 31,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ bzw. $338,0 \pm 49,1 \mu\text{g kg}^{-1}$) bestimmt wurden als nach massenspektrometrischer Detektion der underivatisierten OA ($396,2 \pm 3,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ bzw. $392,8 \pm 14,9 \mu\text{g kg}^{-1}$). Bei SDs unter 1 % bewegten sich die Wiederfindungen für den internen Standard Monensin um 14 % (LC/MS) bzw. knapp unter 30 % (HPLC/FLD). Dass dieses recht niedrige Wiederfindungsniveau bei beiden Bestimmungsverfahren auftritt, lässt sich nicht durch ein Problem bei der Detektion erklären, denn ein paralleles Vorkommen bei beiden Bestimmungsarten ist sehr unwahrscheinlich. Wahrscheinlich sind Verluste im Rahmen der Probenvorbereitung aufgetreten, und zwar vor allem bei der Extraktion. Aufgrund der großen Menge an zugefügtem internen Standard kann die Extraktionseffizienz deutlich niedriger als in Kapitel 4.3 gelegen haben, denn mit 5000 ng war (irrtümlich) ca. das zehnfache der sonst benutzten Menge zur Dotierung verwendet worden.

Die Monensin-Wiederfindung war nach HPLC/FLD-Messung ca. 15 % höher als nach massenspektrometrischer Bestimmung. Diese Differenz zwischen beiden Wiederfindungsraten war größer als bei der Untersuchung des dotierten Muschelmaterials, wo ebenfalls prozentual mehr Monensin nach HPLC/FLD- als nach LC/MS-Bestimmung bestimmt worden war. Eine theoretische Klärung dieses Sachverhaltes konnte nicht herbeigeführt werden, und für eine Wiederholung des Versuchs fehlte die dafür notwendige Zeit.

Zum jetzigen Zeitpunkt kann daher -auch im Hinblick auf die mit dotiertem Muschelmaterial und dem zertifizierten Referenzmaterial erhaltenen Ergebnisse- nicht endgültig über die Eignung von Monensin als interner Standard entschieden werden. Solange eine Beantwortung der noch offenen Fragen aussteht, kann der Einsatz von Monensin als interner Standard nicht empfohlen werden.

Nach Hydrolyse wurden deutlich erhöhte Gehalte an OA gemessen ($652,1 \pm 106,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ bzw. $1048,4 \pm 112,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ per HPLC/FLD; $1014,0 \pm 25,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ bzw. $926,1 \pm 4,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ mit LC/MS), die bei allen Bestimmungen über der momentan in Deutschland geltenden Höchstmenge von $400 \mu\text{g kg}^{-1}$ lagen und somit eine Nichtverkehrsfähigkeit der Probe im Sinne der FischHV bedeutet hätten. Die Unterschiede der ermittelten OA Gehalte sowohl innerhalb der Parallelbestimmungen als auch im Vergleich zu der jeweils anderen Bestimmungsweise (HPLC/FLD der BrMB Derivate bzw. LC/MS der underivatisierten

Analyten) waren bei den Bestimmungen mit Hydrolyse größer als ohne. Dies lässt sich z.T. durch die zusätzlichen Arbeitsschritte bei der Durchführung der Hydrolyse erklären.

In allen Fällen ergab sich nach Hydrolyse ein erhöhter OA-Gehalt. Analog zum Versuch mit dotiertem Muschelmateriale wurde auch hier mit Hilfe des t-Tests untersucht, ob die Erhöhungen signifikant waren. Bei den HPLC/FLD-Bestimmungen waren diese sehr signifikant bzw. hochsignifikant; nach den LC/MS-Bestimmungen der underivatisierten OA konnte in einem Fall eine hochsignifikante Erhöhung festgestellt werden (vgl. auch Tabellen 8.31 und 8.32 (Anhang)).

4.6.2. Überprüfung und Anwendung des Gesamtverfahrens im Hinblick auf die Bestimmung der derivatisierten Toxine mit Hilfe der Kopplung LC/MS

Allgemein gilt, dass in der Lebensmittelanalytik bei positiven Befunden eine Überprüfung des Analyseergebnisses mit Hilfe einer zweiten Methode erfolgen sollte. Dies kann im vorliegenden Fall dadurch geschehen, dass man die BrMB-Derivate nach der üblichen Bestimmung per HPLC/FLD als erste Meßmethode im Falle eines positiven Befundes mit der LC/MS-Kopplung vermisst.

Um die Anwendbarkeit der MS-Detektion zur Absicherung von per HPLC/FLD-Bestimmung erhaltenen Befunden aufzuzeigen, wurden exemplarisch jeweils 8 µL der derivatisierten natürlich belasteten Muschelprobe vor bzw. nach der Hydrolyse mit der LC/MS-Kopplung vermessen. Die beiden resultierenden Totalionenstromchromatogramme (TICs) sind in Abbildung 4.16 gezeigt.

In beiden Chromatogrammen ist der Peak des BrMB-Derivates der OA sichtbar, während Monensin nur vor der Hydrolyse nachweisbar ist.

Dieses Beispiel zeigt, dass die Absicherung eines durch HPLC/FLD-Bestimmung nach Derivatisierung erhaltenen positiven DSP-Nachweises auch mit Hilfe der massenspektrometrischen Detektion der BrMB-Derivate möglich ist. Außerdem kann in einem solchen Fall zusätzlich eine Analyse der underivatisierten Analyten per LC/MS erfolgen.

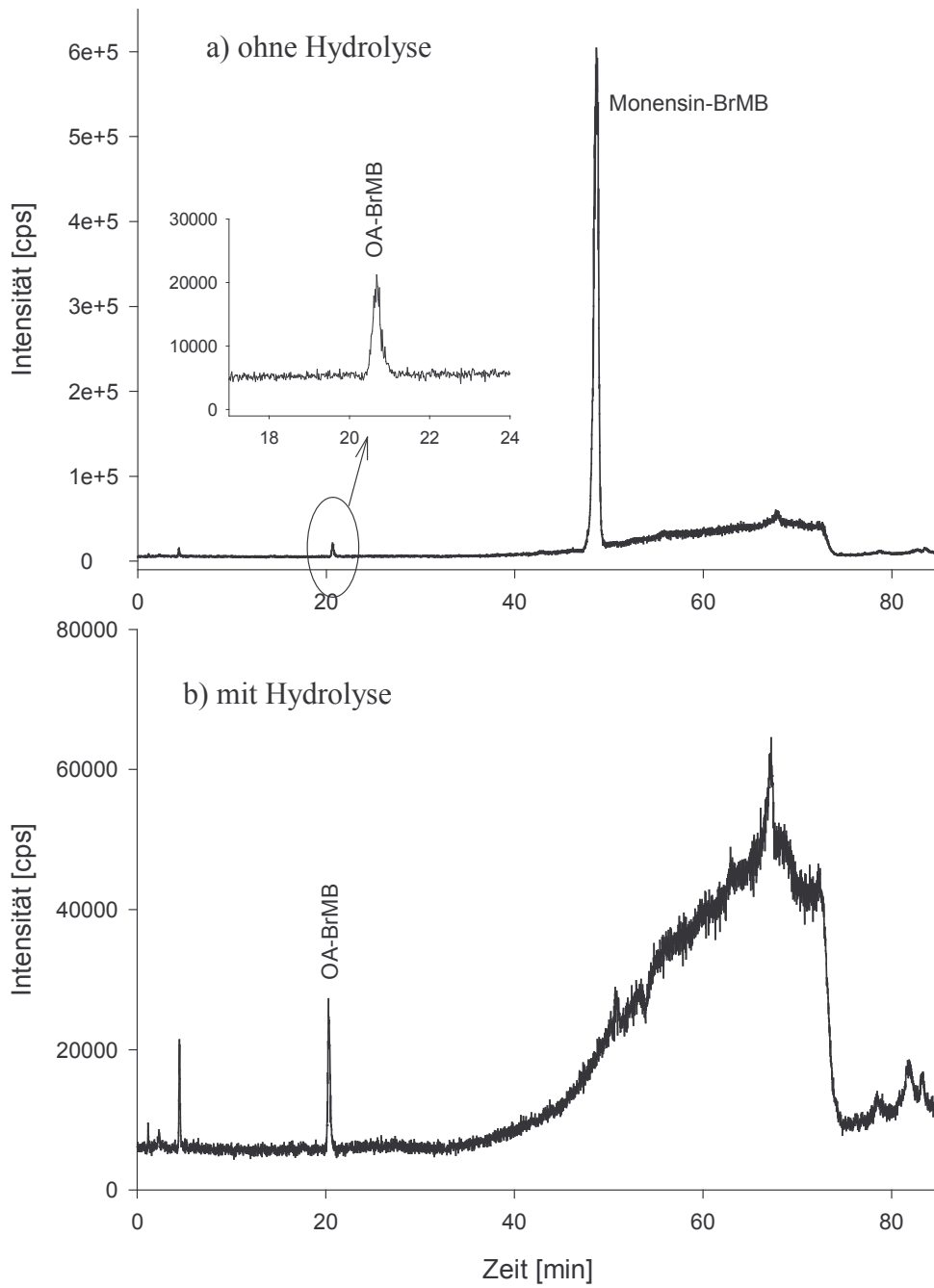


Abb. 4.16: LC/MS-TIC der BrMB-Derivate der natürlich belasteten Muschelprobe a) ohne bzw. b) mit Hydrolyse

5. Entwicklung einer Analysemethode zum Nachweis von YTX neben OA und DTX-1

5.1. LC/MS-Bestimmung von YTX, OA und DTX-1

Zur Bestimmung von YTX neben OA und DTX-1 wurde die LC/MS-Kopplung eingesetzt. Der Eluent bestand aus Methanol und 10 mM wässriger Ammoniumacetat-Lösung. Die chromatographische Trennung erfolgte durch Gradientenelution (s. Tabelle 5.1) auf einer C-4-Umkehrphase (Phenomenex Jupiter 5 μ micron C4, 300Å 4,6 x 50 mm mit Vorsäule Security Guard Cartridge).

Tab. 5.1: Gradient der Trennung von OA, DTX-1 sowie YTX auf einer C-4-Umkehrphase (Phenomenex Jupiter 5 μ micron C4, 300Å 4,6 x 50 mm)

Zeit [min]	Methanol [%]	10 mM NH ₄ ⁺ CH ₃ COO ⁻ [%]	Flussrate [mL min ⁻¹]
0	30	70	0,8
7	70	30	0,8
17	80	20	0,8
18	100	0	0,8
23	100	0	0,8
24	30	70	0,8
30	30	70	0,8

Das von der HPLC-Säule kommende Eluat wurde im Verhältnis 1 : 4 aufgespalten, d.h. 20 % des Eluates gelangten in das Massenspektrometer API 165, welches mit API-Einlasssystem und pneumatisch unterstütztem Elektrospray (N₂, 400 °C) betrieben wurde. Die Detektion erfolgte im Negativmodus bei einer Ionisierungsspannung von -3500 V; die aufgezeichneten Ionen sind in Tabelle 5.2 aufgeführt:

Tab. 5.2: Ionen und zugehörige m/z-Werte für die massenspektrometrische-Detektion von OA, DTX-1 und YTX sowie deren MWs

Nummer	m/z	Ion	M entspricht:	Summenformel	MW (g mol ⁻¹)
1	803,4	[M - H] ⁻	OA	C ₄₄ H ₆₈ O ₁₃	804
2	817,4	[M - H] ⁻	DTX-1	C ₄₅ H ₇₀ O ₁₃	818
3	1141,9	[M + H - 2 Na] ⁻	YTX	C ₅₅ H ₈₀ O ₂₁ S ₂ Na ₂	1186
4	1163,9	[M - Na] ⁻	YTX	C ₅₅ H ₈₀ O ₂₁ S ₂ Na ₂	1186

Für YTX können zwei Ionen zur Auswertung herangezogen werden. Dasjenige mit $m/z = 1141,9$ war das intensitätsstärkere von beiden und wurde deshalb zur Quantifizierung von YTX eingesetzt. Dennoch wurde das Ion $[M - Na]^-$ mit $m/z = 1163,9$ ebenfalls in die Bestimmungen einbezogen, um eine zusätzliche Sicherheit [Quilliam, 1995] bezüglich der Identität der nachzuweisenden Substanz YTX zu erhalten. Die deutlichen Unterschiede zwischen den Peakintensitäten der beiden Ionen sind auch im LC/MS-Chromatogramm in Abbildung 5.1 ersichtlich.

Detektionslimits und Bestimmungsgrenzen dieser LC/MS-Methode sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

Tab. 5.3: Detektionslimits und Bestimmungsgrenzen für die LC/MS-Bestimmung von OA, DTX-1 und YTX

	OA	DTX-1	YTX
Detektionslimit	1,5 ng o.c.	1,5 ng o.c.	1,5 ng o.c.
Bestimmungsgrenze	2,0 ng o.c.	2,0 ng o.c.	2,0 ng o.c.

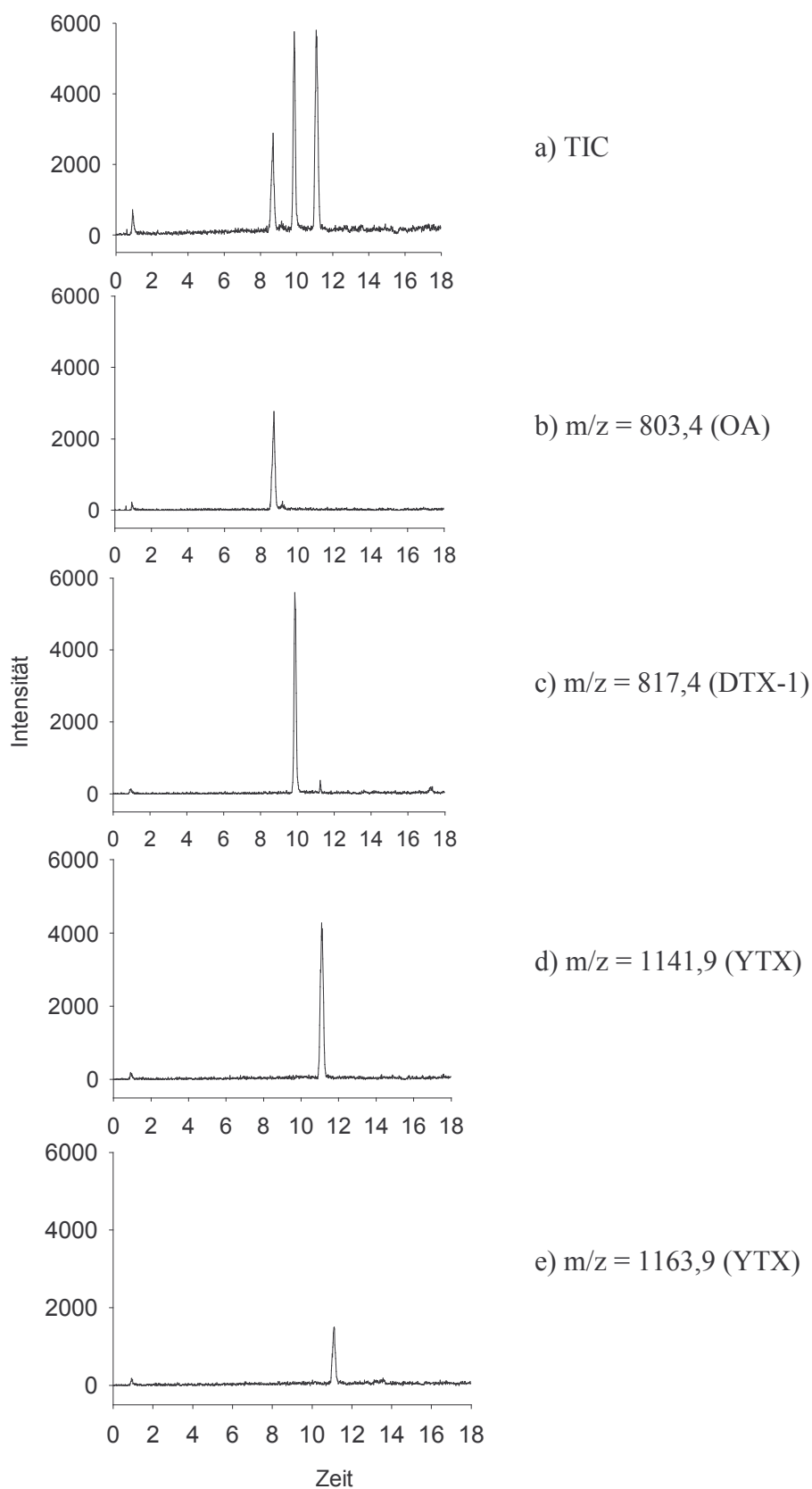


Abb. 5.1: TIC sowie Massenspuren für b) $m/z = 803,4$, c) $m/z = 817,4$, d) $m/z = 1141,9$, e) $m/z = 1163,9$ (LC/MS-Bestimmung von YTX, OA und DTX-1)

5.2. Entwicklung eines GPC-Verfahrens zur Aufreinigung von YTX-, OA- und DTX-1-haltigen Muschelextrakten

Das GPC-Aufreinigungsverfahren für OA und DTXs wurde zunächst hinsichtlich seiner Effizienz zur Aufarbeitung YTX-haltigen Probenmaterials getestet. 200 μL eines $0,25 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ YTX-Standards wurden injiziert und zwischen 5 und 55 Minuten Fraktionen von jeweils 5 Minuten Dauer gesammelt. Diese wurden anschließend bei 45°C unter N_2 -Strom eingengt, in je 200 μL Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) resuspendiert, und von je 20 μL der Lösungen wurde YTX per LC/MS bestimmt. YTX konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Weitere Experimente mit erhöhten Essigsäurekonzentrationen in der mobilen Phase der GPC bei ansonsten unveränderter Versuchsdurchführung zwecks sicheren Ausschlusses ionischer Wechselwirkungen brachten zwar eine Verbesserung in Bezug auf die Elution (ca. 30 % des eingesetzten YTX eluierten zwischen 25 und 30 Minuten nach Injektion von der Agarose-Dextran-Säule), aber eine zufriedenstellende Wiederfindung in einer zeitlich eng begrenzten Fraktion wurde nicht erreicht (Daten nicht gezeigt). Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass beim Einengen der Eluate fast keine Verluste auftreten. Die Wiederfindung lag hierbei für verschiedene Essigsäurekonzentrationen immer über als 95 % (Daten nicht gezeigt).

Danach wurde das Einengen der mobilen Phase mit 10 mM Ammoniumacetat-Lösung statt Essigsäure als wässrigem Anteil getestet. Die Wiederfindungen betrugen hierbei für YTX 90,9 %, OA 107,7 % und DTX-1 111,4 % (Tabelle 8.33 (Anhang)). Aufgrund der großen Ähnlichkeit der Zusammensetzung der mobilen Phase mit derjenigen in der analytischen LC/MS Methode konnte die Agarose-Dextran-Säule mit Vorfilter direkt mit dem Massenspektrometer gekoppelt und die Elution von YTX überprüft werden (Flussrate $0,8 \text{ ml min}^{-1}$; isokratische Elution). Die zugehörigen LC/MS Chromatogramme (TIC sowie einzelne Massenspuren) wurden nach Injektion von je 50 ng OA, DTX-1 und YTX erhalten und sind in Abbildung 5.2 dargestellt. OA und DTX-1 eluierten nach 18,1 Minuten, YTX nach 17,8 Minuten (Angabe bezogen auf Peakmaxima). In einem Intervall zwischen 14 Minuten und 20 Minuten nach Injektion konnten damit alle drei Substanzen erfasst werden.

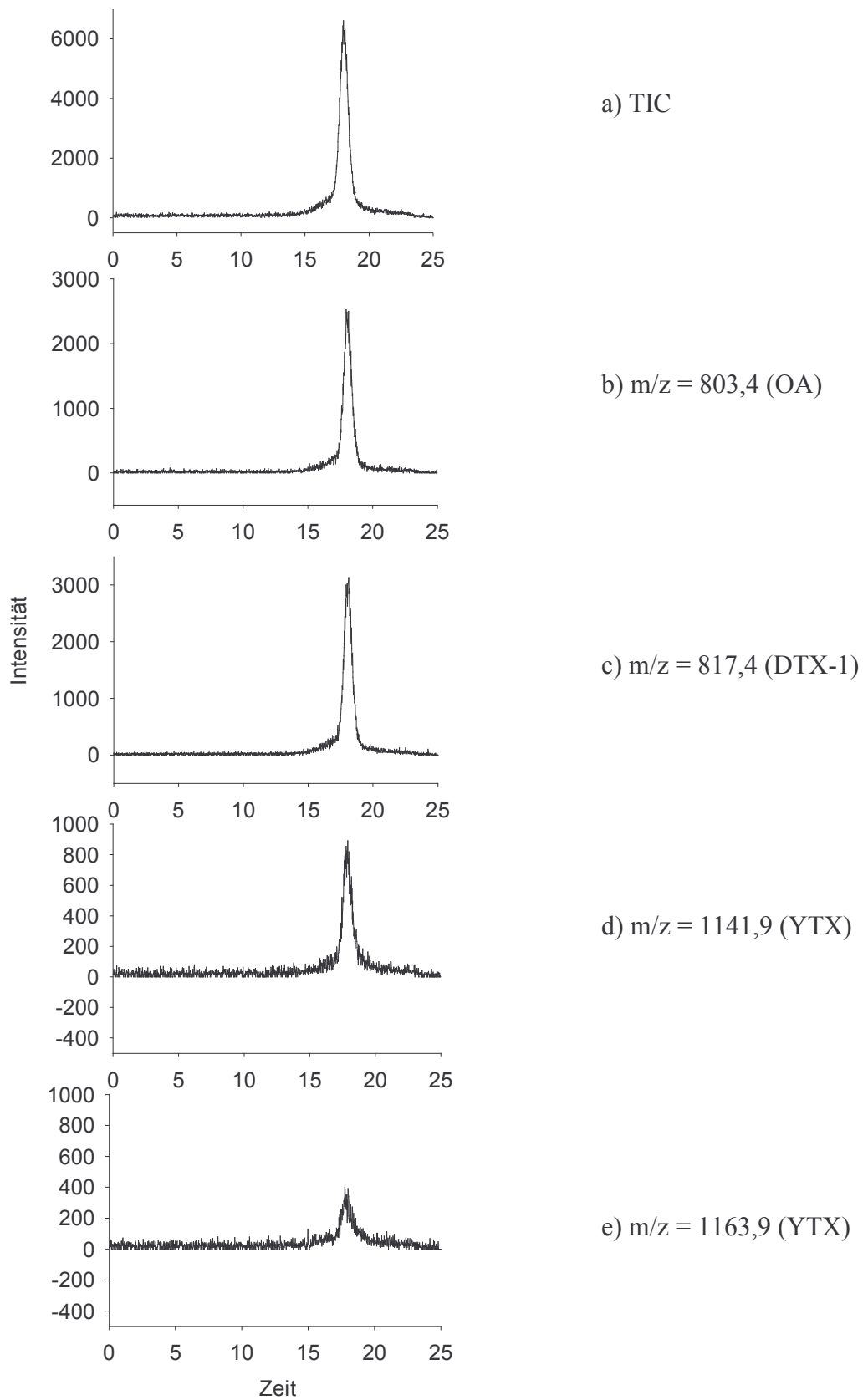


Abb. 5.2: a) TIC sowie Massenspuren von b) $m/z = 803,4$, c) $m/z = 817,4$ d) $m/z = 1141,9$ e) $m/z = 1163,9$ von je 50 ng OA, DTX-1 und YTX bei Kopplung der GPC mit dem Massenspektrometer

In einem weiteren Versuch wurde die Wiederfindung nach Aufgabe einer Standardmischung bestehend aus je 50 ng OA, DTX-1 und YTX auf die GPC-Säule bestimmt. Als zu sammelnde Fraktion wurde das Zeitintervall 14 bis 20 Minuten gewählt. Die Eluate wurden mit Hilfe einer Vakuumentrifuge (Speedvac SPD 121 Premium, mit RVT 4104 Refrigerated Vapor Trap und VLP 120 Valu Pumpe) bei Raumtemperatur und einem Druck über 0,2 Torr eingengt und anschließend mit je 200 μL Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) wieder aufgenommen. Jeweils 20 μL davon wurden per LC/MS untersucht. Die Wiederfindungen lagen bei 85,6 %, 98,4 % bzw. 99,5 % für YTX, OA bzw. DTX-1 (vgl. Tabelle 8.34 (Anhang)).

Diese Methode wurde für matrixbelastete Proben überprüft, indem aus einem Gramm DSP-freiem Muschelmaterial mit 5 mL Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) ein Extrakt hergestellt wurde. Dieser wurde mit OA, DTX-1 und YTX versetzt, so dass je Toxin eine Konzentration von 0,25 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ vorlag. Je 200 μL davon wurden per GPC aufgereinigt, wobei die Eluatfraktionen von 13 Minuten bis 20 Minuten nach Injektion gesammelt und wie bereits beschrieben weiterbehandelt wurden. Die Ausdehnung der zu sammelnden Fraktion auf den Zeitraum von 7 Minuten war der Erhöhung der Wiederfindung geschuldet. Eine nennenswerte Verschlechterung der Abtrennung der Matrix war dadurch nicht zu befürchten, da die meisten Matrixbestandteile die GPC-Säule erst ab 20 Minuten verließen. Parallel dazu wurde eine Blindprobe in gleicher Weise wie die Proben behandelt. Während in der Blindprobe YTX, OA und DTX-1 erwartungsgemäß nicht nachweisbar waren, resultierte bei den dotierten Proben Wiederfindungen von 89,3 % (YTX), 98,4 %, (OA) und 98,7 % (DTX-1) (vgl. Tabelle 8.35 (Anhang)).

5.3. Anwendung des Verfahrens auf natürlich belastetes Muschelmaterial

Die entwickelte Methode wurde anhand einer mit OA, DTX-1 und YTX natürlich kontaminierten Muschelhepatopankreasprobe aus Norwegen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Tore Aune (Department of Pharmacology, Microbiology and Food Hygiene, Norwegian School of Veterinary Sciences, Oslo, Norwegen), getestet.

Für die Dreifachbestimmung wurden jeweils 1,0482 g, 1,1378 g bzw. 1,0798 g des homogenisierten Hepatopankreas mit Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) extrahiert und ad 5 mL aufgefüllt. Davon wurden drei Mal jeweils 200 μL per GPC aufgereinigt und wie oben beschrieben weiter aufgearbeitet, um anschließend per LC/MS die Gehalte an OA, DTX-1 und YTX zu bestimmen.

Die auf diese Weise ermittelten Gehalte an YTX, OA und DTX-1 betragen $1124,8 \pm 21,9 \mu\text{g kg}^{-1}$, $520,5 \pm 5,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ und $699,4 \pm 12,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ (vgl. Tabellen 8.36 bis 8.38 (Anhang)). Die Variationskoeffizienten waren mit Werten unter 2% besonders gering.

Der in der Norwegian School of Veterinary Sciences festgestellte Gehalt der Probe betrug $208 \mu\text{g kg}^{-1}$ YTX, bezogen auf das gesamte Muschelfleisch. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch nur der Hepatopankreas dieser Probe untersucht. Da der Gehalt an YTX im Hepatopankreas durchschnittlich fünf Mal höher liegt als im Muschelfleisch [Torgersen, 2002], würde ein YTX-Gehalt im Hepatopankreas dieser Probe von ca. $1250 \mu\text{g kg}^{-1}$ resultieren, d.h. der mit der neu entwickelten Methode gefundene YTX-Gehalt von $1124,8 \pm 21,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ läge diesem Wert sehr nahe.

6. Zusammenfassung

Schädliche Wirkungen der Massenvermehrungen von Algen (HABs) sind seit langem bekannt. Als besonders problematisch erweist sich dabei der Übergang von Algentoxinen auf Lebensmittel mariner Herkunft.

Die Einteilung der Algentoxine erfolgte nach ihren Wirkungen auf den Menschen. Heute zählt man jedoch z.B. die Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP)-Toxine zu den lipophilen Polyether-Toxinen und unterteilt in 1. Okadasäure und Dinophysistoxine (OA + DTXs), 2. Yessotoxine (YTXs) und 3. Pectenotoxine (PTXs).

DSP-Toxine kommen vor allem in Europa, Japan und Neuseeland vor, und sie werden hauptsächlich von Dinoflagellaten der Gattungen *Dinophysis* und *Prorocentrum* sowie von *Lingulodinium* (YTX) produziert.

OA und DTXs wirken durch Inhibition von Proteinphosphatasen als Tumorpromotoren, YTXs verursachen Ödeme in Herzzellen und PTXs sind hepatotoxisch.

Der Nachweis von DSP-Toxinen kann mit Hilfe von Bioassays mit Mäusen und Ratten, durch Proteinphosphatase-Inhibitionstests und Immuno- oder Cytotoxizitätsassays erfolgen. Bei Anwendung der HPLC mit selektiven Detektoren bedarf es der Derivatisierung, denn DSP-Toxine sind weder UV-aktiv noch zeigen sie native Fluoreszenz.

Der fluorimetrische Nachweis von OA und DTXs als BrMB-Ester weist besonders Vorteile im Hinblick auf die Nachweisempfindlichkeit auf, während die massenspektrometrische Detektion neben ihrer Spezifität vor allem durch die Möglichkeit der Analyse der underivatisierten DSP-Toxine sowie der gemeinsamen Erfassung von verschiedenen Toxin-Gruppen überzeugt.

DTX-3 kann sowohl als intakter Ester als auch nach Hydrolyse als Muttertoxin OA, DTX-1 bzw. DTX-2 nachgewiesen werden.

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) kann auch zur automatisierbaren Probenaufarbeitung von algentoxinhaltigen Extrakten eingesetzt werden.

Vor diesem Hintergrund waren Ziele der vorliegenden Arbeit, die Wiederfindungen der DSP-Toxine vor allem nach der GPC zu optimieren, DTX-3 in die Methodik zu integrieren und das Gesamtverfahren um einen internen Standard zu ergänzen. Die Wirksamkeit der GPC-Aufreinigung sollte auch im Hinblick auf die Aufarbeitung von mit YTX belasteten Muschelextrakten überprüft werden.

Zunächst wurde eine Methode zur massenspektrometrischen Bestimmung der Toxine der OA-Gruppe sowie von Monensin und Desoxycholsäure als mögliche interne Standards entwickelt. Die Wahl des internen Standards fiel zugunsten des Monensins aus, weil -im Unterschied zu Desoxycholsäure- bei geringerer Elutionsdauer die Retentionszeit von Monensin bei der GPC beinahe identisch mit derjenigen von OA und DTXs ist.

Für die Aufreinigung von mit DSP-Toxinen belasteten Extrakten mit Hilfe der GPC eignet sich eine Agarose-Dextran-Säule besser als eine GPC-Säule auf der Basis von Styrol-Divinyl-Copolymeren.

Nach Erhöhung der Essigsäurekonzentration des GPC-Eluenten konnte im Vergleich zu den in der Literatur erwähnten OA-Wiederfindungen ein Anstieg um bis zu einem Fünftel erzielt werden. Die Wiederfindungen betragen bei matrixbelasteten Extrakten ca. 87 %, während bei der GPC von Standardlösungen ca. 96 % erreicht wurden.

Bei der Überprüfung der sich an die GPC anschließenden Probenaufarbeitungsschritte stellte sich heraus, dass beim Einengen des GPC-Eluenten keine Verluste an OA zu erwarten sind.

OA und DTX-1 werden aus homogenisiertem Muschelhepatopankreas durch dreimalige Extraktion mit je 1 mL Methanol : Wasser (4 : 1; v : v) vollständig extrahiert, während für 7-O-palmitoyl-OA (DTX-3) die Wiederfindungen nach Extraktion mit weiteren drei Millilitern Extraktionsmittel zwischen 64 % und 83 % lagen. Der interne Standard Monensin wurde nach viermaliger Anwendung von je 1 mL Extraktionsmittel zu ca. 81 % wiedergefunden.

Die Derivatisierung von OA und DTX-1 mit BrMB wurde unter Verwendung einer acetonischen äquimolaren Lösung der beiden als Katalysator wirkenden Basen Triethylamin und N,N-Diisopropylethylamin (Hünig-Base) optimiert.

Die HPLC-Trennung wurde weiterentwickelt, um neben OA und DTX-1 zusätzlich Monensin und 7-O-palmitoyl-OA als BrMB-Derivate durch Fluoreszenzdetektion bestimmen zu können. Da ausschließlich flüchtige Substanzen im Eluenten eingesetzt wurden und die BrMB-Derivate nach positiver Ionisierung massenspektrometrisch detektierbar sind, ist es problemlos möglich, die BrMB-Derivate außer mit Hilfe der HPLC/FLD-Methode zusätzlich massenspektrometrisch nachzuweisen.

Für den Nachweis von DTX-3 wurde neben der direkten Bestimmung der unhydrolysierten Substanz die Verseifung von DTX-3 zu dem entsprechenden Muttertoxin durchgeführt. Nach Überprüfung der Vollständigkeit der Hydrolyse am Beispiel von 7-O-palmitoyl-OA und der Extraktion der freigesetzten OA mit Chloroform konnte gezeigt werden, dass unter den angewendeten Hydrolysebedingungen OA und DTX-1 nicht zersetzt werden, was für die Bestimmung von DTX-3 über die Erhöhung der Menge an OA bzw. DTX-1 nach Hydrolyse von großer Bedeutung ist. Hingegen war Monensin nach der Hydrolyse nicht mehr nachweisbar.

Bei der Überprüfung der Wiederfindungen für das entwickelte gesamte Verfahren, bestehend aus Extraktion, GPC-Aufreinigung, Einengen, ggf. Hydrolyse und anschließender HPLC/FLD- bzw. LC/MS-Bestimmung, wurde dotiertes Muschelmaterial benutzt.

Die Wiederfindungen der underivatisierten DSP-Toxine lagen bei den LC/MS-Bestimmungen im Bereich 80-107 %, jedoch wurden nach der HPLC/FLD-Bestimmung deutlich geringere Wiederfindungsraten im Bereich von 35 % bis 60 % ermittelt.

Nach der Hydrolyse war 7-O-palmitoyl-OA erwartungsgemäß nicht mehr nachweisbar, während in allen Fällen ein Anstieg der OA-Konzentration erfolgt war.

Die Methodik wurde zusätzlich mit Hilfe von Muschelmaterial, dessen OA- und DTX-1-Gehalte zertifiziert waren, überprüft. Nach MS-Detektion der underivatisierten Analyten ergaben sich für DTX-1 sowie den internen Standard Monensin Wiederfindungen nahe 100 %, für OA wurden 83 % bzw. 92 % bestimmt. Dagegen lagen die Wiederfindungen für alle genannten Analyte bei den HPLC/FLD-Bestimmungen auf sehr niedrigem Niveau im Bereich 14 % bis 26 %.

Bei Anwendung des Verfahrens auf natürlich belastetes Muschelmaterial wurden OA-Gehalte um $350 \mu\text{g kg}^{-1}$ nach HPLC/FLD- bzw. $395 \mu\text{g kg}^{-1}$ nach LC/MS-Bestimmung gemessen. Nach Hydrolyse der DSP-haltigen Extrakte war der vorher ermittelte OA-Gehalt deutlich auf über $650 \mu\text{g OA kg}^{-1}$ (HPLC/FLD) bzw. Werte um $950 \mu\text{g OA kg}^{-1}$ (LC/MS) angestiegen.

Bezüglich der Wiederfindung von Monensin wurden widersprüchliche Ergebnisse erhalten. Auf der Basis der vorliegenden Daten konnte über eine Eignung von Monensin als interner Standard nicht endgültig entschieden werden.

Im Rahmen der Entwicklung einer Methode zum Nachweis von YTX neben OA und DTXs wurde zunächst ein LC/MS-Verfahren zum Nachweis von YTX, OA und DTX-1 etabliert, dessen chromatographische Trennung auf einer Gradientenelution mit einem Gemisch aus Methanol und 10 mM wässriger Ammoniumacetatlösung unter Verwendung einer C4-Phase beruhte. Die MS-Detektion erfolgte nach negativer Ionisation der Analytenmoleküle.

Vor der LC/MS-Bestimmung wurden YTX- sowie OA- und DTX-1-haltige Extrakte mit Hilfe der GPC unter isokratischen Bedingungen mit einem Eluenten aus Methanol : 10 mM wässriger Ammoniumacetatlösung (13 : 7; v : v) gereinigt. Die Flussrate betrug $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Unter diesen GPC-Bedingungen eluieren OA, DTX-1 und YTX zwischen 13 und 20 Minuten.

Eine Überprüfung des gesamten Verfahrens (GPC und LC/MS-Bestimmung) mit dotierter Muschelmatrix ergab Wiederfindungen von 89 % für YTX, 98 % für OA und 99 % für DTX-1. Bei der Anwendung auf ein natürlich belastetes Muschelhomogenisat wurden DSP-Gehalte von $521 \mu\text{g kg}^{-1}$ OA, $699 \mu\text{g kg}^{-1}$ DTX-1 und $1125 \mu\text{g kg}^{-1}$ YTX ermittelt.

Aus diesen Resultaten ergibt sich als Schlussfolgerung, dass DSP-Bestimmungen sowohl mit HPLC/FLD-Verfahren als auch mit Hilfe der LC/MS-Kopplung erfolgen können. Im Hinblick auf die Wiederfindung erweisen sich LC/MS-basierte Methoden jedoch den HPLC/FLD-Verfahren als überlegen.

7. Literatur

Aase B, Rogstad A: 1997

Optimization of sample cleanup procedure for determination of diarrhetic shellfish poisoning toxins by use of experimental design. *J Chromatogr A*; 764: 223-231

Adema DMM: 1978

Daphnia magna as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiologia*; 59: 125-134

Akasaka K, Ohrui H, Meguro H: 1993

Determination of carboxylic acids by high-performance liquid chromatography with 2-(2,3-Anthracenedicarboximido)ethyl trifluoromethanesulfonate as a highly sensitive fluorescent labelling reagent. *Analyst [London]*; 118: 765-768

Akasaka K, Ohrui H, Meguro H, Yasumoto T: 1996a

Fluorimetric determination of diarrhetic shellfish toxins in scallops and mussels by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*; 729: 381-386

Akasaka K, Ohrui H, Meguro H, Yasumoto T: 1996b

Determination of dinophysistoxin-3 by the LC-LC method with fluorometric detection. *Analytical Sciences*; 12: 557-560

Amersham Pharmacia Biotech [Hrsg]: 1999

Superdex Peptide HR 10/30 – Manual. Wikströms Verlag, [Ort unbekannt], Schweden

Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, 2002

Entscheidung 2002/225/EC. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften; L75, 16.03.2002 (Aktenzeichen K(2002) 1001): 62-64

Amzil Z, Pouchus YF, Le Boterff J, Roussakis C, Verbist JF, Marcaillou-LeBaut C., Masselin P: 1992

Short-time cytotoxicity of mussel extracts: a new bioassay for okadaic acid detection. *Toxicon*; 30: 1419-1425

Aune T, Sorby R, Yasumoto T, Ramstad H, Landsverk T: 2002

Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice. *Toxicon*; 40: 77-82

Aune T, Yndestad M: 1993

Diarrhetic shellfish poisoning; in: Falconer, IR (ed): *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, London; 87-104

Backer LC, Fleming LE, Rowan AD, Baden DG: 2003

Epidemiology, public health and human diseases associated with harmful marine algae; in: Hallegraeff G M, Anderson DM, Cembella AD (eds): *Manual on harmful marine microalgae*. UNESCO, Paris; 723-749

- Balmer-Hanchey E L, Jaykus L-A, Green D P, McClellan-Green P: 2003
Marine biotoxins of algal origin and seafood safety. *J Aquat Food Prod Technol*; 12 (1): 29-53
- Barker SA, Monti JA, Christian ST, Benington F, Morin RD: 1980
9-Diazomethylanthracene as a new fluorescence and ultraviolet label for the spectrometric detection of picomole quantities of fatty acids by high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem*; 107: 116-123
- Blaicher M: 2001
persönliche Mitteilung vom 18.07.2001
- Bialojan C, Takai A: 1988
Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. *Biochem J*; 256: 283-290
- Bouaicha N, Hennion MC, Sandra P: 1997
Determination of okadaic acid by micellar electrokinetic chromatography with ultraviolet detection. *Toxicon*; 35: 273-281
- Brana Magdalena A, Lehane M, Krys S, Fernandez ML, Furey A, James KJ: 2003
The first identification of azaspiracids in shellfish from France and Spain. *Toxicon*; 42: 105-108
- Briggs L, Fitzgerald J, Garthwaite L, Miles C, Garthwaite I, Ross K, Towers N, Samdal I, Aasen J, Torgersen T, Aute, T, Peterson D: 2002
Immunoassay for the analysis of yessotoxins. Fourth International conference on molluscan shellfish safety; Santiago de Compostella, Spanien; zitiert in:
Franchini A, Milandri A, Poletti R, Ottaviani E: 2003
Immunolocalization of yessotoxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*; 41: 967-970
- Bruins, AP: 1994
Atmospheric-pressure-ionization mass spectrometry. *Trends Anal Chem*; 13: 37-43
- Bruins AP, Covey TR, Henion JD: 1987
Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Anal Chem*; 59: 2642-2646
- Bürk, C, Usleber, E, Märtlbauer E.: 1998
Vergiftungen durch Toxine mariner Algen –eine Übersicht. *Arch Lebensmittelhyg*; 49: 1-24
- Carmody EP, James KJ, Kelly SS: 1995
Diarrhetic shellfish poisoning: evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay methods for determination of dinophysistoxin-2. *JAOAC Int*; 78: 1403-1408
- Cembella AD, Lewis RJ, Quilliam MA: 2000
The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) as the causative organism of spirolide shellfish toxins. *Phycologia*; 39: 67-74.

- Cembella AD, Milenkovic LV, Doucette GJ, Fernandez M: 1995
In vitro biochemical methods and mammalian bioassays for phycotoxins; in: Hallegraef GM, Anderson DM, Cembella AD (eds): Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC/UNESCO, 177-228
- Chin JD, Quilliam MA, Fremy JM, Mohapatra S, Sikorska HM: 1995
Screening for okadaic acid by immunoassay. *J AOAC Int*; 78: 508-513
- Chou T, Haino T, Nagatsu A, Uemura D, Fukuzawa S, Zheng SZ, Chen, HS: 1994
Structure of pinnatoxins, potent shellfish poisons. *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu*; 36: 57-64
- Ciminiello P, Forino M, Poletti R, Viviani R: 2000a
A new analogue of yessotoxin, carboxyessotoxin, isolated from Adriatic sea mussels. *Eur J Organic Chem*; 291-295
- Ciminiello P, Fattorusso E, Forino M, Poletti R, Viviani R,: 2000b
Structure determination of carboxyhomoyessotoxin, a new yessotoxin analog isolated from Adriatic mussels. *Chem Res Toxicol*; 13: 770-774
- Ciminiello P, Fattorusso E, Forino M, Magno S, Poletti R, Viviani R:1998
Isolation of adriatoxin, a new analogue of yessotoxin, from mussels of the Adriatic Sea. *Tetrahedron Lett*; 39: 8897-8900
- Cohen P: 1989
The structure and regulation of protein phosphatases. *Ann Rev Biochem*; 58: 453-508
- Cohen P, Holmes CFB, Tsukitani Y: 1990
Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem Sci*; 15: 98-102
- Croci L, Cozzi L, Stacchini A, De Medici D, Toti L: 1997
A rapid tissue culture assay for the detection of okadaic acid and related compounds in mussels. *Toxicon*; 35: 223-230
- Dahlmann J, Budakowski WR, Luckas, B.: 2003
Liquid-chromatography-electrospray ionisation -mass spectrometry based method for the simultaneous determination of algal and cyanobacterial toxins in phytoplankton from marine waters and lakes followed by tentative structural elucidation of microcystins. *J Chromatogr A*; 994: 45-57
- Daiguji M., Satake M, James KJ, Bishop A, Mackenzie L, Naoki H, Yasumoto T: 1998b
Structures of new pectenotoxin analogs, pectenotoxin-2 seco acid and 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid, isolated from a dinoflagellate and greenshell mussels. *Chem Lett*: 653-654
- Daiguji M, Satake M, Ramstad H, Aune T, Naoki H, Yasumoto T: 1998a
Structure and fluorometric HPLC determination of 1-desulfoyessotoxin, a new yessotoxin analog isolated from mussels from Norway. *Nat Toxins*; 6: 235-239

- Dallal, G E, Wilkinson, L: 1986
An analytical approximation to the distribution of Lilliefors's test statistic for normality. *Am Stat*; 40: 294-296 Corrigenda: 1987 41: 248
- de Hoffmann E, Stroobant V: 1999
Mass spectrometry- principles and applications. Wiley, Chichester, second edition
- de la Rosa LA, Alfonso A, Vilarino N, Vieytes MR, Botana LM: 2001
Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin. *Biochem Pharmacol*; 61: 827-833
- Dickey, RW, Granade HR, Bencsath, FA: 1993
Improved analytical methodology for the derivatization and HPLC-fluorometric determination of okadaic acid in phytoplankton and shellfish; in: Smayda, TJ, Shimizu Y (eds): Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam ; 495-499
- Doerfel K: 1990
Statistik in der analytischen Chemie. 5. erw. u. überarb. Aufl.. Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig
- Draisci, R, Lucentini, L, Mascioni, A 2000
Pectenotoxins and yessotoxins: chemistry, toxicology, pharmacology, and analysis; in: Botana, LM. (ed): Seafood and freshwater toxins- pharmacology, physiology, and detection. Marcel Dekker, New York; 289-324
- Dünges W: 1977a
4-bromomethyl-7-methoxycoumarin as a new fluorescence label for fatty acids. *Anal Chem*; 49: 442-445
- Dünges W: 1977b
The HPLC and T. L. C. determination of acidic compounds after their fluorescence labeling with 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin: a new tool for biomedical trace analysis. *J Chromatogr*; 612: 38-45
- Dünges W, Meyer A, Müller KE, Müller M, Pietschmann R, Plachetta C, Sehr R, Tuss H: 1977
Fluorescence labelling of organic acidic compounds with 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin (Br-MMc). *Fresenius Z Anal Chem*; 288: 361-368
- Duffield, Todd F., Bagg, Ranald N.: 2000
Use of ionophores in lactating dairy cattle: a review. *Can Vet J*; 41: 388-394
- Falbe J, Regitz, M (Hrsg), Römpp, H [Begr]: 1995
Römpp Chemielexikon, Thieme, Stuttgart, 9. Auflage
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF: 1990
Electrospray ionization-principles and practice. *Mass Spectrom Rev*; 9: 37-70
- Fernandez JJ, Candenas M, Souto ML, Trujillo MM, Norte M: 2002
Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes. *Curr Med Chem*; 9: 229-262

- Fernandez ML, Miguez A, Cacho E, Martinez A: 1996
Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of Spanish mussels. *Toxicon*; 34: 381-387
- Fernandez ML; Richard DJA, Cembella AD: 2003a
In vivo assays for phycotoxins; in: Hallegraeff G M, Anderson DM, Cembella AD (eds): Manual on harmful marine microalgae. UNESCO, Paris; 347-380
- Fernandez ML; Shumway S, Blanco J: 2003b
Management of shellfish resources; in: Hallegraeff G M, Anderson DM, Cembella AD (eds): Manual on harmful marine microalgae. UNESCO, Paris; 657-692
- Fremy JM, Puech L, Krysz S, Dragacci S: 1999
Recent advances in analytical procedures for the detection of diarrhetic phycotoxins: a review. *J Appl Phycol*; 11: 377-384
- Fujiki H, Suganuma M, Suguri H, Yoshizawa S, Takagi K, Uda N, Wakamatsu K, Yamada K, Murata M: 1988
Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promoter on mouse skin. *Jpn J Cancer Res*; 79: 1089-1093
- Garthwaite I, Ross KM, Miles CO, Briggs LR, Towers NR, Borrell T, Busby P: 2001
Integrated enzyme-linked immunosorbent assay screening system for amnesic, neurotoxic, diarrhetic, and paralytic shellfish poisoning toxins found in New Zealand. *J AOAC Int*; 84: 1643-1648
- Gauss CM, Sheppeck JE, Nairn AC, Chamberlin R: 1997
A molecular modeling analysis of the binding interactions between the okadaic acid class of natural product inhibitors and the Ser-Thr phosphatases, PP1 and PP2A. *Bioorg Med Chem*; 5: 1751-1773
- Goto H, Igarashi T, Yamamoto M, Yasuda M, Sekiguchi R, Watai M, Tanno K, Yasumoto, T.: 2001
Quantitative determination of marine toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J Chromatogr A*; 907: 181-189
- Hallegraeff, G M: 1993
A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologica*; 32: 79-99
- Hallegraeff, G M: 2003
Harmful algal blooms: a global overview; in: Hallegraeff G M, Anderson DM, Cembella AD (eds): Manual on harmful marine microalgae. UNESCO, Paris; 25-49
- Hamano Y, Kinoshita Y, Yasumoto T: 1985
Suckling mice assay for diarrhetic shellfish toxins; in: Anderson DM, White AW, Baden DG (eds): Toxic Dinoflagellates. Elsevier, New York; 383-388

- Haystead TAJ, Sim ATR, Carling D, Honnor RC, Tsukitani Y, Cohen P, Hardie DG: 1989
Effects of the tumor promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature*; 337: 78-81
- Herderich M, Schreier P: 1996
HPLC-MS/MS in der Naturstoff-und Lebensmittelanalytik. *GIT Fachz Lab*; 9: 841-845
- Holmes MJ, Lewis RJ, Jones A, Hoy AWW: 1995
Cooliatoxin, the first toxin from *Coolia monotis* (Dinophyceae). *Nat Toxins*; 3: 355-362
- Honkanen, RE, Mowdy DE, Dickey RW: 1996a
Detection of DSP-toxins, okadaic acid and dinophysistoxin-1, in shellfish by serine/threonine protein phosphatase assay. *JAAC Int*; 79: 1336-1343
- Honkanen RE, Stapleton JD, Bryan DE, Abercrombie J: 1996b
Development of a protein phosphatase-based assay for the detection of phosphatase inhibitors in crude whole cell and animal extracts. *Toxicon*; 34: 1385-1392
- Hu T, Curtis JM, Oshima Y, Quilliam MA, Walter JA, Watson-Wright WM, Wright JLC: 1995a
Spirolides B and D, two novel macrocycles isolated from the digestive glands of shellfish. *Chem Soc Chem Commun*: 2159-2161
- Hu T, Curtis JM, Walter JA, McLachlan JL, Wright JLC: 1995b
Two new water-soluble DSP toxin derivatives from *Prorocentrum maculosum*: Possible storage and excretion products of the dinoflagellate. *Tetrahedron Lett*; 36: 9273-9276
- Hu T, Curtis JM, Walter JA, Wright JLC: 1995c
Identification of DTX-4, a new water-soluble phosphatase inhibitor from the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *J Chem Soc, Chem Commun*; 597-599
- Hu T, Curtis JM, Walter JA, Wright JLC: 1996
Characterization of biologically inactive spirolides E and F: identification of the spirolide pharmacophore. *Tetrahedron Lett*; 37: 7671-7674
- Hu T, Doyle J, Jackson D, Marr J, Nixon E, Pleasance S, Quilliam MA, Walter JA, Wright JLC: 1992a
Isolation of a new diarrhetic shellfish poison from Irish mussels. *J Chem Soc, Chem Commun*; 30: 39-41
- Hu T, Marr J, de Freitas ASW, Quilliam MA, Walter JA, Wright JLC, Pleasance S: 1992b
New diol esters of okadaic acid isolated from cultures of the dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum concavum* *J Nat Prod*; 55: 1631-1637
- Hummert C, Kastrup S, Reinhardt K, Reichelt M, Luckas B: 2000a
Use of gel permeation chromatography for automatic and rapid clean-up for the determination of diarrhetic shellfish toxins (DSP) by liquid-chromatography- mass spectrometry. *Chromatographia*; 51: 397-403

- Hummert C, Reichelt M, Luckas B: 2000b
New strategy for the determination of microcystins and diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins, two potent phosphatase 1 and 2A inhibitors and tumor promoters. *Fresen J Anal Chem*; 366: 508-513
- Hummert C, Rühl A, Reinhardt K, Gerdt G, Luckas B: 2002
Simultaneous analysis of different algal toxins by LC-MS. *Chromatographia*; 55: 673-680
- Hummert C, Shen JL, Luckas B: 1996
Automatic high-performance liquid chromatographic method for the determination of diarrhetic shellfish poison. *J Chromatogr A*; 729: 387-392
- Ito E, Terao K: 1994
Injury and recovery process of intestine caused by okadaic acid and related compounds. *Nat. Toxins*; 2: 371-377
- Ishige, Masamichi, Satoh, Nanao, Yasumoto, Takeshi: 1988
Pathological studies on mice administered with the causative agent of diarrhetic shellfish poisoning (okadaic acid and pectenotoxin-2). *Hokkaidoritsu Eisei Kenkyushoho (Report from the Hokkaido Institute of Health)*; 38: 15-18
- Ishihara H, Martin BL, Brautigam DL, Karaki H, Ozaki H, Kato Y, Fusetani N, Watabe S, Hashimoto K, Uemura D, Hartshorne DJ: 1989
Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem Biophys Res Commun*; 159: 871-877
- James K J, Bishop AG, Draisci R, Palleschi L, Marchiafava C, Ferretti E, Satake M, Yasumoto T: 1999
Liquid chromatographic methods for the isolation and identification of new pectenotoxin-2 analogues from marine phytoplankton and shellfish. *J Chromatogr A*; 844: 53-65
- James KJ, Furey A, Healy B, Kelly SS, Twohig M: 1998
Luminarin-3, a new fluorimetric reagent for the HPLC determination of diarrhoeic shellfish poisoning toxins; in: Reguera B, Blanco J, Fernandez ML, Wyatt T (eds): *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC/UNESCO, Vigo; 519-520
- James K J, Moroney C, Roden C, Satake M, Yasumoto T, Lehane M, Furey A: 2003
Ubiquitous "benign" algae emerges as the cause of shellfish contamination responsible for the human toxic syndrome, azaspiracid poisoning. *Toxicon*; 41: 145-151 (in: Brana Magdalena A, Lehane M, Krys S, Fernandez ML, Furey A, James KJ: 2003
The first identification of azaspiracids in shellfish from France and Spain. *Toxicon*; 42: 105-108
- Jung JH, Sim CJ, Lee CO: 1995
Cytotoxic compounds from a two-sponge association. *J Natural Products*; 58: 1722-1726
- Kastrup, S: 1999
Entwicklung und Anwendung einer Methode zur Bestimmung von Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP)-Toxinen. Diss Friedrich-Schiller-Univ Jena

- Kat, M: 1979
The occurrence of of *Prorocentrum* species and coincidental gastrointestinal illness of mussel consumers; in: Taylor, D, Seliger HH (eds): Toxic Dinoflagellate Blooms. Elsevier, Amsterdam; 215-220
- Kat, M: 1983
Diarrhetic mussel poisoning in the Netherlands related to the dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *Ant van Leeuwenhoek*; 49: 417-427
- Köhler W, Schachtel G, Voleske P: 1995
Biostatistik- Einführung in die Biometrie für Biologen und Agrarwissenschaftler. 2. aktual. u. erw. Aufl. Springer Verlag, Berlin
- Lee JS, Igarashi T, Fraga S, Dahl E, Hovgaard P, Yasumoto T: 1989a
Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J Appl Phycol*; 1: 147-152
- Lee JS, Murata M, Yasumoto T: 1989b
Analytical methods for determination of diarrhetic shellfish toxins. *Bioact Mol (Mycotoxins Phycotoxins '88)*; 10: 327-334
- Lee JS, Yanagi T, Kenma R, Yasumoto T: 1987
Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. *Agric Biol Chem*; 51: 877-881
- Leira F, Alvarez G, Cabado AG, Cabado AG, Vieites JM, Botana LM: 2003
Development of a F-actin-based live-cell fluorimetric microplate assay for diarrhetic shellfish toxins. *Anal Biochem*; 317: 129-135
- Leira F, Cabado AG, Vieytes MR, Yolanda R, Alfonso A, Botana LM: 2002
Characterization of F-actin depolymerization as a major toxic event induced by pectenotoxin-6 in neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol*; 63 (11): 1979-1988
- Levine L, Fujiki H, Yamada K, Ojika M, Gjika HB, Van Vunakis H: 1988
Production of antibodies and development of a radioimmunoassay for okadaic acid. *Toxicon*; 26: 1123-1128
- Luu HA, Chen DZX, Magoon, J, Worms J, Smith J, Holmes CFB: 1993
Quantification of diarrhetic shellfish toxins and identification of novel protein phosphatase inhibitors in marine phytoplankton and mussels. *Toxicon*; 31: 75-83
- Marr JC, Hu T, Pleasance S, Quilliam MA, Wright JLC: 1992
Detection of new 7-O-acyl derivatives of diarrhetic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon*; 30: 1621-1630
- Marr JC, McDowell LM, Quilliam MA: 1994
Investigation of derivatization reagents for the analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins by liquid chromatography with fluorescence detection. *Nat Toxins*; 2: 302-311

- Matabudul DK, Lumley, ID, Points, JS: 2002
The determination of 5 anticoccidial drugs (nicarbazin, laslaocid, monensin, salinomycin, and narasin) in animal livers and eggs by liquid chromatography linked with tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Analyst*; 127: 760-768
- Matsuura S, Hamano Y, Kita H, Takagaki Y: 1994a
An ELISA for okadaic acid and its analogs among the diarrhetic shellfish toxins using mouse monoclonal anti-okadaic acid antibodies which are resistant to organic solvents. *Jpn J Toxicol Environ Health*; 40: 365-373
- Matsuura S, Kita H, Takagaki Y: 1994b
Specificity of mouse monoclonal anti-okadaic acid antibodies to okadaic acid and its analogs among diarrhetic shellfish toxins. *Biosci Biotech Biochem*; 58: 1471-1475
- McMahon, T, Silke, J: 1996
Winter toxicity of unknown aetiology in mussels. *Harmful Algae News*; 14: 2
- Miguez, A, Fernandez ML, Cacho E, Martinez A: 1998
Mouse survival time as a DSP toxicity criterion; in: Reguera B, Blanco J, Fernandez ML, Wyatt T (eds): Harmful Algae. Xunta de Galicia and IOC/UNESCO, Vigo; 239-240
- Mondeguer F, Marcaillou C, Plomb EL, Marquais M, Simon JF, Vernoux JP: 1998
Assay of diarrhetic toxins by inhibition of protein phosphatase extracted from mussel meat; in: Reguera B, Blanco J, Fernandez ML, Wyatt T (eds): Harmful Algae. Xunta de Galicia and IOC/UNESCO, Vigo; 545-546
- Murata M, Kumagai M, Lee JS, Yasumoto T: 1987
Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Lett*; 28: 5869-5872
- Murata M, Shimatani M, Sugitani H, Oshima Y, Yasumoto T: 1982
Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning. *Bull Jpn Soc Sci fish*; 48: 549-552
- Nakanishi A, Naganuma H, Kondo J, Watanabe K, Hirano K, Kawasaki T, Kawahara Y: 1992
3-bromomethyl-7-methoxy-1,4-benzoxazin-2-one as a highly sensitive fluorescent derivatisation reagent for carboxylic acids in high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*; 591: 159-164
- Nakaya T, Tomomoto T, Imoto M: 1967
The syntheses and the reactions of 9-anthryldiazomethane and α -naphthyldiazomethane. *Bull Chem Soc Japan*; 40: 691-692
- Niessen WMA, Tinke AP: 1995
Liquid chromatography-mass spectrometry. General principles and instrumentation. *J Chromatogr A*; 703: 37-57
- Nishiwaki S, Fujiki H, Sukanuma M, Furuya-Suguri H, Matsushima R, Ieda Y, Ojika M, Yamada K, Uemura D, Yasumoto, T: 1990
Structure-activity relationship within a series of okadaic acid derivatives. *Carcinogenesis*; 11: 1837-1841

- Ogino H, Kumagai M, Yasumoto T: 1997
Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Nat Toxins*; 5: 255-259
- Pereira A, Klein D, Sohet K, Houvenaghel G, Braekman JC: 1995
Improved HPLC analysis method for the determination of acidic DSP toxins; in: Lassus P, Arzul G, Erard E, Gentien P, Marcaillou C (eds): Harmful Marine Algal Blooms; Lavoisier Intercept Ltd., Paris; 159
- Pharmacia Biotech (Hrsg): 1997
Gel filtration – principles and methods. 7. Auflage. Rahms Verlag, Lund (Schweden), 7. Auflage
- Phenomenex, 2003a
Online-Dokumentation zu Hypersil-BDS-HPLC-Säulen.
<http://www.phenomenex.com/Phen/Docs/zhhyp.pdf> (19.03.2003), pdf-Dokument, 4 Seiten
- Phenomenex, 2003b
Online-Dokumentation zu Jupiter-HPLC-Säulen.
<http://www.phenomenex.com/Phen/Docs/zhjup.pdf> (19.03.2003), pdf-Dokument, 10 Seiten
- Phenomenex, 2003c
Online-Dokumentation zu Phenogel-HPLC-Säulen.
<http://www.phenomenex.com/Phen/Docs/zhphg.pdf> (19.03.2003), pdf-Dokument, 10 Seiten
- Pierotti S, Malagutilet C, Milandri A, Poletti R, Rossini GP: 2003
Functional assay to measure yessotoxins in contaminated mussel samples. *Anal Biochem*; 312: 208-216
- Pleasance S, Thibault P, Kelly J: 1992
Comparison of liquid-junction and coaxial interfaces for capillary electrophoresis-mass spectrometry with application to compounds of concern to the aquaculture industry. *J Chromatogr*; 591: 325-339
- Porath J, Flodin P: 1959
Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature*; 183: 1657-1659
- Quilliam, M.A.: 1995
Analysis of diarrhetic shellfish poisoning in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection. *JAOAC Int*; 78: 555-569
- Quilliam, M A: 1999
Phycotoxins (General Referee annual report for AOAC International). *JAOAC Int*; 82: 773-781
- Quilliam, M.A.: 2003
Chemical methods for lipophilic shellfish toxins; in: Hallegraeff G M, Anderson DM, Cembella AD (eds): Manual on harmful marine microalgae. UNESCO, Paris; 211-245

- Quilliam MA, Gago-Martinez A, Rodriguez-Vazquez JA: 1998
Improved method for preparation and use of 9-anthryldiazomethane for derivatization of hydroxy carboxylic acids: application to diarrhetic shellfish poisoning toxins. *J Chromatogr A*; 807: 229-239
- Quilliam MA, Hardstaff WR, Ishida N, McLachlan JL, Reeves AR, Ross NW, Windust AJ: 1996
Production of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins by *Prorocentrum lima* in culture and development of analytical methods; in: Yasumoto T, Oshima Y, Fukuyo Y (eds): Harmful and Toxic Algal Blooms. IOC/UNESCO, Paris; 289-292
- Quilliam MA, Hess P, Dell'Aversano C: 2001
Recent developments in the analysis of phycotoxins by liquid-chromatography –mass spectrometry; in: de Koe WJ, Samson RA, van Egmond HP, Gilbert J, Sabino M (eds): Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the century, WJ de Koe, Amsterdam, 383-391
- Quilliam MA, Wright JLC: 1995
Methods for diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins; in: Hallegraef GM, Anderson DM, Cembella AD (eds): Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC/UNESCO, Paris; 97-113
- Ramstad H, Larsen S, Aune T: 2001
Repeatability and validity of a fluorometric HPLC method in the quantification of yessotoxin in blue mussels (*Mytilus edulis*) related to the mouse bioassay. *Toxicon*; 39: 1393-1397
- Russell, James B: 1997
Mechanism of action of ionophores. Proc Cornell nutrition conference for feed manufacturers, Cornell University, USA: 88-92
- Sachs, L: 2002
Angewandte Statistik – Anwendung statistischer Methoden. 10. überarb. u. aktual. Aufl. Springer Verlag, Berlin
- Sasaki K, Takizawa A, Tubaro A, Sidari L, Della Loggia R, Yasumoto T: 1999
Fluorometric analysis of pectenotoxin-2 in microalgal samples by high performance liquid chromatography mass spectrometry. *Nat Toxins*; 7: 241-246
- Sasaki K, Wright JLC, Yasumoto T: 1998
The identification and characterization of pectenotoxin (PTX) 4 and PTX7 as spiroketal stereoisomers of two previously reported pectenotoxins. *J Org Chem*; 63: 2475-2480
- Satake M, MacKenzie L, Yasumoto T: 1997
Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Nat Toxins*; 5: 164-167
- Satake M, Ofuji K, James K, Furey A, Yasumoto T: 1998a
New toxic event caused by Irish Mussels; in: Reguera B, Blanco J, Fernandez ML, Wyatt T (eds): Harmful Algae. Xunta de Galicia and IOC/UNESCO, Vigo; 468-469

- Satake M, Ofuji K, Naoki H, James K, Furey A, McMahon T, Silke J, Yasumoto T: 1998b
Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*. *J Am Chem Soc*; 120: 9967-9968
- Satake M, Terasawa K, Kadowari Y, Yasumoto T: 1996
Relative configuration of yessotoxin and isolation of two new analogs from toxic scallop. *Tetrahedron Lett*; 37: 5955-5958
- Satake M, Tubaro A, Lee JS, Yasumoto T: 1997b
Two new analogs of yessotoxin, homoyessotoxin and 45-hydroxyhomoyessotoxin, isolated from mussels of the Adriatic Sea. *Nat Toxins*; 5: 107-110
- Sciex (ed): 1990
The API Book. Central reproductions, Mississauga, Ontario, Fifth printing
- Seki, T, Satake M Mackenzie L, Kaspar HF, Yasumoto T. 1995
Gymnodimine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from New Zealand oysters and the dinoflagellate *Gymnodinium* sp. *Tetrahedron Lett*; 36: 7093-7096
- Shen JL, Hummert C, Luckas, B: 1997
Sensitive HPLC-fluorometric and HPLC-MS determination of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins as 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin esters. *Fresen J Anal Chem*; 357: 101-104
- Shibata S, Ishida Y, Kitano H, Ohizumi Y, Habon J, Tsukitani Y, Kikuchi H: 1982
Contractile effects of okadaic acid, a novel ionophore-like substance from black sponge, on isolated smooth muscles under the condition of calcium deficiency. *J Pharmacol Exp Ther*; 223: 135-143
- Shimizu Y, Kinoshita M, Ooi F: 1998
Highly sensitive, non-radioactive assays for protein phosphatase 1 and protein phosphatase 2A. in: Reguera B, Blanco J, Fernandez ML, Wyatt T (eds): Harmful Algae. Xunta de Galicia and IOC/UNESCO, Vigo, Spanien; 537-540
- Shiraki K, Nakaya K, Sugitani A, Yamada, F: 1985
Determination of diarrhetic shellfish poison by measuring 50% acid phosphatase activity inhibitory concentration (APIC50). *J Food Hyg Soc Japan*; 26: 638-642
- Sidari L, Nichetto P, Cok S, Sosa S, Tubaro A, Honsell G, Della Loggia R: 1998
Phytoplankton selection by mussels, and diarrhetic shellfish poisoning. *Mar Biol*: 131; 103-111
- Simon JF, Vernoux JP: 1994
Highly sensitive assay of okadaic acid using protein phosphatase and paranitrophenyl phosphate. *Nat Toxins*; 2: 293-301
- Stabell OB, Hormazabal V, Steffenak I, Pedersen K: 1991
Diarrhetic shellfish toxins: improvement of sample clean-up for HPLC determination. *Toxicon*; 29: 21-29

- Stockemer J, Gürke M: 1993
Optimierung einer HPLC-Methode zur Bestimmung von DSP-Toxinen. *Arch Lebensmittelhyg*; 44: 146-147
- Suárez-Gómez B, Souto ML, Norte M, Fernandez JJ: 2001
Isolation and structural determination of DTX-6, a new okadaic acid derivative. *J Nat Prod*; 64: 1363-1364
- Suganuma M, Fujiki H, Suguri H, Yoshizawa S, Hirota M, Nakayasu M, Ojika M, Wakamatsu K, Yamada K, Sugimura T: 1988
Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradecanoate 13-acetate-type tumor promoter. *Proc Nat Acad Sci USA*; 85: 1768-1771
- Suzuki T: 1994
High-performance liquid chromatographic resolution of dinophysistoxin-1 and free fatty acids as 9-anthrylmethyl esters. *J Chromatogr A*; 677: 301-306
- Suzuki T, MacKenzie L, Stirling D, Adamson J: 2001
Pectenotoxin-2 seco acid: a toxin converted from pectenotoxin-2 by the New Zealand greenshell mussel, *Perna canaliculus*. *Toxicon*; 39: 507-514
- Suzuki T, Ota H, Yamasaki M: 1999
Direct evidence of transformation of dinophysistoxin-1 to 7-O-acyl-dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Toxicon*; 37: 187-198
- Swain, JE, Robitaille, R, Dass GR, Charlton, MP: 1991
Phosphatases modulate transmission and serotonin facilitation at synapses: studies with the inhibitor okadaic acid. *J Neurobiol*; 22: 855-864
- Syhre M, Unger E: 1996
An alternative clean-up for ADAM-derivatives of DSP-toxins without halogenated solvents; in: Yasumoto T, Oshima Y, Fukuyo Y (eds): Harmful and Toxic Algal Blooms. IOC/UNESCO, Paris; 535-538
- Tachibana K, Scheuer PJ, Tsukitani Y, Kikuchi H, Van Engen D, Clardy J, Gopichand Y, Schmitz FJ: 1981
Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *J Am Chem Soc*; 103: 2469-2471
- Takagi Toru, Hayashi Kenji, Itabashi Yutaka: 1984
Toxic effect of free unsaturated fatty acids in the mouse assay of diarrhetic shellfish toxin by intraperitoneal injection. *Nippon Suisan Gakk*; 50: 1413-1418
- Takahashi H, Kusumi T, Kan Y, Satake M, Yasumoto T: 1996
Determination of the absolute configuration of yessotoxin, a polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning, by NMR spectroscopic method using a chiral anisotropic reagent, methoxy-(2-naphthyl)acetic acid. *Tetrahedron Lett*; 37: 7087-7090
- Takai A: 1988
Okadaic acid. Protein phosphatase inhibition and muscle contractile effects. *J Muscle Res Cell Motil*; 9: 563-565

- Takai A, Bialojan C, Troschka M, Rueegg JC: 1987
Smooth muscle myosin phosphatase inhibition and force enhancement by black sponge toxin. *FEBS Lett*; 217: 81-84
- Terao K, Ito E, Oarada M, Murata M, Yasumoto T: 1990
Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning - 5. The effects in mice of yessotoxin isolated from *patinopecten yessoensis* and of a desulfated derivative. *Toxicon*; 28: 1095-1104
- Terao K, Ito E, Yanagi T, Yasumoto T: 1986
Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. I. Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin 1 and pectenotoxin 1. *Toxicon* 24: 1141-1151
- Torgersen, T, 2002
persönliche Mitteilung am 29.11.2002
- Tubaro A, Florio C, Luxich E, Sosa S, Dellaloggia R, Yasumoto T: 1996a
A protein phosphatase 2A inhibition assay for a fast and sensitive assessment of okadaic acid contamination in mussels. *Toxicon*; 34: 743-752
- Tubaro A, Florio C, Luxich E, Vertua R, Dellaloggia R, Yasumoto T: 1996b
Suitability of the MTT-based cytotoxicity assay to detect okadaic acid contamination of mussels. *Toxicon*; 34: 965-974
- Tubaro A, Sidari L, Della Loggia R, Yasumoto T: 1998
Occurrence of yessotoxin-like toxins in phytoplankton and mussels from northern Adriatic Sea; in: Reguera B, Blanco J, Fernandez ML, Wyatt T (eds): Harmful Algae. Xunta de Galicia and IOC/UNESCO, Vigo; 470-472
- Uda, T, Itoh Y, Nishimura M, Usagawa T, Murata M, Yasumoto T: 1989
Enzyme immunoassay using monoclonal antibody specific for diarrhetic shellfish poisons. in: Natori S, Hashimoto K, Ueno Y (eds): Mycotoxins and Phycotoxins '88 [Proceedings of Seventh International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins]; Elsevier, Amsterdam; 335-342
- Usagawa T, Nishimura M, Itoh Y, Uda T, Yasumoto T: 1989
Preparation of monoclonal antibodies against okadaic acid prepared from the sponge *Halichondria okadai*. *Toxicon*; 27: 1323-1330
- Vale P, Sampayo MA de M: 1999
Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon*; 37: 1109-1121
- Vale, P, Sampayo MA de M: 2002
Esterification of DSP toxins by Portuguese bivalves from the Northwest coast determined by LC-MS - a widespread phenomenon. *Toxicon*; 40: 33-42

- Vernoux JP, Marcaillou-LeBaut C, Masselin P, Marais C, Baron B, Choumiloff, R, Proniewski F, Nizard G, Bohec M: 1993
The use of *Daphnia magna* for detection of okadaic acid in mussel extracts. *Food Addit Contam*; 10: 603-608
- Virchow, R: 1895
Über die Vergiftung durch Miesmuscheln in Wilhelmshaven. *Berliner Klinische Wochenschrift*; 48: 1
- Vieytes MR, Fontal OI, Leira F, Baptista de Sousa JMV, Botana LM: 1997
A fluorescent microplate assay for diarrhetic shellfish toxins. *Anal Biochem*; 248: 258-264
- Vollandt, K: 2003
persönliche Mitteilung am 27.08.2003
- Wellek S: 1994
Statistische Methoden zum Nachweis von Äquivalenz. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Wolf JH, Korf J: 1992
4-bromomethyl-7-methoxycoumarin and analogues as derivatization agents for high-performance liquid chromatography determinations: a review. *J Pharm Biomed Anal*; 10: 99-107
- Wright JLC, Cembella AD: 1998
Ecophysiology and biosynthesis of polyether marine biotoxins; in: Anderson DM, Cembella AD, Hallegraeff GM: *Physiological Ecology of harmful algal blooms*. Springer, Berlin/ Heidelberg; 427-451
- Yamada J, Sakuma M, Suga T: 1991
Assay of fatty acid ω -hydroxylation using high-performance liquid chromatography with fluorescence labeling reagent, 3-bromomethyl-7-methoxy-1,4-benzoxazin-2-one (BrMB). *Anal Biochem*; 199: 132-136
- Yanagi T, Murata M, Torigoe K, Yasumoto T: 1989
Biological activities of semisynthetic analogs of dinophysistoxin-3, the major diarrhetic shellfish toxin. *Agric Biol Chem*; 53 (2): 525-529
- Yasaka Y, Tanaka M: 1994
Labeling of free carboxyl groups. *J Chromatogr B*; 659: 139-155
- Yasumoto T: 2000
Historic considerations regarding seafood safety; in: Botana LM (ed): *Seafood and freshwater toxins*. Marcel Dekker, New York; 1-17
- Yasumoto T, Murata M, Lee JS, Torigoe K: 1989
Polyether toxins produced by dinoflagellates; in: Natori S, Hashimoto K, Ueno Y (eds): *Mycotoxins and Phycotoxins '88 [Proceedings of Seventh International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins]*. Elsevier; Tokyo; 375-382

- Yasumoto T, Murata M, Oshima Y, Sano M, Matsumoto GK, Clardy J: 1984
Diarrhetic shellfish poisoning; in: Ragelis EP (ed): *Seafood Toxins*. American Chemical Society; Washington, DC; 207-214
- Yasumoto T, Murata M, Oshima Y, Sano M, Matsumoto GK, Clardy J: 1985
Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron*; 41: 1019-1025
- Yasumoto T, Oshima Y, Sugawara W, Fukuyo Y, Oguri H, Igarashi T, Fujita N: 1980
Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Bull Jpn Soc Sci fish*; 46: 1405-1411
- Yasumoto T, Oshima Y, Yamaguchi M: 1978
Occurrence of a new type of toxic shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull Jpn Soc Sci fish*; 44: 1249-1255
- Yasumoto T, Satake M: 1998
New toxins and their toxicological evaluations; in: Reguera B, Blanco J, Fernandez ML, Wyatt T (eds): *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC/UNESCO, Vigo; 461-464
- Yasumoto T, Seino N, Murakami Y, Murata M: 1987
Toxins produced by benthic dinoflagellates. *Biol Bull Woods Hole*; 172: 128-131
- Yasumoto T, Takizawa A: 1997
Fluorometric measurement of yessotoxins in shellfish by high-pressure liquid chromatography. *Biosci Biotech Biochem*; 61: 1775-1777
- Yoshida T, Uetake A, Yamaguchi H, Nimura N, Kinoshita, T: 1988
New preparation method for 9-anthryldiazomethane (ADAM) as a fluorescent labeling reagent for fatty acids and derivatives. *Anal Biochem*; 173: 70-74

8. Anhang

8.1. Geräte und Materialien

LC/MS-Kopplung	Series 200 Pump und Series 200 Autosampler (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA), gekoppelt mit API 165 Massenspektrometer mit Turbo Ionspray™ Interface (API Einlasssystem mit pneumatisch unterstütztem Elektrospray) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
HPLC-Systeme	Gilson Abimed pump 305 mit Gilson Abimed 234 sampling injector (Gilson, Langenfeld, Deutschland) Merck-Hitachi L6200A Intelligent Pump, Merck-Hitachi AS4000 Intelligent Autosampler, Säulenofen L 5025 Column Thermostat, Merck-Hitachi D-6000 Interface mit Steuerungssoftware Model D-6000 HPLC Manager Version 2 (Merck-Hitachi Ltd. Tokio, Japan)
Fluoreszenzdetektor	Techlab RF 551 Spectrofluorometric Detector (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Fraktionssammler	Gilson Abimed fraction collector 202 mit Steuereinheit Abimed fraction collector 201-202 (Gilson, Langenfeld, Deutschland)
HPLC-Säulen	Hypersil 3 µ C8 BDS 50 x 2,00 mm, 3 micron mit Vorsäule Security Guard Cartridge (Phenomenex, Torrance, California, USA) Jupiter 5 µ micron C4, 300 Å 4,6 x 50 mm mit Vorsäule Security Guard Cartridge (Phenomenex, Torrance, California, USA) Luna 3µ C18(2); 150 x 4,6 mm mit 30 x 4,6 mm-Vorsäule (Phenomenex, Torrance, California, USA)
GPC-Säulen	Styrol-Divinyl-Copolymer-Säule: Phenogel 100Å, 300 x 7,8 mm, 4µ (Phenomenex, Torrance, California, USA) Agarose-Dextran-Säule: Tricorn Superdex Peptide HR 10/30 (Säulendimensionen: 300 x 10 mm; Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden), ausgestattet mit einem Vorfilter mit 0,5 µm Porenweite (Column Inlet filter, model 7335, Rheodyne, Rohnert Park, CA, USA)
Vakuumzentrifuge	Speedvac SPD 121 Premium, mit RVT 4104 Refrigerated Vapor Trap und VLP 120 Valu Pumpe (Thermo Savant, Holbrook, NY, USA)
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 106 (Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland)

Vortex-Mixer	IKA- Works MS1 (IKA Works Inc., Wilmington, NC, USA)
Feinwaage	Scaltec SBC 31 (Scaltec Instruments, Heiligenstadt, Deutschland)
Zentrifuge	Labofuge A (Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland)
Rotationsverdampfer	Pumpe 2C mit Druckkontrolleinheit CVC2 (Vacuubrand, Wertheim, Deutschland) sowie Wasserbad B-480 und Rotavapor R-114 (Büchi, Flawil, Schweiz)
pH-Messgerät	WTW Multical pH-Meter pH526 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland)

8.2. Standards und Referenzmaterialien

Desoxycholsäure	Deoxycholic acid (Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden (Ts), Deutschland)
DTX-1	35-Methylokadaic Acid, free acid (Alexis Corp., San Diego, CA, USA)
OA	Okadaic Acid, high purity (Alexis Corp., San Diego, CA, USA)
7-O-palmitoyl-OA	7-O-palmitoylokadaic acid (ICN Biomedicals Inc. Aurora, Ohio, USA)
Monensin	Monensin, Sodium Salt (Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz)
MUS-2	Mussel Tissue Reference Material for DSP-Toxins (Institute for Marine Biosciences, National Research Council of Canada, Halifax, Nova Scotia, Canada)
OACS-1	Okadaic Acid Certified Calibration Solution (Institute for Marine Biosciences, National Research Council of Canada, Halifax, Nova Scotia, Canada)

8.3. Chemikalien / Verbrauchsmaterial

a) Chemikalien:

Aceton	HPLC-grade (J.T.Baker, Deventer, Niederlande)
Acetonitril	HPLC-grade (J.T.Baker, Deventer, Niederlande)
Ammoniumacetat	Acetic acid ammonium salt (Acros Organics, Geel, Belgien)
BrMB	3-Bromomethyl-7-methoxy-1,4-benzoxazin-2-one (Fluka Biochemica, Buchs, Schweiz)
Chloroform	HPLC-grade, stabilisiert mit 5 - 10 ppm Amylen (J.T.Baker, Deventer, Niederlande)
Dichlormethan	HPLC-grade (J.T.Baker, Deventer, Niederlande)
Essigsäure	Eisessig 100 % p.a. (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Kaliumcarbonat	Potassium Carbonate anhydrous (Fluka BioChemica, Buchs, Schweiz)
Methanol	Rotisolv [®] HPLC (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
Natriumazid	Sodium azide > 99,5 % (Fluka BioChemica, Buchs, Schweiz)
Natriumhydroxid	Sodium hydroxide p.a. (Fluka BioChemica, Buchs, Schweiz)
Natriumsulfat	Natriumsulfat, p.a. (Merck, Darmstadt, Deutschland)
N,N - Diisopropyl-ethylamin	p.a. (Sigma, St. Louis, MO, USA)
Salzsäure	p.a., 37 %ig, rauchend (Merck, Darmstadt, Deutschland)
TBME	tertiär- Butyl-Methyl-ether (Fluka Chemica, Buchs, Schweiz)
Triethylamin	p.a. (Sigma, St. Louis, MO, USA)
Wasser	HPLC-Qualität, gereinigt mit Millipore-Q RG Ultra Pure Water System (Millipore, Milford, USA)

b) Verbrauchsmaterial:

Spritzenaufsatzfilter (0,2 µm Porenweite)	Rotilabo Spritzenfilter Nylon, 0,2 µm, (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Papierfilter	S & S Faltenfilter, Durchmesser 70 mm (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland)

8.4. Chromatographische Bedingungen

- a) LC/MS- Methode zum Nachweis von OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin (underivatisiert) mit einer C8-Säule

Säule: Phenomenex Hypersil 3 μ C8 BDS 50 x 2,00 mm 3 micron
 Flussrate: 0,25 ml min⁻¹

Gradient:	Zeit	Methanol	0,1 M Essigsäure
	[min]	[%]	[%]
	0	50	50
	3	80	20
	16	90	10
	20	100	0
	29	100	0
	30	50	50
	45	50	50

Detektion: Negative Ionisierung, MID-Modus

m/z	Ion	M entspricht	Summenformel
669,7	[M - H] ⁻	Monensin	C ₃₆ H ₆₂ O ₁₁
803,4	[M - H] ⁻	OA	C ₄₄ H ₆₈ O ₁₃
817,4	[M - H] ⁻	DTX-1	C ₄₅ H ₇₀ O ₁₃
1042,1	[M - H] ⁻	7-O-palmitoyl-OA	C ₆₀ H ₉₈ O ₁₄

- b) LC/MS- Methode zum Nachweis von OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin (underivatisiert) mit einer C4-Säule

Säule: Phenomenex Jupiter 5 μ micron C4, 300Å 4,6 x 50 mm mit Vorsäule (Security Guard Cartridge)
 Flussrate: 0,8 ml min⁻¹

Gradient:	Zeit	Methanol	0,1 M Essigsäure
	[min]	[%]	[%]
	0	50	50
	1	50	50
	4	80	20
	12	90	10
	13	100	0
	19	100	0
	20	50	50
	28	50	50

Detektion: Negative Ionisierung, MID-Modus, siehe unter a).

c) HPLC/FLD-Methode zum Nachweis von OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin als BrMB-Derivate

Säule: Phenomenex Luna 3 μ C18 (2), 150 x 4,6 mm mit Vorsäule
30 x 4,6mm
Ofentemperatur: 35°C
Flussrate: 1,2 ml/min

Gradient:	Zeit [min]	Acetonitril [%]	Methanol [%]	0,01 M Essigsäure [%]
	0	53	16	31
	9	53	16	31
	20	60	16	24
	28	60	16	24
	50	90	0	10
	70	100	0	0
	85	100	0	0
	86	53	16	31
	95	53	16	31

Detektion: Fluoreszenzdetektion bei $\lambda_{Ex} = 345 \text{ nm}$ / $\lambda_{Em} = 440 \text{ nm}$

d) LC/MS-Methode zum Nachweis von OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin als BrMB-Derivate

Säule: siehe unter c)
Ofentemperatur: siehe unter c)
Flussrate: siehe unter c)

Gradient: siehe unter c)

Detektion: Positive Ionisierung, MID-Modus

m/z	Ion	M entspricht	Summenformel
824,7	$[M - 2 H_2O + H]^+$	Monensin- BrMB-Ester	$C_{46}H_{69}NO_{14}$
882,7	$[M + Na]^+$		
958,8	$[M - 2 H_2O + H]^+$	OA-BrMB-Ester	$C_{54}H_{75}NO_{16}$
976,8	$[M - H_2O + H]^+$		
994,8	$[M + H]^+$		
972,8	$[M - 2 H_2O + H]^+$	DTX-1-BrMB- Ester	$C_{55}H_{77}NO_{16}$
990,8	$[M - H_2O + H]^+$		
1008,8	$[M + H]^+$		
1197,5	$[M - 2 H_2O + H]^+$	7-O-palmitoyl- OA-BrMB-Ester	$C_{70}H_{105}NO_{17}$
1215,5	$[M - H_2O + H]^+$		
1233,5	$[M + H]^+$		

e) LC/MS- Methode zum Nachweis von OA, DTX-1 und YTX (underivatisiert) mit einer C4-Säule

Säule: Phenomenex Jupiter 5 μ micron C4, 300Å 4,6 x 50 mm mit Vorsäule (Security Guard Cartridge)

Flussrate: 0,8 ml min⁻¹

Gradient:	Zeit	Methanol	10 mM NH ₄ ⁺ CH ₃ COO ⁻
	[min]	[%]	[%]
	0	30	70
	7	70	30
	17	80	20
	18	100	0
	23	100	0
	24	30	70
	30	30	70

Detektion: Negative Ionisierung, MID-Modus

m/z	Ion	M entspricht	Summenformel
803,4	[M - H] ⁻	OA	C ₄₄ H ₆₈ O ₁₃
817,4	[M - H] ⁻	DTX-1	C ₄₅ H ₇₀ O ₁₃
1141,9	[M + H - 2 Na] ⁻	YTX	C ₅₅ H ₈₀ O ₂₁ S ₂ Na ₂
1163,9	[M - Na] ⁻	YTX	C ₅₅ H ₈₀ O ₂₁ S ₂ Na ₂

8.5. Datentabellen

Tab. 8.1: OA-Wiederfindung in der Hauptfraktion nach Aufreinigung von mit 40 ng OA dotierter Muschelmatrix mittels GPC

OA (LC/MS)				
Ger.-Gl.	$y = 1317400 x + 121090$			
Korrel.-K.	$r^2 = 0,9777$			
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [ng]	WF [%]
	1086086	0,74	21,5	53,8
	985963	0,66	19,3	48,3
	1039845	0,70	20,5	51,3
	862128	0,56	16,5	41,3
	965412	0,64	18,8	47,1
Mittelwert			19,3	48,4
SD			1,9	4,8
VK [%]			9,8	9,8

WF = Wiederfindung

Tab. 8.2: OA-Wiederfindung in der Hauptfraktion nach GPC bei Aufgabe von 400 ng OA ohne Muschelmatrix

OA (LC/MS)									
	1. Durchführung Hauptfraktion			2. Durchführung Hauptfraktion			3. Durchführung Hauptfraktion		
Ger.-Gl.	$y = 659660 x$			$y = 659660 x$			$y = 659660 x$		
Korrel.-K.	$r^2=0,9962$			$r^2=0,9962$			$r^2=0,9962$		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	9401000	14,3	104,7	8910000	13,5	99,3	8998000	13,6	100,3
	8923000	13,5	99,4	8558000	13,0	95,3	8354000	12,7	93,1
	8144000	12,4	90,8	9189000	13,9	102,4	8528000	12,9	95,0
Mittelwert		13,4	98,3		13,5	99,0		13,1	96,1
SD		1,0	7,1		0,5	3,5		0,5	3,7
VK [%]		7,2	7,2		3,6	3,6		3,9	3,9

WF über Mittelwerte aller 3 Durchführungen [%]

Mittelwert **97,8**SD **1,5**

VK [%] 1,5

Tab. 8.3: OA-Wiederfindung nach GPC bei Aufgabe von 400 ng OA mit Muschelmatrix

OA (LC/MS), 1. Durchführung

Fraktion	Vorfr.	Hauptfr. 1	Hauptfr. 2	Nachfr.	Ger.-Gl.:
Peakflächen	576400	3102000	12540000	105000	y = 659660 x
	492300	3079000	12650000	97360	
	538500	3059000	12440000	91260	
[ng] o.c.	0,87	4,70	19,01	0,16	Korrel-K.: r ² =0,9962
	0,75	4,67	19,17	0,15	
	0,82	4,64	18,85	0,14	
Mittelwert	0,81	4,67	19,01	0,15	
SD	0,06	0,03	0,16	0,01	
VK [%]	7,86	0,69	0,84	7,06	
WF [%]	3,2	17,3	69,9	0,6	Summe über alle Mittelw.
	2,7	17,2	70,4	0,5	
	3,0	17,0	69,3	0,5	
Mittelwert	3,0	17,2	69,9	0,5	90,6
SD	0,2	0,1	0,6	0,1	
VK [%]	7,9	0,7	0,8	7,1	

OA (LC/MS), 2. Durchführung

Fraktion	Vorfr.	Hauptfr. 1	Hauptfr. 2	Nachfr.	Ger.-Gl.:
Peakflächen	511900	3034000	12300000	81230	y = 659660 x
	536900	2950000	12170000	67390	
	556600	3097000	12850000	84020	
[ng] o.c.	0,78	4,60	18,64	0,12	Korrel-K.: r ² =0,9962
	0,81	4,47	18,44	0,10	
	0,84	4,69	19,48	0,13	
Mittelwert	0,81	4,59	18,85	0,12	
SD	0,03	0,11	0,55	0,02	
VK [%]	4,19	2,42	2,92	13,07	
WF [%]	2,9	16,9	68,5	0,45	Summe über alle Mittelw.
	3,0	16,4	67,8	0,36	
	3,1	17,3	71,6	0,47	
Mittelwert	3,0	16,9	69,3	0,4	89,6
SD	0,1	0,4	2,0	0,06	
VK [%]	4,2	2,4	2,9	13,1	

Fortsetzung:

Tab. 8.3: OA-Wiederfindung nach GPC bei Aufgabe von 400 ng OA mit Muschelmatrix

OA (LC/MS), 3. Durchführung

Fraktion	Vorfr.	Hauptfr. 1	Hauptfr. 2	Nachfr.	Ger.-Gl.:
Peakflächen	465400	2883000	11600000	81070	y = 659660 x
	474800	2792000	12140000	86820	
	434700	2775000	11810000	93520	
[ng] o.c.	0,71	4,37	17,58	0,12	Korrel-K.: r ² =0,9962
	0,72	4,23	18,40	0,13	
	0,66	4,21	17,90	0,14	
Mittelwert	0,6947	4,270	17,96	0,13	
SD	0,0318	0,088	0,41	0,01	
VK [%]	4,5784	2,069	2,30	7,16	
WF [%]	2,6	16,1	64,6	0,45	Summe über alle Mittelw.
	2,6	15,6	67,6	0,48	
	2,4	15,5	65,8	0,52	
Mittelwert	2,6	15,7	66,0	0,5	84,8
SD	0,1	0,3	1,5	0,03	
VK [%]	4,6	2,1	2,3	7,2	

WF über alle 3 Durchführungen (Summen der Mittelwerte) [%]

Mittelwert **88,3** SD **3,1** VK [%] **3,5**

Tab. 8.4: OA-Wiederfindung nach GPC bei Aufgabe von 20 ng OA ohne bzw. mit Muschelmatrix

OA ohne Muschelmatrix (LC/MS)

	1. Durchführung			2. Durchführung			3. Durchführung		
	Vor- u. Hauptfrakt. 1+2			Vor- u. Hauptfrakt. 1+2			Vor- u. Hauptfrakt. 1+2		
Ger.-Gl.	y = 828130 x			y = 828130 x			y = 828130 x		
Korrel.-K.	r ² = 0,9972			r ² = 0,9972			r ² = 0,9972		
	Peakfl.	[ng]	WF	Peakfl.	[ng]	WF	Peakfl.	[ng]	WF
		o.c.	[%]		o.c.	[%]		o.c.	[%]
	396400	0,48	105,6	367400	0,44	97,8	348600	0,42	92,8
	370700	0,45	98,7	348000	0,42	92,7	326600	0,39	87,0
	376000	0,45	100,1	337600	0,41	89,9	369200	0,45	98,3
Mittelwert		0,46	101,5		0,42	93,5		0,42	92,7
SD		0,02	3,6		0,02	4,0		0,03	5,7
VK [%]		3,57	3,6		4,31	4,3		6,13	6,1

WF über Mittelwerte aller 3 Durchführungen [%]

Mittelwert **95,9**SD **4,9**

VK [%] 5,1

OA mit Muschelmatrix (LC/MS)

	1. Durchführung			2. Durchführung			3. Durchführung		
	Vor- u. Hauptfrakt. 1+2			Vor- u. Hauptfrakt. 1+2			Vor- u. Hauptfrakt. 1+2		
Ger.-Gl.	y = 828130 x			y = 828130 x			y = 828130 x		
Korrel.-K.	r ² = 0,9972			r ² = 0,9972			r ² = 0,9972		
	Peakfl.	[ng]	WF	Peakfl.	[ng]	WF	Peakfl.	[ng]	WF
		o.c.	[%]		o.c.	[%]		o.c.	[%]
	362600	0,44	90,0	339400	0,41	84,2	398100	0,48	98,8
	340800	0,41	84,6	336400	0,41	83,5	352400	0,43	87,4
	355100	0,43	88,1	395800	0,48	98,2	330100	0,40	81,9
Mittelwert		0,43	87,5		0,43	88,6		0,43	89,4
SD		0,01	2,7		0,04	8,3		0,04	8,6
VK [%]		3,14	3,1		9,38	9,4		9,62	9,6

WF über Mittelwerte aller 3 Durchführungen [%]

Mittelwert **88,5**SD **0,9**

VK [%] 1,0

Tab. 8.5: Wiederfindung beim Einengen OA-haltiger Lösungen mit Zugabe von GPC-Eluent

OA mit GPC-Eluent (LC/MS)

	1. Durchführung			2. Durchführung			3. Durchführung		
Ger.-Gl.	$y = 818270 x + 39964$			$y = 818270 x + 39964$			$y = 818270 x + 39964$		
Korrel.-K.	$r^2 = 0,9929$			$r^2 = 0,9929$			$r^2 = 0,9929$		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	926600	1,08	108,4	987600	1,16	115,8	1041000	1,22	122,3
	944200	1,11	110,5	979100	1,15	114,8	1023000	1,20	120,1
	966300	1,13	113,2	991600	1,16	116,3	1019000	1,20	119,7
	968700	1,14	113,5	1014000	1,19	119,0	980000	1,15	114,9
	975800	1,14	114,4	993600	1,17	116,5	1003000	1,18	117,7
	928300	1,09	108,6	957100	1,12	112,1	1015000	1,19	119,1
	946000	1,11	110,7	1004000	1,18	117,8	1000000	1,17	117,4
Mittelwert		1,11	111,3		1,16	116,0		1,19	118,7
SD		0,02	2,4		0,02	2,2		0,02	2,4
VK [%]		2,16	2,2		1,90	1,9		1,98	2,0

Fortsetzung: OA mit GPC-Eluent (LC/MS)

	4. Durchführung			5. Durchführung			
Ger.-Gl.	$y = 818270 x + 39964$			$y = 818270 x + 39964$			
Korrel.-K.	$r^2 = 0,9929$			$r^2 = 0,9929$			
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	WF [%]
	953800	1,12	111,7	1009000	1,19	118,5	über
	986400	1,16	115,7	1043000	1,23	122,5	Mittel
	964900	1,13	113,0	951500	1,11	111,4	werte
	1001000	1,17	117,4	1001000	1,17	117,4	aller
	953900	1,12	111,7	974800	1,14	114,2	Durch-
	921900	1,08	107,8	995100	1,17	116,7	föh-
	922600	1,08	107,9	854000	1,12	112,0	rungen
Mittelwert		1,12	112,2		1,16	116,1	114,9
SD		0,04	3,6		0,04	3,9	3,1
VK [%]		3,22	3,2		3,36	3,4	2,7

Tab. 8.6: Wiederfindung beim Einengen OA-haltiger Lösungen ohne Zugabe von GPC-Eluent

OA ohne GPC-Eluent (LC/MS)

	1. Durchführung			2. Durchführung			3. Durchführung		
Ger.-Gl.	y = 818270 x + 39964			y = 818270 x + 39964			y = 818270 x + 39964		
Korrel.-K.	r ² = 0,9929			r ² = 0,9929			r ² = 0,9929		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	998700	1,17	117,2	961200	1,13	112,6	982600	1,15	115,2
	1004000	1,18	117,8	984700	1,16	115,5	1002000	1,18	117,6
	1015000	1,19	119,1	967800	1,13	113,4	1006000	1,18	118,0
	995300	1,17	116,7	968500	1,14	113,5	950100	1,11	111,2
	1046000	1,23	122,9	917200	1,07	107,2	919100	1,07	107,4
	1012000	1,19	118,8	956800	1,12	112	983400	1,15	115,3
	934600	1,09	109,3	942000	1,10	110,2	1011000	1,19	118,6
Mittelwert		1,17	117,4		1,12	112,1		1,15	114,8
SD		0,04	4,1		0,03	2,7		0,04	4,1
VK [%]		3,50	3,5		2,39	2,4		3,57	3,6

Fortsetzung: OA ohne GPC-Eluent (LC/MS)

	4. Durchführung			5. Durchführung			
Ger.-Gl.	y = 818270 x + 39964			y = 818270 x + 39964			
Korrel.-K.	r ² = 0,9929			r ² = 0,9929			
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	WF [%]
	944600	1,11	110,6	965500	1,13	113,1	über
	1021000	1,20	119,9	963000	1,13	112,8	Mittel
	1015000	1,19	119,1	990000	1,16	116,1	werte
	984200	1,15	115,4	907500	1,06	106,0	aller
	970300	1,14	113,7	931800	1,09	109,0	Durch-
	916900	1,07	107,2	903800	1,06	105,6	föh-
	944400	1,11	110,5	882300	1,03	102,9	run-
Mittelwert		1,14	113,8		1,09	109,4	113,5
SD		0,05	4,7		0,05	4,8	3,0
VK [%]		4,13	4,1		4,39	4,4	2,6

Tab. 8.7: OA-Wiederfindung nach Einengen (Vergleichsbestimmung für Experimente mit Aufnahme in Aceton)

OA (Vergleichsbestimmung) (LC/MS)

	1. Durchführung			2. Durchführung			3. Durchführung		
Ger.-Gl.	y = 1002200 x + 24856			y = 1002200 x + 24856			y = 1002200 x + 24856		
Korrel.-K.	r ² = 0,9953			r ² = 0,9953			r ² = 0,9953		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	924300	0,90	89,8	991300	0,96	96,4	989800	0,96	96,3
	913800	0,89	88,7	914000	0,89	88,7	970200	0,94	94,3
	971300	0,94	94,4	1024000	1,00	99,7	1018000	0,99	99,1
Mittelwert		0,91	91,0		0,95	94,9		0,97	96,6
SD		0,03	3,1		0,06	5,6		0,02	2,4
VK [%]		3,35	3,4		5,94	5,9		2,49	2,5

WF über Mittelwerte aller 3 Durchführungen [%]:

Mittelwert **94,2**SD **2,9**

VK [%] 3,1

Tab. 8.8: OA-Wiederfindung nach Einengen und Wiederaufnahme in Aceton

OA (LC/MS)

	1. Durchführung				2. Durchführung			
Ger.-Gl.	y = 1002200x + 24856				y = 1002200x + 24856			
Korrel.-K.	r ² = 0,9953				r ² = 0,9953			
	Peakfl. [ng] o.c.		WF [%] theor.) ¹	Vergl.-best.) ²	Peakfl. [ng] o.c.		WF [%] theor.) ¹	Vergl.-best.) ²
	824400	0,80	79,8	84,7	858600	0,83	83,2	88,4
	852000	0,83	82,5	87,6	859000	0,83	83,2	88,4
	891400	0,86	86,5	91,8	898400	0,87	87,2	92,6
Mittelwert		0,83	82,9	88,1		0,85	84,5	89,8
SD		0,03	3,4	3,6		0,02	2,3	2,4
VK [%]		4,05	4,0	4,0		2,70	2,7	2,7

Fortsetzung: OA (LC/MS)

	3. Durchführung				4. Durchführung			
Ger.-Gl.	y = 1002200x + 24856				y = 1002200x + 24856			
Korrel.-K.	r ² = 0,9953				r ² = 0,9953			
	Peakfl. [ng] o.c.		WF [%] theor.) ¹	Vergl.-best.) ²	Peakfl. [ng] o.c.		WF [%] theor.) ¹	Vergl.-best.) ²
	877900	0,85	85,1	90,4	844100	0,82	81,7	86,8
	899400	0,87	87,3	92,7	941600	0,91	91,5	97,1
	945100	0,92	91,8	97,5	876000	0,85	84,9	90,2
Mittelwert		0,88	88,1	93,5		0,86	86,0	91,4
SD		0,03	3,4	3,6		0,05	5,0	5,3
VK [%]		3,89	3,9	3,9		5,76	5,8	5,7

Fortsetzung: OA (LC/MS)

	5. Durchführung							
Ger.-Gl.	y = 1002200x + 24856							
Korrel.-K.	r ² = 0,9953							
	Peakfl. [ng] o.c.		WF [%] theor.) ¹	Vergl.-best.) ²	Peakfl. [ng] o.c.		WF [%] theor.) ¹	Vergl.-best.) ²
	850100	0,82	82,3	87,4			über Mittelwerte	
	846800	0,82	82,0	87,1			aller	
	836800	0,81	81,0	86,0			Durchführungen	
Mittelwert		0,82	81,8	86,9			84,7	89,9
SD		0,01	0,7	0,7			2,5	2,6
VK [%]		0,85	0,8	0,8			2,9	2,9

)¹ Wiederfindung wie üblich berechnet als Quotient aus gefundener und eingesetzter Menge

)² Wiederfindung in Bezug auf die Vergleichsbestimmung berechnet, d.h. die Wiederfindungsrate im Vergleichsexperiment (94,2 %) wird hier gleich 100 % gesetzt.

Tab. 8.9: Wiederfindung für OA nach Extraktion aus dotiertem Muschelhepatopankreas

OA (LC/MS)

Ger.-Gl. $y = 73279 x$ Korrel. K. $r^2 = 0,9893$

Durchführung A

Fraktion	Peakfl.	[ng] o.c.	Inj. Vol. [μ L]	Extr. Vol. [μ L]	WF [%]		Σ Mittelw. d. WF [%]
1.-3. mL	35760	0,49	20	3000	91,5	Mittelw.	96,9
	40648	0,55	20	3000	104,0	SD	6,4
	37189	0,51	20	3000	95,2	VK [%]	6,6
4. mL	n.n.		20	1000			96,9
	n.n.		20	1000			
	n.n.		20	1000			

Durchführung B

Fraktion	Peakfl.	[ng] o.c.	Inj. Vol. [μ L]	Extr. Vol. [μ L]	WF [%]		Σ Mittelw. d. WF [%]	
1.-3. mL	33474	0,46	20	3000	85,7	Mittelw.	91,1	
	37665	0,51	20	3000	96,4	SD	5,4	
	35680	0,49	20	3000	91,3	VK [%]	5,9	
4. mL	9087	0,12	20	1000	7,8	Mittelw.	99,1	
	9651	0,13	20	1000	8,2	SD		0,3
	n.n.		20	1000		VK [%]		4,3
5. mL	n.n.						99,1	
	n.n.							
	n.n.							

Tab. 8.10: Wiederfindung für DTX-1 nach Extraktion aus dotiertem Muschelhepatopankreas

DTX-1 (LC/MS)

Ger.-Gl. $y = 88532 x$ Korrel. K. $r^2 = 0,9880$

Durchführung A

Fraktion	Peakfl.	[ng] o.c.	Inj. Vol. [μ L]	Extr. Vol. [μ L]	WF [%]		Σ Mittelw. d. WF [%]
1.-3. mL	41433	0,47	20	3000	87,8	Mittelw.	92,2
	40796	0,46	20	3000	86,4	SD	8,9
	48392	0,55	20	3000	102,5	VK [%]	9,7
4. mL	11314	0,13	20	1000	8,0	Mittelw.	6,7
	8826	0,10	20	1000	6,2	SD	1,1
	8388	0,09	20	1000	5,9	VK [%]	16,6
5. mL	n.n.		20	1000			98,9
	n.n.		20	1000			
	n.n.		20	1000			

Durchführung B

Fraktion	Peakfl.	[ng] o.c.	Inj. Vol. [μ L]	Extr. Vol. [μ L]	WF [%]		Σ Mittelw. d. WF [%]
1.-3. mL	45089	0,51	20	3000	95,5	Mittelw.	94,1
	45027	0,51	20	3000	95,4	SD	2,3
	43204	0,49	20	3000	91,5	VK [%]	2,4
4. mL	9331	0,11	20	1000	6,6	Mittelw.	7,5
	11943	0,13	20	1000	8,4	SD	1,3
	n.n.		20	1000		VK [%]	17,4
5. mL	n.n.		20	1000			101,6
	n.n.		20	1000			
	n.n.		20	1000			

Tab. 8.11: Wiederfindung für 7-O-palmitoyl-OA nach Extraktion aus dotiertem Muschelhepatopankreas

7-O-palmitoyl-OA (LC/MS)

Ger.-Gl. $y = 176460 x$ Korrel. K. $r^2 = 0,9960$

Durchführung A

Fraktion	Peakfl.	[ng] o.c.	Inj. Vol. [μ L]	Extr. Vol. [μ L]	WF [%]		Σ Mittelw. d. WF [%]
1.-3. mL	n.n.		20	3000	Mittelw.		
	n.n.		20	3000	SD		
	n.n.		20	3000	VK [%]		
4. mL	70196	0,40	20	1000	24,9	Mittelw.	31,3
	100865	0,57	20	1000	35,7	SD	5,7
	93806	0,53	20	1000	33,2	VK [%]	18,2
5. mL	64020	0,36	20	1000	22,7	Mittelw.	27,1
	74978	0,42	20	1000	26,6	SD	4,7
	90612	0,51	20	1000	32,1	VK [%]	17,5
6. mL	32310	0,18	50	1000	4,6	Mittelw.	5,4
	43056	0,24	50	1000	6,1	SD	0,8
	39862	0,23	50	1000	5,6	VK [%]	14,4

Durchführung B

Fraktion	Peakfl.	[ng] o.c.	Inj. Vol. [μ L]	Extr. Vol. [μ L]	WF [%]		Σ Mittelw. d. WF [%]
1.-3. mL	n.n.		20	3000	Mittelw.		
	n.n.		20	3000	SD		
	n.n.		20	3000	VK [%]		
4. mL	86712	0,49	20	1000	30,7	Mittelw.	30,0
	92659	0,53	20	1000	32,8	SD	3,3
	74501	0,42	20	1000	26,4	VK [%]	10,9
5. mL	89818	0,51	20	1000	31,8	Mittelw.	25,0
	100459	0,57	20	1000	35,6	SD	15,3
	21105	0,12	20	1000	7,5	VK [%]	61,1
6. mL	168731	0,96	50	1000	23,9	Mittelw.	27,7
	193224	1,10	50	1000	27,4	SD	4,0
	225339	1,28	50	1000	31,9	VK [%]	14,5

Tab. 8.12: Wiederfindung für Monensin nach Extraktion aus dotiertem Muschelhepatopankreas

Monensin (LC/MS)

Ger.-Gl. $y = 148450 x$ Korrel. K. $r^2 = 0,9901$

Durchführung A

Fraktion	Peakfl.	[ng] o.c.	Inj. Vol. [μ L]	Extr. Vol. [μ L]	WF [%]		Σ Mittelw. d. WF [%]
1.-3. mL	57643	0,39	20	3000	72,8	Mittelw.	70,3
	56916	0,38	20	3000	71,9	SD	3,6
	52403	0,35	20	3000	66,2	VK [%]	5,1
4. mL	26884	0,18	20	1000	11,3	Mittelw.	10,8
	26439	0,18	20	1000	11,1	SD	0,8
	23589	0,16	20	1000	9,9	VK [%]	7,0
5. mL	n.n.		20	1000		Mittelw.	81,1
	n.n.		20	1000		SD	
	n.n.		20	1000		VK [%]	

Durchführung B

Fraktion	Peakfl.	[ng] o.c.	Inj. Vol. [μ L]	Extr. Vol. [μ L]	WF [%]		Σ Mittelw. d. WF [%]
1.-3. mL	54793	0,37	20	3000	69,2	Mittelw.	65,5
	55966	0,38	20	3000	70,7	SD	7,8
	44758	0,30	20	3000	56,5	VK [%]	11,9
4. mL	21421	0,14	20	1000	9,0	Mittelw.	8,0
	18660	0,13	20	1000	7,9	SD	0,9
	17012	0,11	20	1000	7,2	VK [%]	11,7
5. mL	9891	0,07	20	1000	4,2	Mittelw.	4,2
	n.n.		20	1000	3,6	SD	
	n.n.		20	1000	2,5	VK [%]	
6. mL	36875	0,25	50	1000	6,2	Mittelw.	3,9
	15379	0,10	50	1000	2,6	SD	2,0
	17072	0,12	50	1000	2,9	VK [%]	51,7

Tab. 8.13a: Peakflächen der BrMB-Derivate von OA bzw. DTX-1 in Abhängigkeit von der Standzeit bei Verwendung unterschiedlicher Basen zur Derivatisierung (Peakflächen bei Verwendung von Hünig-Base/Triethylamin-Mischung gleich 100 % gesetzt)

Analyt	Standzeit [min]	Hünig-B. /Triethyla.		Triethylamin		Hünig-Base	
		Peak- fläche	gesetzt [%]	Peak- fläche	entspricht [%]	Peak- fläche	entspricht [%]
OA	0	2607463	100,0	2251572	86,4	2431299	93,2
	90	2686067	100,0	2472219	92,0	2584822	96,2
	180	2716441	100,0	2398862	88,3	2566838	94,5
DTX-1	0	2098973	100,0	1761174	83,9	1849422	88,1
	90	2076864	100,0	1917233	92,3	1895396	91,3
	180	2105745	100,0	1881955	89,4	1904869	90,5

Tab. 8.13b: Peakflächen der BrMB-Derivate von OA bzw. DTX-1 in Abhängigkeit von der Standzeit bei Verwendung unterschiedlicher Basen zur Derivatisierung (Peakflächen bei t = 0 min gleich 100 % gesetzt)

Analyt	Standzeit [min]	Hünig-B. /Triethyla.		Triethylamin		Hünig-Base	
		Peak- fläche	entspricht [%]	Peak- fläche	entspricht [%]	Peak- fläche	entspricht [%]
OA	0	2607463	100,0	2251572	100,0	2431299	100,0
	90	2686067	103,0	2472219	109,8	2584822	106,3
	180	2716441	104,2	2398862	106,5	2566838	105,6
DTX-1	0	2098973	100,0	1761174	100,0	1849422	100,0
	90	2076864	98,9	1917233	108,9	1895396	102,5
	180	2105745	100,3	1881955	106,9	1904869	103,0

Tab. 8.14: OA-Wiederfindung nach Zugabe von Methanol während des Einengens

OA (HPLC/FLD)						
	1. Durchführung			2. Durchführung		
Ger.-Gl.	y = 407785 + 160134			y = 487623 - 1702		
Korrel.-K.	r ² = 0,9985			r ² = 0,9940		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	3267258	7,62	76,2	3564584	7,31	73,1
	2947382	6,84	68,4	3358824	6,89	68,9
	3141218	7,31	73,1	3688188	7,57	75,7
	2797697	6,47	64,7	2964941	6,08	60,8
	3049193	7,08	70,8	3401227	6,98	69,8
Mittelwert			70,6			69,7
SD			4,4			5,6
VK [%]			6,2			8,1

WF über Mittelwerte beider Durchführungen [%]:

Mittelwert **70,2** SD **0,7** VK [%] 1,0

Tab. 8.15a: OA-Wiederfindung nach Hydrolyse von 7-O-palmitoyl-OA

OA, entstanden aus 7-O-palmitoyl-OA (LC/MS)						
Durchführung	A	B	C	D	E	
Peakflächen	520829	477266	298583	683327	453994	
Ger.-Gl.:	511005	511005	320566	641213	550140	
$y = 805240 x$	490794	531056	285538	678093	548691	
$r^2 = 0,9863$	365498	468891	334658	630422	552636	
	455605					
ng OA o.c.	0,65	0,59	0,37	0,85	0,56	
	0,63	0,63	0,40	0,80	0,68	
	0,61	0,66	0,35	0,84	0,68	
	0,45	0,58	0,42	0,78	0,69	
	0,57					
Mittelwert	0,58	0,62	0,38	0,82	0,65	
SD	0,08	0,04	0,03	0,03	0,06	
VK [%]	13,42	5,85	7,09	4,01	9,17	
WF [%]	28,0	25,7	16,1	36,7	24,4	
	27,5	27,5	17,2	34,5	29,6	
	26,4	28,5	15,4	36,5	29,5	
	19,6	25,2	18,0	33,9	29,7	
	24,5					
Mittelwert	25,2	26,7	16,7	35,4	28,3	über alle Mittelwerte
SD	3,4	1,6	1,2	1,4	2,6	6,0
VK [%]	13,4	5,8	7,1	4,0	9,2	22,7

Tab. 8.15b: OA-Wiederfindung nach Hydrolyse von OA (zu Vergleichszwecken)

OA im Vergleichsexperiment (LC/MS)					
Durchführung	A	B	C	D	
Peakflächen	394890	322418	268064	275473	
Ger.-Gl.:	386676	321049	266132	267018	
$y = 805240 x$	360909	321774	250269	266212	
$r^2 = 0,9863$	368719	317587	244471	168939	
ng OA o.c.	0,49	0,40	0,33	0,34	
	0,48	0,40	0,33	0,33	
	0,45	0,40	0,31	0,33	
	0,46	0,39	0,30	0,21	
Mittelwert	0,47	0,40	0,32	0,30	
SD	0,02	0,003	0,01	0,06	
VK [%]	4,15	0,67	4,53	20,66	
WF [%]	24,5	20,0	16,6	17,1	
	24,0	19,9	16,5	16,6	
	22,4	20,0	15,5	16,5	
	22,9	19,7	15,2	10,5	
Mittelwert	23,5	19,9	16,0	15,2	über alle Mittelwerte
SD	1,0	0,1	0,7	3,1	3,8
VK [%]	4,2	0,7	4,5	20,7	20,5

Tab. 8.16: OA-Wiederfindung im auf die Hydrolyse folgenden Extraktionsschritt

OA (LC/MS)				
Durchführung	A	B	C	
Peakflächen	223070	268745	257617	
Ger.-Gl.:	260695	288872	248619	
$y = 236780 x$	262589	270403	241516	
$r^2 = 0,9683$	273007	268272	248619	
	253828	281531	235786	
	249566	256433	238674	
ng OA o.c.	0,94	1,14	1,09	
	1,10	1,22	1,05	
	1,11	1,14	1,02	
	1,15	1,13	1,05	
	1,07	1,19	1,00	
	1,05	1,08	1,01	
Mittelwert	1,07	1,15	1,04	
SD	0,07	0,05	0,03	
VK [%]	6,72	4,17	3,28	
WF [%]	18,8	22,7	21,8	
	22,0	24,4	21,0	
	22,2	22,8	20,4	
	23,1	22,7	21,0	über alle Mittel- werte
	21,4	23,8	19,9	
	21,1	21,7	20,2	
Mittelwert	21,4	23,0	20,7	
SD	1,4	1,0	0,7	1,2
VK [%]	6,7	4,2	3,3	5,4

Tab. 8.17: OA-Wiederfindung nach Vergrößerung des Extraktionsmittel- und zu extrahierenden Volumens

OA (LC/MS)						
Durchführung	1. Fraktion			2. Fraktion		
	A	B	Inj. Vol. [μ L]	A	B	Inj. Vol. [μ L]
Peakflächen	183055	142660	2	2488	n.n.	20
Ger.-Gl.:	184949	149621	2	2355	n.n.	20
$y = 236780 \cdot x$	192763	144886	2	2448	n.n.	20
$r^2 = 0,9683$	200955	156512	2	2379	n.n.	20
ng OA o.c.	0,77	0,60		0,11		
	0,78	0,63		0,10		
	0,81	0,61		0,10		
	0,85	0,66		0,10		
Mittelwert	0,80	0,63		0,10		
SD	0,03	0,03		0,003		
VK [%]	4,29	4,13		2,54		
WF [%]	77,3	60,3	über	1,0		
	78,1	63,2	Mittelw.	1,0		
	81,4	61,2	Durchf.	1,0		
	84,9	66,1	A u. B:	1,0		
Mittelwert	80,4	62,7	71,6	1,0		
SD	3,5	2,6	12,5	0,03		
VK [%]	4,3	4,1	17,5	2,5		

Tab. 8.18: OA-Wiederfindung bei Verwendung von CH_2Cl_2 als Extraktionsmittel

OA (LC/MS)						
Durchführung	1. Fraktion			2. Fraktion		
	A	B	Inj. Vol. [μ L]	A	B	Inj. Vol. [μ L]
Peakflächen	325580	293701	5	200809	69401	20
Ger.-Gl.:	175176	154089	2	91194	33838	10
$y = 261300 \cdot x$	196837	165142	2	136007	39665	10
$r^2 = 0,9957$	187979	164332	2	138594	57538	10
ng OA o.c.	1,25	1,12		0,77	0,27	
	0,67	0,59		0,35	0,13	
	0,75	0,63		0,52	0,15	
	0,72	0,63		0,53	0,22	
WF [%]	49,8	45,0	über	7,7	2,7	über
	67,0	59,0	Mittelw.	7,0	2,6	Mittelw.
	75,3	63,2	Durchf.	10,4	3,0	Durchf.
	71,9	62,9	A u. B:	10,6	4,4	A u. B:
Mittelwert	66,0	57,5	61,8	8,9	3,2	6,0
SD	11,3	8,6	6,0	1,9	0,8	4,0
VK [%]	17,1	14,9	9,8	20,8	26,6	67,2

Tab. 8.19: Wiederfindung für OA, DTX-1 und Monensin bei Einbeziehung („mit Hydrolyse“) bzw. Nichteinbeziehung („ohne Hydrolyse“) der Hydrolyse

OA (LC/MS)						
$y = 427760 x$ $r^2 = 0,9980$	mit Hydrolyse			ohne Hydrolyse		
	A	B	C	A	B	C
Peakflächen	218885 216190 228937	230092 243353 242925	217131 211356 214907	217602 204555 213880	226969 206394 210287	223505 217602 212340
ng OA o.c.	0,51 0,51 0,54	0,54 0,57 0,57	0,51 0,49 0,50	0,51 0,48 0,50	0,53 0,48 0,49	0,52 0,51 0,50
WF [%]	102,3 101,1 107,1	107,58 113,78 113,58	101,52 98,82 100,48	101,7 95,6 100	106,1 96,5 98,3	104,5 101,7 99,3
Mittelwert	103,5	111,6	100,3	99,1	100,3	101,8
SD	2,6	2,9	1,1	3,1	5,1	2,6
VK [%]	2,5	2,6	1,1	3,2	5,1	2,6
Mittelwert	über Mittelwerte		105,1	über Mittelwerte		100,4
SD	aller Durch-		5,9	aller Durch-		1,1
VK [%]	führungen:		5,6	führungen:		1,1
				p-Wert	Prüfwert	
Äquivalenztest	Liegt das berechnete Konfidenzintervall vollständig innerhalb des Äquivalenzintervalls?			Ja	---	$(g_u, g_o) = (-9,47, 0,06)$ mit $f_{\text{corr}} = 13$
F-Test	Sind Varianzen signifikant unterschiedlich?			Ja	$p = 0,0964$	$F = 2,632; (8; 8)$
Normalverteilungstest	Widersprechen die Daten einer Gaußverteilung			Nein	---	$d_{\text{max}} = 0,243 < 0,254$

Fortsetzung:

Tab. 8.19: Wiederfindung für OA, DTX-1 und Monensin bei Einbeziehung („mit Hydrolyse“) bzw. Nichteinbeziehung („ohne Hydrolyse“) der Hydrolyse

DTX-1 (LC/MS)

y = 332730 x r ² = 0,9983	mit Hydrolyse			ohne Hydrolyse		
	A	B	C	A	B	C
Peakflächen	155618 151492 148930	169326 167829 163404	159078 156849 152457	160908 150361 154353	159977 152557 156849	171788 161174 165999
ng OA o.c.	0,47 0,46 0,45	0,51 0,50 0,49	0,48 0,47 0,46	0,48 0,45 0,46	0,48 0,46 0,47	0,52 0,48 0,50
WF [%]	93,5 91,1 89,5	101,8 100,9 98,2	95,6 94,3 91,6	96,7 90,4 92,8	96,2 91,7 94,3	103,3 96,9 99,8
Mittelwert	91,4	100,3	93,8	93,3	94,0	100,0
SD	2,0	1,9	2,0	3,2	2,2	3,2
VK [%]	2,2	1,8	2,2	3,4	2,34	3,2
Mittelwert	über Mittelwerte		95,2	über Mittelwerte		95,8
SD	aller Durch-		3,8	aller Durch-		3,0
VK [%]	führungen:		4,0	führungen:		3,1
				p-Wert	Prüfwert	
Äquivalenztest	Liegt das berechnete Konfidenzintervall vollständig innerhalb des Äquivalenzintervalls?			Ja	---	(g _u , g _o) = (-3,60, 4,79)
F-Test	Sind Varianzen signifikant unterschiedlich?			Nein	p = 0,4274	F = 1,143; (8; 8)
Normalverteilungstest	Widersprechen die Daten einer Gaußverteilung			Nein	---	d _{max} = 0,171 < 0,254

Fortsetzung:

Tab. 8.19: Wiederfindung für OA, DTX-1 und Monensin bei Einbeziehung („mit Hydrolyse“) bzw. Nichteinbeziehung („ohne Hydrolyse“) der Hydrolyse

Monensin (LC/MS)						
y = 6191800 x r ² = 0,9985	mit Hydrolyse			ohne Hydrolyse		
	A	B	C	A	B	C
Peakflächen	n.n.	n.n.	n.n.	1141149	1178300	1184491
				1165297	1125050	1195637
				1201828	1129384	1219165
ng OA o.c.				0,18	0,19	0,19
				0,19	0,18	0,19
				0,19	0,18	0,20
WF [%]				92,15	95,15	95,65
				94,1	90,85	96,55
				97,05	91,2	98,45
Mittelwert				94,4	92,4	96,9
SD				2,5	2,4	1,4
VK [%]				2,6	2,6	1,5
Mittelwert	über Mittelwerte			über Mittelwerte		
SD	aller Durch-			aller Durch-		
VK [%]	führungen:			führungen:		
						94,6
						1,8
						1,9

Tab. 8.20: OA-Wiederfindung nach Hydrolyse und Neutralisation durch K₂CO₃

OA (HPLC/FLD)						
	A	B	C			
	y = 524455 x + 4344 r ² =0,9919	y = 554374 x + 62631 r ² =0,9795	y = 683053 x + 47497 r ² =0,9993			
Peakflächen	1592430	1717792	2127057			
	1954282	2171464	2787416			
	1697144	1798483	2351275			
	1728647	1898640	2439608			
ng OA o.c.	3,03	2,99	3,04			
	3,72	3,80	4,01			
	3,23	3,13	3,37			
	3,29	3,31	3,57			
WF [%]	75,7	74,6	76,1	über		
	93,0	95,1	100,3	Mittelw.		
	80,7	78,3	84,3	aller		
	82,2	82,8	89,3	Durch-		
				führungen:		
Mittelwert	82,9	82,7	87,5	84,4		
SD	7,3	8,9	10,1	2,7		
VK [%]	8,8	10,8	11,5	3,2		

Tab. 8.21: OA-Wiederfindung in dem mit OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin dotierten Muschelmateriale (Gesamtmethode); HPLC/FLD-Bestimmung als BrMB-Derivat

OA: Durchführung A (HPLC/FLD)

	ohne Hydrolyse			mit Hydrolyse		
Ger.-Gl.	$y = 1664104x + 22605$			$y = 1664104x + 22605$		
Korrel.-K.	$r^2 = 0,9899$			$r^2 = 0,9899$		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	743042	0,43	54,1	1260750	0,74	93,0
	911536	0,53	66,8	1384353	0,82	102,3
				1435013	0,85	106,1
				1600895	0,95	118,6
				1814120	1,08	134,6
Mittelwert			60,4			110,9
SD			8,9			16,1
VK [%]			14,8			14,5
					p-Wert	Prüfwert
t-Test:	Sind Mittelwerte signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) ?			Ja (**)	$p = 0,0100$	$t = 4,036$; (df=5)
F-Test:	Sind Varianzen signifikant unterschiedlich?			Nein	$p = 0,3921$	$F = 3,235$; (4; 1)

OA: Durchführung B (HPLC/FLD)

	ohne Hydrolyse			mit Hydrolyse		
Ger.-Gl.	$y = 1664104x + 22605$			$y = 1664104x + 22605$		
Korrel.-K.	$r^2 = 0,9899$			$r^2 = 0,9899$		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	622331	0,36	45,0	970391	0,57	71,2
	647417	0,38	46,9	1041330	0,61	76,5
	722194	0,42	52,6	1104040	0,65	81,2
	726057	0,42	52,8	1199620	0,71	88,4
	766854	0,45	55,9			
Mittelwert			50,7			79,3
SD			4,5			7,3
VK [%]			8,9			9,2
					p-Wert	Prüfwert
t-Test:	Sind Mittelwerte signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) ?			Ja (***)	$p = 0,0002$	$t = 7,282$; (df=7)
F-Test:	Sind Varianzen signifikant unterschiedlich?			Nein	$p = 0,3921$	$F = 2,630$; (3; 4)

Tab. 8.22: OA-Wiederfindung in dem mit OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin dotierten Muschelmateriale (Gesamtmethode); Bestimmung unterderivatisiert mittels LC/MS

OA: Durchführung A (LC/MS)

	ohne Hydrolyse			mit Hydrolyse		
Ger.-Gl.	$y = 173690 x + 12491$			$y = 173690 x + 12491$		
Korrel.-K.	$r^2 = 0,9959$			$r^2 = 0,9959$		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	84503	0,42	77,7	99631	0,50	94,1
	87629	0,43	81,1	101716	0,51	96,3
	89661	0,44	83,3	107534	0,55	102,6
	89714	0,45	83,4	107882	0,55	103,0
	90356	0,45	84,1	108559	0,55	103,7
	93795	0,47	87,8	116531	0,60	112,3
Mittelwert	82,9			102,0		
SD	3,3			6,4		
VK [%]	4,0			6,3		
				p-Wert	Prüfwert	
t-Test:	Sind Mittelwerte signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) ?			Ja (***)	$p < 0,0001$	$t = 6,477$; (df=10)
F-Test:	Sind Varianzen signifikant unterschiedlich?			Nein	$p = 0,0877$	$F = 3,723$; (5; 5)

OA: Durchführung B (LC/MS)

	ohne Hydrolyse			mit Hydrolyse		
Ger.-Gl.	$y = 173690 x + 12491$			$y = 173690 x + 12491$		
Korrel.-K.	$r^2 = 0,9959$			$r^2 = 0,9959$		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	78823	0,38	71,6	100465	0,51	95,0
	84833	0,42	78,1	102601	0,52	97,3
	85580	0,42	78,9	103400	0,52	98,1
	87629	0,43	81,1	104356	0,53	99,2
	90148	0,45	83,8	105189	0,53	100,1
	95324	0,48	89,4	105936	0,54	100,9
Mittelwert	80,5			98,4		
SD	6,0			2,1		
VK [%]	7,4			2,2		
				p-Wert	Prüfwert	
t-Test:	Sind Mittelwerte signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) ?			Ja (***)	$p < 0,0001$	$t = 6,923$ (df = 10)
F-Test:	Sind Varianzen signifikant unterschiedlich?			Ja (Vorauss. f. t-Test nicht erfüllt)	$p = 0,0203$	$F = 7,894$ (5; 5)

Tab. 8.23: DTX-1-Wiederfindung in dem mit OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin dotierten Muschelmateriale (Gesamtmethode); HPLC/FLD-Bestimmung als BrMB-Derivat

DTX-1: Durchführung A (HPLC/FLD)

	ohne Hydrolyse			mit Hydrolyse		
Ger.-Gl.	$y = 1161653 x - 207785$			$y = 1161653 x - 207785$		
Korrel.-K.	$r^2 = 0,9779$			$r^2 = 0,9779$		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	197578	0,35	43,6	95547	0,26	32,6
	254619	0,40	49,8	104589	0,27	33,6
	286108	0,43	53,1	107929	0,27	34,0
	298104	0,44	54,4	147055	0,31	38,2
	343094	0,47	59,3	162699	0,32	39,9
Mittelwert	52,0			35,7		
SD	5,8			3,2		
VK [%]	11,2			8,9		

DTX-1: Durchführung B (HPLC/FLD)

	ohne Hydrolyse			mit Hydrolyse		
Ger.-Gl.	$y = 1161653 x - 207785$			$y = 1161653 x - 207785$		
Korrel.-K.	$r^2 = 0,9779$			$r^2 = 0,9779$		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	193134	0,35	43,1	40083	0,21	26,7
	206838	0,36	44,6	47081	0,22	27,4
	224550	0,37	46,5	57453	0,23	28,5
	227174	0,37	46,8	64280	0,23	29,3
	237108	0,38	47,9			
Mittelwert	45,8			28,0		
SD	1,9			1,2		
VK [%]	4,1			4,1		

Tab. 8.24: DTX-1-Wiederfindung in dem mit OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin dotierten Muschelmateriale (Gesamtmethode); Bestimmung unterivatisiert per LC/MS

DTX-1: Durchführung A (LC/MS)

	ohne Hydrolyse			mit Hydrolyse		
Ger.-Gl.	$y = 195350 x + 14216$			$y = 195350 x + 14216$		
Korrel.-K.	$r^2 = 0,9971$			$r^2 = 0,9971$		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	94524	0,41	77,1	76572	0,32	59,9
	98568	0,43	81,0	83175	0,35	66,2
	100248	0,44	82,6	87726	0,38	70,6
				87843	0,38	70,7
				88586	0,38	71,4
Mittelwert			80,2			67,7
SD			2,8			4,9
VK [%]			3,5			7,2

DTX-1: Durchführung B (LC/MS)

	ohne Hydrolyse			mit Hydrolyse		
Ger.-Gl.	$y = 195350 x + 14216$			$y = 195350 x + 14216$		
Korrel.-K.	$r^2 = 0,9971$			$r^2 = 0,9971$		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	99799	0,44	82,1	67332	0,27	51,0
	100190	0,44	82,5	77021	0,32	60,3
	101518	0,45	83,8	78623	0,33	61,8
	103960	0,46	86,1	79014	0,33	62,2
	105269	0,47	87,4	84542	0,36	67,5
	111871	0,50	93,7	92766	0,40	75,4
Mittelwert			86,0			63,0
SD			4,3			8,1
VK [%]			5,0			12,8

Tab. 8.25: 7-O-palmitoyl-OA-Wiederfindung in dem mit OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin dotierten Muschelmateriale (Gesamtmethode); HPLC/FLD-Bestimmung als BrMB-Derivat bzw. underivatisiert per LC/MS

7-O-palmitoyl-OA ohne Hydrolyse (HPLC/FLD)

	Durchführung A			Durchführung B		
Ger.-Gl.	y = 203494x + 59330			y = 203494x + 59330		
Korrel.-K.	r ² = 0,9907			r ² = 0,9907		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	106511	0,23	29,0	115621	0,28	34,6
	164092	0,51	64,4	120656	0,30	37,7
	135680	0,38	46,9	114832	0,27	34,1
				115655	0,28	34,6
Mittelwert			46,7			35,2
SD			17,7			1,6
VK [%]			37,8			4,7

7-O-palmitoyl-OA ohne Hydrolyse (LC/MS)

	Durchführung A			Durchführung B		
Ger.-Gl.						
Korrel.-K.						
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	98706	0,57	106,4	85829	0,49	92,1
	95897	0,55	103,2	87487	0,50	93,9
	96100	0,55	103,5	93816	0,54	100,9
	121989	0,70	132,2	88723	0,51	95,3
	88299	0,51	94,8	79771	0,46	85,4
	92513	0,53	99,5	88012	0,50	94,5
Mittelwert			106,6			93,7
SD			13,1			5,1
VK [%]			12,3			5,4

Nach Hydrolyse war 7-O-palmitoyl-OA weder underivatisiert mit LC/MS noch nach Derivatisierung per HPLC/FLD nachweisbar.

Tab. 8.26: Monensin-Wiederfindung in dem mit OA, DTX-1, 7-O-palmitoyl-OA und Monensin dotierten Muschelmateriale (Gesamtmethode); HPLC/FLD-Bestimmung als BrMB-Derivat bzw. underivatisiert mittels LC/MS

Monensin ohne Hydrolyse (HPLC/FLD)

	Durchführung A			Durchführung B		
Ger.-Gl.	$y = 279522x - 378180$			$y = 279522x - 378180$		
Korrel.-K.	$r^2 = 0,9902$			$r^2 = 0,9902$		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	544001	3,30	68,7	473696	3,05	63,5
	694380	3,84	79,9	498388	3,14	65,3
	636968	3,63	75,7	533513	3,26	68,0
				543766	3,30	68,7
				575265	3,41	71,0
Mittelwert			74,8			67,3
SD			5,7			3,0
VK [%]			7,6			4,4

Monensin ohne Hydrolyse (LC/MS)

	Durchführung A			Durchführung B		
Ger.-Gl.	$y = 149470x + 69125$			$y = 149470x + 69125$		
Korrel.-K.	$r^2 = 0,9972$			$r^2 = 0,9972$		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	365823	1,99	62,0	407376	2,26	70,7
	351773	1,89	59,1	394970	2,18	68,1
	367467	2,00	62,4	387496	2,13	66,6
				386599	2,12	66,4
				390784	2,15	67,3
				371503	2,02	63,2
Mittelwert			61,2			67,0
SD			1,8			2,5
VK [%]			2,9			3,7

Nach Hydrolyse war Monensin weder underivatisiert mit LC/MS noch nach Derivatisierung per HPLC/FLD nachweisbar.

Tab. 8.27: OA-Wiederfindung im zertifizierten Referenzmaterial MUS-2 (Gesamtmethodik); HPLC/FLD-Bestimmung als BrMB-Derivat bzw. underivatisiert mittels LC/MS

OA (HPLC/FLD)

	Durchführung A			Durchführung B		
Ger.-Gl.	y = 608191x + 347344			y = 608191x + 347344		
Korrel.-K.	r ² = 0,9906			r ² = 0,9906		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	2807894	4,05	26,1	2727903	3,91	25,3
	2814855	4,06	26,1	2809796	4,05	26,1
Mittelwert	26,1			25,7		
SD	0,03			0,6		
VK [%]	0,1			2,4		

OA (LC/MS)

	Durchführung A			Durchführung B		
Ger.-Gl.	y = 80762 x + 334450			y = 80762 x + 334450		
Korrel.-K.	r ² = 0,9988			r ² = 0,9988		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	1503176	14,47	93,4	1436951	13,65	88,1
	1495908	14,38	92,8	1371534	12,84	82,8
	1484601	14,24	91,9	1377187	12,91	83,3
	1447450	13,78	88,9	1314193	12,13	78,3
Mittelwert	91,7			83,1		
SD	2,0			4,0		
VK [%]	2,2			4,8		

Tab. 8.28: DTX-1-Wiederfindung im zertifizierten Referenzmaterial MUS-2 (Gesamtmethodik); HPLC/FLD-Bestimmung als BrMB-Derivat bzw. underivatisiert per LC/MS

DTX-1 (HPLC/FLD)

	Durchführung A			Durchführung B		
Ger.-Gl.	y = 2053146 x - 319549			y = 2053146 x - 319549		
Korrel.-K.	r ² = 0,9947			r ² = 0,9947		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	118249	0,21	15,1	176705	0,24	17,2
	38964	0,17	12,4	150244	0,23	16,2
Mittelwert	13,8			16,7		
SD	1,9			0,7		
VK [%]	14,1			3,9		

DTX-1 (LC/MS)

	Durchführung A			Durchführung B		
Ger.-Gl.	y = 89612x + 35765			y = 89612x + 35765		
Korrel.-K.	r ² = 0,9980			r ² = 0,9980		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	162835	1,42	100,6	164717	1,44	102,1
	156114	1,34	95,3	162745	1,42	100,6
	158085	1,37	96,9	158444	1,37	97,2
	163104	1,42	100,8	159609	1,38	98,1
Mittelwert	98,4			99,5		
SD	2,8			2,3		
VK [%]	2,8			2,3		

Tab. 8.29: Monesin-Wiederfindung im zertifizierten Referenzmaterial MUS-2 (Gesamtmethodik); HPLC/FLD-Bestimmung als BrMB-Derivat bzw. underivatisiert mittels LC/MS

Monesin (HPLC/FLD)

	Durchführung A			Durchführung B		
Ger.-Gl.	$y = 1368675 x + 64167$			$y = 1368675 x + 64167$		
Korrel.-K.	$r^2 = 0,9947$			$r^2 = 0,9947$		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	293060	0,17	21,8	303950	0,18	22,8
	301100	0,17	22,5	301739	0,17	22,6
Mittelwert	22,2			22,7		
SD	0,5			0,1		
VK [%]	2,4			0,7		

Monesin (LC/MS)

	Durchführung A			Durchführung B		
Ger.-Gl.	$y = 45683 + 11944$			$y = 45683 + 11944$		
Korrel.-K.	$r^2 = 0,9933$			$r^2 = 0,9933$		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	47143	0,77	100,3	46933	0,77	99,7
	46599	0,76	98,8	47723	0,78	102,0
	46247	0,75	97,8	45251	0,73	94,9
	47198	0,77	100,5	46837	0,76	99,4
Mittelwert	99,3			99,0		
SD	1,3			3,0		
VK [%]	1,3			3,0		

Tab. 8.30: OA-Wiederfindung im natürlich belasteten Muschelmateriale (Gesamtmethodik); HPLC/FLD-Bestimmung als BrMB-Derivat

OA (HPLC/FLD): Durchführung A

	ohne Hydrolyse			mit Hydrolyse		
Ger.-Gl.	$y = 394834 x - 433898$			$y = 394834 x - 433898$		
Korrel.-K.	$r^2 = 0,9282$			$r^2 = 0,9282$		
	Peakfl.	[ng] o.c.	[$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Peakfl.	[ng] o.c.	[$\mu\text{g kg}^{-1}$]
	536325	2,46	295,1	1189611	4,11	493,8
	642174	2,73	327,3	1851065	5,79	695,0
	853330	3,26	391,6	1856855	5,80	696,8
				1942048	6,02	722,7
Mittelwert	338,0			652,1		
SD	49,1			106,3		
VK [%]	14,5			16,3		
				p-Wert	Prüfwert	
t-Test:	Sind Mittelwerte signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) ?			Ja (**)	$p = 0,0055$	$t = 4,675$; (df=5)
F-Test:	Sind Varianzen signifikant unterschiedlich?			Nein	$p = 0,1809$	$F = 4,685$; (3; 2)

OA (HPLC/FLD): Durchführung B

	ohne Hydrolyse			mit Hydrolyse		
Ger.-Gl.	$y = 394834 x - 433898$			$y = 394834 x - 433898$		
Korrel.-K.	$r^2 = 0,9282$			$r^2 = 0,9282$		
	Peakfl.	[ng] o.c.	[$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Peakfl.	[ng] o.c.	[$\mu\text{g kg}^{-1}$]
	634250	2,71	324,9	2584693	7,65	918,2
	779344	3,07	369,0	3213765	9,24	1109,5
	886223	3,34	401,6	3240150	9,31	1117,6
Mittelwert	365,2			1048,4		
SD	31,4			112,9		
VK [%]	8,6			10,8		
				p-Wert	Prüfwert	
t-Test:	Sind Mittelwerte signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) ?			Ja (***)	$p = 0,0006$	$t = 9,925$; (df=4)
F-Test:	Sind Varianzen signifikant unterschiedlich?			Nein	$p = 0,1041$	$F = 8,608$; (2; 2)

Tab. 8.31: OA-Wiederfindung im natürlich belasteten Muschelmateriale (Gesamtmethode); Bestimmung unterivatisiert per LC/MS

OA (LC/MS): Durchführung A

	ohne Hydrolyse			mit Hydrolyse		
Ger.-Gl.	$y = 34386 x + 2929$			$y = 34386 x + 2929$		
Korrel.-K.	$r^2 = 0,9984$			$r^2 = 0,9984$		
	Peakfl.	[ng] o.c.	[$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Peakfl.	[ng] o.c.	[$\mu\text{g kg}^{-1}$]
	73352	2,05	393,5	180223	5,16	990,8
	73695	2,06	395,5	180773	5,17	993,9
	74417	2,08	399,5	187307	5,36	1030,4
				189232	5,42	1041,1
Mittelwert	396,2			1014,0		
SD	3,0			25,5		
VK [%]	0,8			2,5		
t-Test:	Sind Mittelwerte signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) ?			Ja (***)	p < 0,0001	t = 40,79; (df=5)
F-Test:	Sind Varianzen signifikant unterschiedlich?			Ja (Vorauss. f. t-Test nicht erfüllt)	p = 0,0141	F = 70,27; (3; 2)

OA (LC/MS): Durchführung B

	ohne Hydrolyse			mit Hydrolyse		
Ger.-Gl.	$y = 34386 x + 2929$			$y = 34386 x + 2929$		
Korrel.-K.	$r^2 = 0,9984$			$r^2 = 0,9984$		
	Peakfl.	[ng] o.c.	[$\mu\text{g kg}^{-1}$]	Peakfl.	[ng] o.c.	[$\mu\text{g kg}^{-1}$]
	72389	1,98	380,9	168789	4,80	921,6
	71082	2,02	388,2	167758	4,83	927,4
	76206	2,13	409,5	169167	4,84	929,5
Mittelwert	392,8			926,1		
SD	14,9			4,1		
VK [%]	3,8			0,4		
t-Test:	Sind Mittelwerte signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) ?			Ja (***)	p < 0,0001	t = 59,88; (df=4)
F-Test:	Sind Varianzen signifikant unterschiedlich?			Nein	p = 0,0699	F = 13,31; (2; 2)

Tab. 8.32: Monensin-Wiederfindung im natürlich belasteten Muschelmaterial (Gesamtmethodik); HPLC/FLD-Bestimmung als BrMB-Derivat bzw. underivatisiert per LC/MS

Monensin (HPLC/FLD) ohne Hydrolyse

	Durchführung A			Durchführung B		
Ger.-Gl.	$y = 188510 x - 1000000$			$y = 188510 x - 1000000$		
Korrel.-K.	$r^2 = 0,9739$			$r^2 = 0,9739$		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	97720	7,67	28,8	152375	7,96	29,8
	116788	7,77	29,1	154031	7,97	29,9
	136572	7,88	29,5	162068	8,01	30,0
Mittelwert	29,1			29,9		
SD	0,4			0,1		
VK [%]	1,3			0,3		

Monensin (LC/MS) ohne Hydrolyse

	Durchführung A			Durchführung B		
Ger.-Gl.	$y = 64626x + 34426$			$y = 64626x + 34426$		
Korrel.-K.	$r^2 = 0,9940$			$r^2 = 0,9940$		
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]
	168073	2,07	12,4	181127	2,27	13,6
	170916	2,11	12,7	186685	2,36	14,1
	187654	2,37	14,2	194634	2,48	14,9
Mittelwert	13,1			14,2		
SD	1,0			0,6		
VK [%]	7,5			4,4		

Bei den Bestimmungen nach Hydrolyse war Monensin weder underivatisiert per LC/MS noch nach Derivatisierung mittels HPLC/FLD nachweisbar.

Tab. 8.33: Wiederfindung von YTX, OA und DTX-1 nach Evaporation ihrer Lösung in Methanol : 10 mM Ammoniumacetat (13 : 7; v : v)

YTX (LC/MS)

	1. Durchführung			2. Durchführung			über Mittelwerte beider Durchführungen
Ger.-Gl.	y = 2318 x + 431			y = 2318 x + 431			
Korrel.-K.	r ² = 0,9948			r ² = 0,9948			
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	WF [%]
	10714	4,44	88,7	11720	4,87	97,4	
	11017	4,57	91,3	11590	4,81	96,3	
	9708	4,00	80,0	11061	4,59	91,7	
Mittelwert			86,7			95,1	90,9
SD			5,9			3,0	6,0
VK [%]			6,8			3,2	6,6

OA (LC/MS)

	1. Durchführung			2. Durchführung			über Mittelwerte beider Durchführungen
Ger.-Gl.	y = 3011 x			y = 3011 x			
Korrel.-K.	r ² = 0,9897			r ² = 0,9897			
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	WF [%]
	17033	5,66	113,1	17915	5,95	119	
	16181	5,37	107,5	16235	5,39	107,8	
	14889	4,95	98,9	14989	4,98	99,6	
Mittelwert			106,5			108,8	107,7
SD			7,2			9,8	1,6
VK [%]			6,7			9,0	1,5

DTX-1 (LC/MS)

	1. Durchführung			2. Durchführung			über Mittelwerte beider Durchführungen
Ger.-Gl.	y = 5173 x			y = 5173 x			
Korrel.-K.	r ² = 0,9967			r ² = 0,9967			
	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	Peakfl.	[ng] o.c.	WF [%]	WF [%]
	30324	5,86	117,2	30438	5,88	117,7	
	28974	5,60	112,0	31090	6,01	120,2	
	25353	4,90	98,0	26739	5,17	103,4	
Mittelwert			109,1			113,8	111,4
SD			9,9			9,1	3,3
VK [%]			9,1			8,0	3,0

Tab. 8.34: Wiederfindung von YTX, OA und DTX-1 bei Anwendung der GPC mit Methanol : 10 mM NH₄⁺H₃CCOO⁻ (13 : 7;v : v)

YTX (LC/MS)

	1. Durchführung			2. Durchführung			3. Durchführung		
Ger.-Gl.	y = 2318 x + 431			y = 2318 x + 431			y = 2318 x + 431		
Korrel.-K.	r ² = 0,9948			r ² = 0,9948			r ² = 0,9948		
	Peakfl.	[ng]	WF	Peakfl.	[ng]	WF	Peakfl.	[ng]	WF
		o.c.	[%]		o.c.	[%]		o.c.	[%]
	10672	4,42	88,4	11001	4,56	91,2	9895	4,08	81,7
	11110	4,61	92,1	9133	3,75	75,1	10150	4,19	83,9
	9413	3,88	77,5	11750	4,88	97,7	10085	4,17	83,3
Mittelwert			86,0			88,0			82,9
SD			7,6			11,6			1,1
VK [%]			8,8			13,2			1,4

WF über Mittelwerte aller 3 Durchführungen [%]:

Mittelwert **85,6**

SD **2,5**

VK [%] 3,0

OA (LC/MS)

	1. Durchführung			2. Durchführung			3. Durchführung		
Ger.-Gl.	y = 3011 x			y = 3011 x			y = 3011 x		
Korrel.-K.	r ² = 0,9897			r ² = 0,9897			r ² = 0,9897		
	Peakfl.	[ng]	WF	Peakfl.	[ng]	WF	Peakfl.	[ng]	WF
		o.c.	[%]		o.c.	[%]		o.c.	[%]
	15651	5,20	104,0	15314	5,09	101,7	14965	4,97	99,4
	15356	5,10	102,0	12649	4,20	84,0	14670	4,87	97,4
	14525	4,82	96,5	16476	5,47	109,4	13736	4,56	91,2
Mittelwert			100,8			98,4			96,0
SD			3,9			13,0			4,3
VK [%]			3,8			13,2			4,4

WF über Mittelwerte aller 3 Durchführungen [%]:

Mittelwert **98,4**

SD **2,4**

VK [%] 2,4

DTX-1 (LC/MS)

	1. Durchführung			2. Durchführung			3. Durchführung		
Ger.-Gl.	y = 5173 x			y = 5173 x			y = 5173 x		
Korrel.-K.	r ² = 0,9967			r ² = 0,9967			r ² = 0,9967		
	Peakfl.	[ng]	WF	Peakfl.	[ng]	WF	Peakfl.	[ng]	WF
		o.c.	[%]		o.c.	[%]		o.c.	[%]
	27691	5,35	107,1	32580	6,30	126,0	27950	5,40	108,1
	25684	4,97	99,3	21023	4,07	81,3	24246	4,69	93,7
	19994	3,87	77,3	27298	5,28	105,5	25110	4,85	97,1
Mittelwert			94,6			104,3			99,6
SD			15,4			22,4			7,5
VK [%]			16,3			21,5			7,5

WF über Mittelwerte aller 3 Durchführungen [%]:

Mittelwert **99,5**

SD **4,9**

VK [%] 4,9

Tab. 8.35: Wiederfindung nach Anwendung der GPC auf mit YTX, OA und DTX-1 dotierten Muschelextrakt

(LC/MS)

	YTX			OA			DTX-1		
Ger.-Gl.	$y = 2318 x + 431$			$y = 3011 x$			$y = 5173 x$		
Korrel.-K.	$r^2 = 0,9948$			$r^2 = 0,9897$			$r^2 = 0,9967$		
	Peakfl.	[ng]	WF	Peakfl.	[ng]	WF	Peakfl.	[ng]	WF
		o.c.	[%]		o.c.	[%]		o.c.	[%]
	10779	4,46	89,3	16280	5,41	108,1	26118	5,05	101,0
	9610	3,96	79,2	12761	4,24	84,8	24748	4,78	95,7
	11961	4,97	99,5	15401	5,12	102,3	25756	4,98	99,6
Mittelwert			89,3			98,4			98,7
SD			10,1			12,2			2,7
VK [%]			11,4			12,4			2,8

Tab. 8.36: YTX-Gehalte des natürlich kontaminierten Muschelhepatopankreas

YTX (LC/MS), Durchführung A (Einwaage 1,0482 g)

	1. Durchführung GPC			2. Durchführung GPC			3. Durchführung GPC		
Ger.-Gl.	y = 1248x+608			y = 1248x+608			y = 1248x+608		
Korrel.-K.	r ² = 0,9428			r ² = 0,9428			r ² = 0,9428		
	Peakfl.	[ng]	Gehalt	Peakfl.	[ng]	Gehalt	Peakfl.	[ng]	Gehalt
		o.c.	[µg kg ⁻¹]		o.c.	[µg kg ⁻¹]		o.c.	[µg kg ⁻¹]
	15472	11,91	1136,2	14274	10,95	1044,6	15247	11,73	1119,1
	15547	11,97	1142,0	15072	11,59	1105,7	14935	11,48	1095,2
	15085	11,60	1106,7	14473	11,11	1059,9	15284	11,76	1121,9
Mittelwert			1128,3			1070,1			1112,1
SD			18,9			31,8			14,7
VK [%]			1,7			3,0			1,3

WF über Mittelwerte der 1., 2., und 3. Durchführung [µg kg⁻¹]:Mittelwert **1103,5** SD **30,0** VK [%] 2,7

YTX (LC/MS), Durchführung B (Einwaage 1,1378 g)

	1. Durchführung GPC			2. Durchführung GPC			3. Durchführung GPC		
Ger.-Gl.	y = 1248x+608			y = 1248x+608			y = 1248x+608		
Korrel.-K.	r ² = 0,9428			r ² = 0,9428			r ² = 0,9428		
	Peakfl.	[ng]	Gehalt	Peakfl.	[ng]	Gehalt	Peakfl.	[ng]	Gehalt
		o.c.	[µg kg ⁻¹]		o.c.	[µg kg ⁻¹]		o.c.	[µg kg ⁻¹]
	16670	12,87	1131,1	17743	13,73	1206,7	15634	12,04	1058,2
	16283	12,56	1103,9	17406	13,46	1183,0	16046	12,37	1087,2
	16345	12,61	1108,3	16869	13,03	1145,2	16096	12,41	1090,7
Mittelwert			1114,4			1178,3			1078,7
SD			14,6			31,0			17,8
VK [%]			1,3			2,6			1,7

WF über Mittelwerte der 1., 2., und 3. Durchführung [µg kg⁻¹]:Mittelwert **1123,8** SD **50,5** VK [%] 4,5

YTX (LC/MS), Durchführung C (Einwaage 1,0798 g)

	1. Durchführung GPC			2. Durchführung GPC			3. Durchführung GPC		
Ger.-Gl.	y = 1248x+608			y = 1248x+608			y = 1248x+608		
Korrel.-K.	r ² = 0,9428			r ² = 0,9428			r ² = 0,9428		
	Peakfl.	[ng]	Gehalt	Peakfl.	[ng]	Gehalt	Peakfl.	[ng]	Gehalt
		o.c.	[µg kg ⁻¹]		o.c.	[µg kg ⁻¹]		o.c.	[µg kg ⁻¹]
	16171	12,47	1154,8	16982	13,12	1215,0	16196	12,49	1156,7
	15459	11,90	1102,1	16807	12,98	1202,1	16258	12,54	1161,3
	15871	12,23	1132,6	15609	12,02	1113,2	15260	11,74	1087,2
Mittelwert			1129,8			1176,8			1135,1
SD			26,5			55,5			41,5
VK [%]			2,3			4,7			3,7

WF über Mittelwerte der 1., 2., und 3. Durchführung [µg kg⁻¹]:Mittelwert **1147,2** SD **25,7** VK [%] 2,2WF über Mittelwerte der Durchführungen A, B, und C [µg kg⁻¹]:Mittelwert **1124,8** SD **21,9** VK [%] 1,9

Tab. 8.37: OA-Gehalte des natürlich kontaminierten Muschelhepatopankreas

OA (LC/MS), Durchführung A (Einwaage 1,0482 g)

	1. Durchführung GPC			2. Durchführung GPC			3. Durchführung GPC		
Ger.-Gl.	y = 3694 x - 1014			y = 3694 x - 1014			y = 3694 x - 1014		
Korrel.-K.	r ² = 0,9933			r ² = 0,9933			r ² = 0,9933		
	Peakfl.	[ng] o.c.	Gehalt [µg kg ⁻¹]	Peakfl.	[ng] o.c.	Gehalt [µg kg ⁻¹]	Peakfl.	[ng] o.c.	Gehalt [µg kg ⁻¹]
	19514	5,56	530,1	18527	5,29	504,7	19883	5,66	539,7
	19658	5,60	533,9	15572	4,49	428,4	19894	5,66	540,0
	19222	5,48	522,6	18372	5,25	500,7	20334	5,78	551,3
Mittelwert			528,9			477,9			543,7
SD			5,7			43,0			6,6
VK [%]			1,1			9,0			1,2

WF über Mittelwerte der 1., 2., und 3. Durchführung [µg kg⁻¹]:Mittelwert **516,8**SD **34,5**

VK [%] 6,7

OA (LC/MS), Durchführung B (Einwaage 1,1378 g)

	1. Durchführung GPC			2. Durchführung GPC			3. Durchführung GPC		
Ger.-Gl.	y = 3694 x - 1014			y = 3694 x - 1014			y = 3694 x - 1014		
Korrel.-K.	r ² = 0,9933			r ² = 0,9933			r ² = 0,9933		
	Peakfl.	[ng] o.c.	Gehalt [µg kg ⁻¹]	Peakfl.	[ng] o.c.	Gehalt [µg kg ⁻¹]	Peakfl.	[ng] o.c.	Gehalt [µg kg ⁻¹]
	21634	6,13	538,8	21634	6,13	538,8	21571	6,11	537,4
	21120	5,99	526,6	21575	6,12	537,4	18464	5,27	463,4
	20400	5,80	509,5	20788	5,90	518,7	19780	5,63	494,7
Mittelwert			525,0			531,7			498,5
SD			14,7			11,2			37,1
VK [%]			2,8			2,1			7,4

WF über Mittelwerte der 1., 2., und 3. Durchführung [µg kg⁻¹]:Mittelwert **518,4**SD **17,5**

VK [%] 3,4

OA (LC/MS), Durchführung C (Einwaage 1,0798 g)

	1. Durchführung GPC			2. Durchführung GPC			3. Durchführung GPC		
Ger.-Gl.	y = 3694 x - 1014			y = 3694 x - 1014			y = 3694 x - 1014		
Korrel.-K.	r ² = 0,9933			r ² = 0,9933			r ² = 0,9933		
	Peakfl.	[ng] o.c.	Gehalt [µg kg ⁻¹]	Peakfl.	[ng] o.c.	Gehalt [µg kg ⁻¹]	Peakfl.	[ng] o.c.	Gehalt [µg kg ⁻¹]
	22347	6,32	585,7	18945	5,40	500,4	20899	5,93	549,4
	18852	5,38	498,1	19765	5,63	520,9	19824	5,64	522,4
	20315	5,77	534,7	18690	5,33	494,0	20156	5,73	530,7
Mittelwert			539,5			505,1			534,2
SD			44,0			14,1			13,8
VK [%]			8,2			2,8			2,6

WF über Mittelwerte der 1., 2., und 3. Durchführung [µg kg⁻¹]:Mittelwert **526,2**SD **18,5**

VK [%] 3,5

WF über Mittelwerte der Durchführungen A, B, und C [µg kg⁻¹]:Mittelwert **520,5**SD **5,1**

VK [%] 1,0

Tab. 8.38: DTX-1-Gehalte des natürlich kontaminierten Muschelhepatopankreas

DTX-1 (LC/MS), Durchführung A (Einwaage 1,0482 g)

	1. Durchführung GPC			2. Durchführung GPC			3. Durchführung GPC		
Ger.-Gl.	y = 1248 x + 608			y = 1248 x + 608			y = 1248 x + 608		
Korrel.-K.	r ² = 0,9429			r ² = 0,9429			r ² = 0,9429		
	Peakfl.	[ng] o.c.	Gehalt [µg kg ⁻¹]	Peakfl.	[ng] o.c.	Gehalt [µg kg ⁻¹]	Peakfl.	[ng] o.c.	Gehalt [µg kg ⁻¹]
	42790	7,35	700,9	44178	7,58	723,4	43284	7,43	708,9
	43666	7,50	715,1	38485	6,62	631,1	42425	7,29	695,0
	42778	7,35	700,7	40596	6,97	665,3	42196	7,25	691,3
Mittelwert			705,6			673,3			698,4
SD			8,3			46,7			9,3
VK [%]			1,2			6,9			1,3

WF über Mittelwerte der 1., 2., und 3. Durchführung [µg kg⁻¹]:Mittelwert **692,4**SD **17,0**

VK [%] 2,5

DTX-1 (LC/MS), Durchführung B (Einwaage 1,1378 g)

	1. Durchführung GPC			2. Durchführung GPC			3. Durchführung GPC		
Ger.-Gl.	y = 1248 x + 608			y = 1248 x + 608			y = 1248 x + 608		
Korrel.-K.	r ² = 0,9429			r ² = 0,9429			r ² = 0,9429		
	Peakfl.	[ng] o.c.	Gehalt [µg kg ⁻¹]	Peakfl.	[ng] o.c.	Gehalt [µg kg ⁻¹]	Peakfl.	[ng] o.c.	Gehalt [µg kg ⁻¹]
	48577	8,33	732,2	46348	7,95	698,9	46289	7,94	698,0
	43513	7,47	656,5	49288	8,45	742,8	42966	7,38	648,4
	47559	8,16	717,0	45083	7,74	680,0	43278	7,43	653,0
Mittelwert			701,9			707,2			666,5
SD			40,0			32,2			27,4
VK [%]			5,7			4,6			4,1

WF über Mittelwerte der 1., 2., und 3. Durchführung [µg kg⁻¹]:Mittelwert **691,9**SD **22,2**

VK [%] 3,2

DTX-1 (LC/MS), Durchführung C (Einwaage 1,0798 g)

	1. Durchführung GPC			2. Durchführung GPC			3. Durchführung GPC		
Ger.-Gl.	y = 1248 x + 608			y = 1248 x + 608			y = 1248 x + 608		
Korrel.-K.	r ² = 0,9429			r ² = 0,9429			r ² = 0,9429		
	Peakfl.	[ng] o.c.	Gehalt [µg kg ⁻¹]	Peakfl.	[ng] o.c.	Gehalt [µg kg ⁻¹]	Peakfl.	[ng] o.c.	Gehalt [µg kg ⁻¹]
	47371	8,13	752,5	46277	7,94	735,3	47571	8,16	755,7
	43066	7,39	684,8	44207	7,59	702,7	45230	7,76	718,8
	44525	7,64	707,7	41543	7,14	660,8	44419	7,62	706,1
Mittelwert			715,0			699,6			726,9
SD			34,5			37,4			25,8
VK [%]			4,8			5,3			3,5

WF über Mittelwerte der 1., 2., und 3. Durchführung [µg kg⁻¹]:Mittelwert **713,8**SD **13,7**

VK [%] 1,9

WF über Mittelwerte der Durchführungen A, B, und C [µg kg⁻¹]:Mittelwert **699,4**SD **12,5**

VK [%] 1,8

Danksagung

Die praktischen Arbeiten für die vorliegende Arbeit wurden in der Zeit von Oktober 1999 bis Juli 2003 am Lehrstuhl Lebensmittelchemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter der Leitung von Prof. Dr. Bernd Luckas durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernd Luckas für das mit der Überlassung des Themas erwiesene große Vertrauen, seine großzügige Unterstützung, sein Engagement für die Schaffung guter Arbeitsbedingungen sowie die vielfältigen Anregungen. Er ermöglichte auch die zahlreichen Dienstreisen zu Tagungen bzw. zu Forschungszwecken, in deren Rahmen zahlreiche Kontakte zu Kollegen im In- und Ausland erst möglich wurden. Diese stellten eine große Bereicherung auch in Form von neuen Denkanstößen sowohl für die Arbeit als auch für die allgemeine Lebenserfahrung dar.

Herrn Dr. Christian Hummert sowie Herrn Prof. Dr. Walter Vetter danke ich für Rat und Hilfe insbesondere in Fragen der Analytik sowie der Massenspektrometrie. Herr Dr. Christian Hummert hat mich bereits während der Diplomarbeit mit LC/MS-Messungen unterstützt und in Jena in die Kopplung von Flüssigchromatographie und Massenspektrometer eingeführt.

Dank schulde ich auch allen derzeitigen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe für die gute Arbeitsatmosphäre und die erwiesene Hilfsbereitschaft. Namentlich nennen möchte ich an dieser Stelle Frau Katrin Erler, Herrn Steffen Ruppe, Frau Elke Jaime und Herrn Dr. Bernd Christian. Ebenfalls danken möchte ich Frau Ramona Ropte und Herrn Diego Rodríguez Cabaleiro für die im Rahmen ihrer Diplomarbeiten erbrachten Leistungen, die Eingang in die vorliegende Arbeit fanden. Besonderer Dank geht an Herrn Jens Dahmann, der mir -nicht nur in fachlicher Hinsicht- mit Rat und Tat stets zur Seite stand.

Dr. Tore Aune, John Aasen und Trine Torgersen (Department of Pharmacology, Microbiology and Food Hygiene, Norwegian School of Veterinary Sciences, Oslo, Norwegen) sowie Herrn Bengt Lundve (Forschungsstation in Kristineberg, Schweden) bin ich zu besonderem Dank für die Überlassung des YTX-Standards bzw. des mit DSP-Toxinen belasteten Materials verpflichtet.

Dr. Gary Stern, Dr. Gregg Tomy und Herrn Wes Budakowski vom Freshwater Institute in Winnipeg, Kanada gilt mein Dank für die Nutzung der apparativen Möglichkeiten und die herzliche Aufnahme während des Forschungsaufenthaltes.

Für die gute Zusammenarbeit innerhalb des EU-Projekts „FATE“ bedanke ich mich bei Frau Dr. Catherine Legrand und Frau Prof. Edna Granéli (Universität Kalmar, Schweden) stellvertretend für alle weiteren Kollegen.

Für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Projekts FATE („Transfer and Fate of Harmful Algal Bloom (HAB) Toxins in European Marine Waters”, FATE (contract no. EVK3-2001-00050), „Fifth European Marine Science and Technology Program“) danke ich der Europäischen Union.

Dank möchte ich auch meinen Freunden aussprechen, die mich durch Ermutigung und gedanklichen Austausch unterstützt haben.

Frau Angelika Welz danke ich für ihren unermüdlichen Beistand und ihre selbstlose Hilfe, die wesentlich zum Fertigstellen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meiner Familie, insbesondere meiner Mutter und Herrn Manfred Wendt gilt mein größter Dank, denn ohne ihre fortgesetzte Geduld, Unterstützung, Großzügigkeit und Liebe hätte ich diese Aufgabe weder durchführen noch beenden können.

Lebenslauf

Name: Alexander Rühl
Geburtsdatum /-ort: 08.06.1971 in Wehrda
Familienstand: ledig

Schulbildung

Sept. 1977 - Juli 1981 Grundschule Schröck-Bauerbach
Sept. 1981 - Juni 1990 Martin-Luther-Schule Marburg (Gymnasium); Abschluß:
allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Zivildienst

Juli 1990 - Sept. 1991 Klinikum der Philipps-Universität Marburg

Hochschulstudien

Okt. 1991 - Mai 1999 Studiengang Diplom-Chemie an der Carl-v.-Ossietsky-
Universität Oldenburg; Diplomarbeit: "Okadaic acid in
Dinophysis species from the Baltic Sea – analytical aspects" in
Zusammenarbeit mit der Universität Kalmar, Schweden.
Sommersemester 1997 Auslandsstudium an der Universität Kalmar, Schweden

Postgraduale Ausbildung

Oktober 1999 Beginn der Arbeiten an der Dissertation am Lehrstuhl
Lebensmittelchemie unter der Leitung von Prof. Dr. Bernd
Luckas, Institut für Ernährungswissenschaften der Friedrich-
Schiller-Universität Jena
August – Oktober 2002 Forschungsaufenthalt am Freshwater Institute, Winnipeg, Kanada

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, 27. Januar 2004

Alexander Rühl

Erklärung zur Bewerbung

Hiermit gebe ich mein Ehrenwort, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller Universität Jena bekannt ist. Mit der vorliegenden Arbeit habe ich mich an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) beworben. Ich habe weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des o.g. akademischen Grades an einer anderen Hochschule beantragt.

Jena, 27. Januar 2004

Alexander Rühl