

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Biologisch-Pharmazeutische Fakultät

Institut für Ernährungswissenschaften

Lehrstuhl Lebensmittelchemie



Dissertation

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

**Entwicklung von chromatographischen Analyseverfahren
zur Bestimmung von Neurotoxinen aus Lebensmitteln
mariner Herkunft.**

Vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl. troph. Marc Diener

geboren am 26.07.1979 in Zeitz

Gutachter

1. Prof. Dr. Bernd Luckas (Friedrich-Schiller-Universität Jena, Deutschland)
2. Prof. Dr. Gerhard Scriba (Friedrich-Schiller-Universität Jena, Deutschland)
3. Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk (TU-Kaiserslautern, Deutschland)

Inhaltsverzeichnis

I.	Abbildungsverzeichnis	III
II.	Abkürzungsverzeichnis	IV
1.	Einleitung	1
1.1.	Paralytic Shellfish poisoning-Toxine.....	2
1.1.1.	Produzenten sowie Verbreitung	3
1.1.2.	Struktur und Wirkmechanismus	2
1.1.3.	Bestimmung	5
1.2.	Tetrodotoxin und seine Analoga	8
1.2.1.	Produzenten sowie Verbreitung	8
1.2.2.	Struktur und Wirkmechanismus	8
1.2.3.	Bestimmung	10
1.3.	Zielstellung der Arbeit	12
2.	Übersicht zu den Manuskripten.....	14
3.	Manuskript I.....	17
	Determination of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins in dietary supplements by application of a new HPLC/FD method <i>Eur. Food. Res. Technol.</i> 224 , 147-151, 2006	
4.	Manuskript II.....	18
	Application of a new zwitterionic hydrophilic interaction chromatography column for determination of paralytic shellfish poisoning toxins <i>J. Sep. Sci.</i> 30 , 1821-1826, 2007	
5.	Manuskript III	19
	Determination of tetrodotoxin and its analogs in the puffer fish <i>Takifugu ablongus</i> from Bangladesh by hydrophilic interaction chromatography and mass-spectrometric detection <i>Anal. Bioanal. Chem.</i> 389 , 1997–2002, 2007	

6. Gesamtdiskussion	20
7. Zusammenfassung	31
7.1.Zusammenfassung.....	31
7.2.Summary	35
8. Literaturverzeichnis.....	38
9. Eigenständigkeitserklärung	42
10. Lebenslauf	43

I. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Weltweite Verbreitung der PSP-Toxine [4].....	2
Abb. 2 Satellitenbild einer Algenblüte (08.2006).....	3
Abb. 3 Struktur der PSP-Toxine [12]	4
Abb. 4 Struktur von Tetrodotoxin und Analoga	9
Abb. 5 Chromatogramm eines PSP-Standards (GTX 1-4, NEO, dcSTX und STX) [53].....	21
Abb. 6 Verwendete MRM-Übergänge für die jeweiligen PSP-Toxine.....	23
Abb. 7 HILIC-MS/MS Analyse eines PSP-Standards (B 1, C 1/2, GTX 1-4, dcGTX 2/3 NEO, dcSTX und STX) [56].....	25
Abb. 8 HILIC-FLD Analyse eines PSP-Standards (GTX 1-4, dcGTX 2/3 NEO, dcSTX und STX) [56]	26
Abb. 9 HILIC-MS Analyse eines TTX-Standards (11-deoxTTX, anhydroTTX, 4-epiTTX, TTX) [60]	28
Abb. 10 Verwendete MRM-Übergänge und SIM-Massen für TTX und TTXs	29

II. Abkürzungsverzeichnis

anhydroTTX	Anhydrotetrodotoxin
AOAC	Vereinigung der offiziellen analytischen Chemiker, Association of Official Analytical Chemists
dcGTX	Decarbamoylgonyautoxin
dcNEO	Decarbamoylneosaxitoxin
dcSTX	Decarbamoylsaxitoxin
doSTX	Deoxydecarbamoylsaxitoxin
deoxyTTX	Deoxytetrodotoxin
ESI	Elektrosprayionisierung (electro spray ionization)
FAB	schneller Atombeschuss (fast atom bombardment)
FLD	Fluoreszenzdetektion
GC	Gaschromatographie
GTX	Gonyautoxin
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie (hydrophilic interaction chromatography)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
LC	Flüssigkeitschromatographie (liquid chromatography)
LD ₅₀	Letale Dosis, bei der 50% der Versuchstiere sterben
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LOD	Nachweisgrenze (limit of detection)
NP	Normalphasen (normal-phase)
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie (mass spectrometry)
NEO	Neosaxitoxin
PSP	Paralytic Shellfish Poisoning

Q1	Quadrupol 1
Q3	Quadrupol 3
RP	Umkehrphase (reversed-phase)
SIM	Selected Ion Monitoring
STX	Saxitoxin
TIC	Totalionenchromatogramm (total ion chromatogram)
TLC	Dünnschichtchromatographie (thin layer chromatography)
trideoyTTX	Trideoxytetrodotoxin
TTX	Tetrodotoxin
TTXs	Tetrodotoxinanaloga
UV	Ultraviolett
ZIC	Zwitterionisch (zwitter ionic)

1. Einleitung

Das weltweite Auftreten von Vergiftungen nach dem Verzehr von bestimmten Fischen und Meeresfrüchten ist seit langem bekannt. Einer der Hauptverursacher dieser Erkrankungen sind marine Neurotoxine, zu denen die Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)-Toxine gehören. Außerdem verursacht die ebenfalls neurotoxisch wirkende Substanz Tetrodotoxin (TTX) immer wieder Lebensmittelvergiftungen im asiatischen Raum.

PSP-Toxine werden von Phytoplankton gebildet und besonders bei erhöhten Wassertemperaturen und hohen Nährstoffgehalten kann es zur massiven Vermehrung des Phytoplanktons mit Bildung von Algenteppichen kommen [1]. In beiden Fällen stellen diese Substanzen mit ihren stark toxischen Wirkungen ein großes Problem für den Menschen und dessen Umwelt dar. Insbesondere vor dem Hintergrund der globalen Erwärmung, die zu einer weiteren Ausbreitung von Dinoflagellaten und Cyanobakterien in den gemäßigten Breiten führen kann, muss unbedingt eine effektive Kontrolle von Gewässern und Lebensmitteln des aquatischen Bereiches hinsichtlich einer Toxinbelastung erfolgen. Zudem führt die Globalisierung sowie die steigende Reisetätigkeit der Bevölkerung außerdem zu einem vermehrten Verzehr „exotischer“ Lebensmittel wodurch die Gefahr einer Exposition mit den genannten Neurotoxinen erhöht wird.

Für Muscheln und Fischereierzeugnisse sowie Nahrungsergänzungsmittel existieren hinsichtlich einer Belastung mit PSP-Toxinen und TTX strenge und international verbindliche rechtliche Regelungen beziehungsweise Grenzwerte deren Einhaltung überprüft werden muss.

Dabei setzt die Kontrolle von Lebensmitteln hinsichtlich des Vorhandenseins von PSP-Toxinen und TTX eine sensitive und selektive Bestimmung dieser Substanzen mit Hilfe moderner leistungsfähiger Analysemethoden voraus.

1.1. Paralytic Shellfish Poisoning-Toxine

Paralytic Shellfish Poisoning-Toxine, deren bekanntester Vertreter das Saxitoxin (STX) ist, sind potente Neurotoxine. Der Name Saxitoxin leitet sich von der Muschel *Saxidomus giganteus* ab. 1957 wurde aus dieser erstmals STX isoliert [2; 3]. Das Toxin wird dabei nicht von der Muschel selbst produziert, sondern ist lediglich eine Folge der Aufnahme von toxischem Phytoplankton.

1.1.1. Produzenten sowie Verbreitung

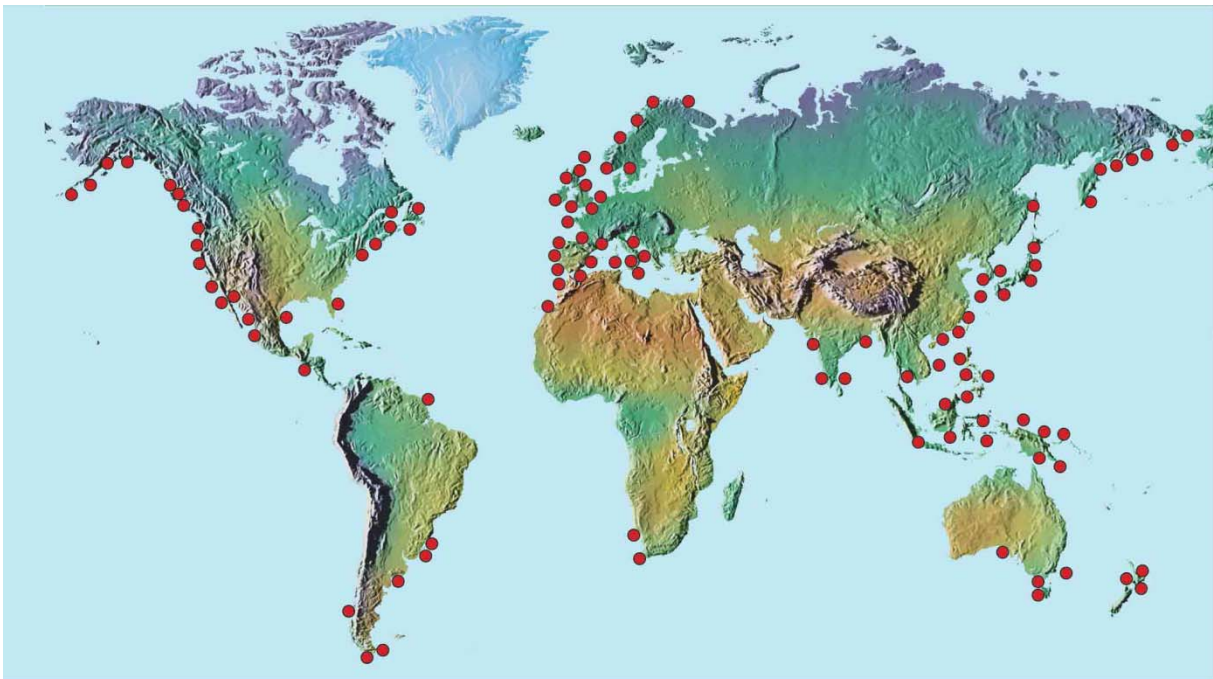


Abb. 1 Weltweite Verbreitung der PSP-Toxine [4]

Vergiftungen, verursacht durch PSP-Toxine, zählen gemessen an der Häufigkeit des Vorkommens und der Schwere zu den wichtigsten Algentoxinvergiftungen weltweit (Abb. 1). Verantwortlich für PSP-Vergiftungen sind einige Dinoflagellaten sowie Cyanobakterien, die das neurotoxische Saxitoxin und verwandte Verbindungen produzieren [5]. Die meisten zur PSP-Toxinsynthese befähigten Algen gehören zu verschiedenen *Alexandrium*-Spezies, die vorwiegend in küstennahen Gewässern gemäßigter Regionen vorkommen. Treten PSP-Intoxikationen in tropischen oder subtropischen Gebieten auf, z.B. im indopazifischen Raum oder in Mittelamerika, dann handelt es sich meistens um Algen der Spezies *Pyrodinium bahamense*. Eine weitere PSP-produzierende Alge, *Gymnodinium catenatum*, kommt vor allem in gemäßigten Klimazonen vor. PSP-Intoxikationen im Zusammenhang mit dieser Spezies sind aus Japan, Tasmanien, den Philippinen, Mexiko, Venezuela sowie der iberischen Atlantikküste bekannt.



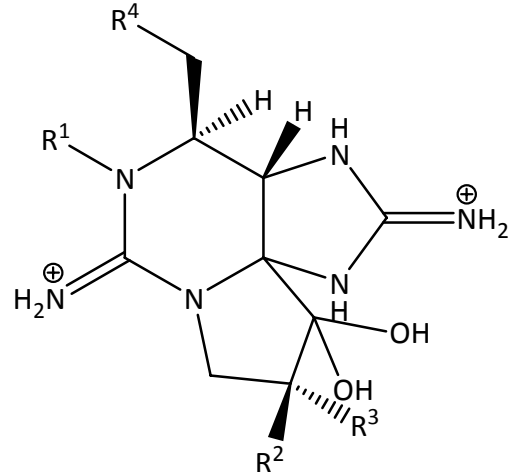
Abb. 2 Satellitenbild einer Algenblüte

Bei den potentiell toxischen Cyanobakterien handelt es sich um die Gattungen *Anabaena*, *Aphanizomenon* und *Cylindrospermopsis*, die im Süß- und Brackwasser heimisch sind [6-8].

Kommt es zu einer sprunghaften Vermehrung dieser toxischen Mikroorganismen, Algenblüten oder „red tides“ genannt, so reichern sich die PSP-Toxine in der marinen Nahrungskette an und gelangen so bis zum Endverbraucher Mensch (Abb. 2). Sie verursachen verschiedenste gastrointestinale und neurologische Krankheiten, teilweise mit tödlichem Ausgang.

1.1.2. Struktur und Wirkmechanismus

PSP-Toxine stellen eine Alkaloid-Familie mit bisher 21 beschriebenen Derivaten dar und leiten sich von Saxitoxin und seinem 1-Hydroxy-Derivat Neosaxitoxin (NEO) ab (Abb. 3). Die sehr polaren PSP-Toxine bestehen aus einem Tetrahydropurin-Grundgerüst mit zwei Guanidinogruppen und unterscheiden sich durch Substitutionen an den verschiedenen Positionen (R^1 - R^4) im Molekül [9]. Entsprechend teilt man sie nach der Funktionalisierung ihrer Seitenketten in Carbamoyltoxine (STX, NEO, Gonyautoxin 1-4 (GTX 1-4)); N-Sulfocarbamoyltoxine (B 1-2, C 1-4); Decarbamoyltoxine (Decarbamoyl-saxitoxin (dcSTX), Decarbamoyl-neosaxitoxin (dcNEO), Decarbamoyl-gonyautoxin 1-4 (dcGTX 1-4)) und Deoxydecarbamoyltoxine (Deoxydecarbamoylsaxitoxin (doSTX), Deoxydecarbamoyl-gonyautoxin 2-3 (doGTX 2-3)) ein [10]. Die zwei Guanidinogruppen im Molekül verfügen über eine positive Ladung. C11-Hydroxysulfongruppen an R^2/R^3 und C21-Sulfongruppen an R^4 reduzieren die Nettoladung um eine Einheit. Befindet sich am Substituent R^4 zusätzlich ein Sulfocarbamoylrest, beträgt die Nettoladung des Toxins null. Die Molekülladung beeinflusst sowohl die chromatographische Trennung wie auch die Toxikologie der PSP-Toxine [11].



Toxin	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Toxizitätsfaktor	[M+H] ⁺
STX	H	H	H		1	300
NEO	OH	H	H		0,92	316
GTX 1	OH	H	OSO ₃ ⁻	H ₂ N-COO (Carbamoyl)	0,99	412
GTX 2	H	H	OSO ₃ ⁻		0,36	396
GTX 3	H	OSO ₃ ⁻	H		0,64	396
GTX 4	OH	OSO ₃ ⁻	H		0,73	412
B 1	H	H	H	SO ₃ ⁻ -HN-COO (N-Sulfocarbamoyl)	0,06	380
B 2	OH	H	H		0,07	396
C 3	OH	H	OSO ₃ ⁻		0,01	492
C 1	H	H	OSO ₃ ⁻		0,01	476
C 2	H	OSO ₃ ⁻	H	OH (Decarbamoyl)	0,1	476
C 4	OH	OSO ₃ ⁻	H		0,06	492
dcSTX	H	H	H	OH (Decarbamoyl)	0,51	257
dcNEO	OH	H	H		keine Angaben	273
dcGTX 1	OH	H	OSO ₃ ⁻		keine Angaben	369
dcGTX 2	H	H	OSO ₃ ⁻		0,65	353
dcGTX 3	H	OSO ₃ ⁻	H	0,75	353	
dcGTX 4	OH	OSO ₃ ⁻	H	keine Angaben	369	
doSTX	H	H	H	H	keine Angaben	241
doNEO	OH	H	H	H	keine Angaben	257
doGTX 1	OH	H	OSO ₃ ⁻	H	keine Angaben	353

Abb. 3 Struktur der PSP-Toxine [12]

Nach erfolgter Akkumulation der PSP-Toxine in Muscheln oder Meeresfrüchten können die PSP-Toxinmuster der Muscheln von dem der Dinoflagellaten oder Cyanobakterien abweichen, da die PSP-Toxine teilweise einer Biotransformation unterliegen. PSP-Toxine, wie GTX 2/3 mit einer 11-Hydroxysulfonsäure, zeigen Keto-Enol-Tautomerie [13]. Es stellt sich ein Gleichgewicht mit einem Verhältnis von ca. 3:1 zugunsten der α-Epimere ein [14]. Die N-Sulfocarbamolytoxine (11-O-Sulfattoxine) unterliegen im sauren pH-Bereich einer

Umwandlung in die entsprechenden Carbamoyltoxine durch Abspaltung der Sulfoniumgruppe. STX ist einer der stabilsten Vertreter der PSP-Toxine und die meist säure- und hitzelabileren N1-Hydroxyverbindungen wie NEO können in dieses Toxin umgewandelt werden [15]. Im Muschelgewebe finden ähnliche Umwandlungen der O-Sulfo- und N-Hydroxyderivate zu STX statt [16]. C-Toxine können im neutralen Milieu zu ihren Decarbamoylderivaten hydrolysiert werden. Selbst die relativ stabilen Carbamoyltoxine werden enzymatisch, durch Abspaltung der Carbamoyl-Gruppe, in Decarbamoyltoxine biotransformiert [17].

PSP-Toxine werden z.B. durch die Darmmukosa aufgenommen und gelangen in den Blutkreislauf. Die Neurotoxine binden reversibel an den Rezeptor der Natriumkanäle in den Nervenzellen und blockieren, durch Unterbrechung des Natriumionenaustausches, die neuronale Signalübertragung. Dies kann zu paralytischen Effekten wie Muskellähmungen oder Atemstillstand führen [18].

Wie bereits erwähnt, haben die Ladungen im Molekül einen Einfluss auf die individuelle toxische Wirksamkeit von jedem PSP-Toxin. Diese verändern die spezifische Bindungsaffinität der jeweiligen PSP-Toxine an die Natriumkanäle und sorgen z.B. im Falle von STX für eine effektivere Bindung an den Rezeptor [19; 20]. Außerdem beeinflussen die Substituenten das Bindungsverhalten der PSP-Toxine. Die Carbamoyltoxine STX und NEO haben die höchste Toxizität und sind 10 - 100-mal toxischer als ihre N-Sulfocarbamoylderivate, wie z.B. die zweifach sulfatierten C-Toxinen, welche die geringste Toxizität aufweisen [9]. Für die Bestimmung der Gesamtoxizität eines mit PSP-Toxinen belasteten Lebensmittels ist es notwendig, diese getrennt zu quantifizieren. Im Anschluss daran werden die ermittelten Konzentrationen für die einzelnen Toxine mit den jeweiligen Toxizitätsfaktoren multipliziert (Abb. 3) [21]. Die Summation der dabei erhaltenen Werte ergibt den Gesamt-PSP-Gehalt ausgedrückt als STX-Äquivalente pro Kilogramm.

1.1.3. Bestimmung

Aufgrund von immer wieder beobachteten schweren Vergiftungen, vor allem nach dem Verzehr von Muscheln, ist es wichtig, dem Verbraucher gesundheitlich unbedenkliche Lebensmittel anzubieten. In der Verordnung über die hygienischen Anforderungen an Fischereierzeugnisse und lebende Muscheln (Fischhygiene-Verordnung) vom 8. Juni 2000 wurden Grenzwerte für lebende Muscheln oder daraus hergestellte Fischereierzeugnisse hinsichtlich einer Kontamination mit PSP-Toxinen in Höhe von 800 µg STX-Äquivalente pro Kilogramm Muschelfleisch festgesetzt. Die Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs bestätigt den oben genannten Grenzwert für PSP-

Toxine, so dass dieser europaweit verbindlich ist und nicht überschritten werden darf. Um jedoch die Einhaltung dieses Grenzwertes kontrollieren zu können, benötigt man robuste und zuverlässige Methoden zur PSP-Bestimmung, wobei der relativ niedrige Grenzwert sehr geringe Nachweisgrenzen des angewendeten Bestimmungsverfahrens erfordert.

PSP-Toxine weisen kein geeignetes Chromophor für die UV- oder Fluoreszenzdetektion (FLD) auf. Daher müssen sie in fluoreszenzaktive Substanzen überführt werden, um anschließend die Reaktionsprodukte mittels Fluoreszenzdetektor analysieren zu können. Neben dem Maus-Bioassay wurde 1975 ein erstes fluorimetrisches Verfahren für PSP-Toxine eingeführt [22; 23]. Dabei wird STX mit Hilfe eines starken Oxidationsmittels, in diesem Fall Wasserstoffperoxid, zu 8-Amino-6-Hydroxymethyl-2-Aminopurin-3-Propionsäure oxidiert. In einem zweiten Schritt wird diese Substanz im sauren Milieu zu fluoreszierendem Pyrimidopurin umgewandelt und kann anschließend fluorimetrisch bestimmt werden. Allerdings wirkt sich die Tatsache, dass die PSP-Toxine mehrere Oxidationsprodukte bilden, bei dieser Reaktion nachteilig aus [24]. Die Überführung der PSP-Toxine in fluoreszenzaktive Verbindungen wird heute als Vorsäulen- oder Nachsäulenderivatisierung durchgeführt. Die Nachsäulenderivatisierung hat den Vorteil, dass die chromatographische Trennung bereits abgeschlossen ist und dadurch auch mehrere Oxidationsprodukte eines PSP-Toxins nach Detektion als gemeinsamer Peak im Chromatogramm erscheinen. Anders bei der offiziellen Analysenmethode für PSP-Toxine 2005.06 der Association of Official Analytical Chemists (AOAC) nach Lawrence *et al.* [25]. Bei dieser findet eine parallele Vorsäulenderivatisierung mit Wasserstoffperoxid als auch mit Periodsäure statt. Mit Periodsäure können, im Gegensatz zur Oxidation mit H₂O₂, die Fluoreszenzausbeuten der nicht am N1 hydroxylierten PSP-Toxine deutlich erhöht werden. Im Anschluss daran werden die Oxidationsprodukte der PSP-Toxine, die unterschiedliche Polaritäten aufweisen, chromatographisch getrennt und im Fluoreszenzdetektor nachgewiesen. Da für ein und dasselbe Toxin mehrere Reaktionsprodukte entstehen, erscheinen im Chromatogramm mehrere Peaks (teilweise 3) unterschiedlicher Intensität. Außerdem ist die HPLC-Trennung mit einer Reihe von Ko-Elutionen (GTX 1/4, GTX 2/3, C 1/2 und C 3/4) verbunden und somit eignen sich die PSP-Bestimmungsverfahren mit Vorsäulenderivatisierung nicht zu Ermittlung der Gesamtoxizität einer Probe. Darüber hinaus sind Verfahren der Vorsäulenderivatisierung zeitintensiv und im Falle der PSP-Toxine die gebildeten Produkte nicht stabil.

Einen Fortschritt im Hinblick auf die chromatographische Trennung der einzelnen PSP-Toxine stellte der Einsatz von Ionenpaarbildnern in der mobilen Phase dar. Beispielsweise setzten Sullivan *et al.* [26] die Alkylsulfonsäuren Hexan- und Heptansulfonsäure zur Trennung der PSP-Toxine ein. Die Oxidation der chromatographisch getrennten PSP-Toxine wurde als Nachsäulenderivatisierung mit Periodsäure durchgeführt. Allerdings war die Bestimmung der PSP-Gesamtoxizität einer Probe aufgrund der Ko-Elution der unterschiedlich toxischen Analyten STX und dcSTX erschwert. Deshalb wurde bei der Methode nach Thielert *et al.* [27] dem Eluenten Oktansulfonsäure zugesetzt und mit einem

zweistufigen Gradienten die Trennung der Carbamoyl-, Decarbamoyl- und N-Sulfocarbamoyltoxine erreicht. Allerdings kam es hier zur Ko-Elution von GTX 1/4. Oshima *et al.* [28] verwendeten verschiedene Konzentrationen an Ionenpaarbildnern um in drei separaten chromatographischen Läufen die PSP-Toxine zu trennen. Die N-Sulfocarbamoyltoxine werden durch den Zusatz von Tetrabutylammoniumphosphat getrennt und die Trennung der Carbamoyl- und Decarbamoyltoxine erfolgt durch die Zugabe von Heptansulfonsäure zum Eluenten. Auch dieses Bestimmungsverfahren ist durch die drei notwendigen separaten HPLC-Trennungen zeit- und kostenintensiv.

Um eine massenspektrometrische Bestimmung der PSP-Toxine zu ermöglichen sind flüchtige Ionenpaarbildner zur Trennung erforderlich. Jedoch sind Alkylsulfonsäuren weder flüchtig noch ist es mit ihnen möglich, auch die negativ geladenen C-Toxine zusammen mit den anderen positiv geladenen PSP-Toxinen in einen chromatographischen Lauf zu analysieren [29]. Zur direkten Kopplung einer HPLC-Apparatur mit einem Massenspektrometer wurden deshalb andere Trennverfahren mit neuen stationären Phasen, hinsichtlich ihrer Eignung zur vollständigen Trennung der PSP-Toxine, vorgeschlagen. So setzten Jaime *et al.* [30] Ionenaustauscher zur Trennung der PSP-Toxine ein. Der Eluent enthielt Ammoniumacetat, jedoch in so hohen Konzentrationen, dass die damit verbundene Ionensuppression zu schlechten Nachweisgrenzen (LODs) bei der MS-Detektion führte.

Eine Lösung dieses Problems wurde durch Einsatz der Hydrophilen Interaktionschromatographie (hydrophilic interaction chromatography, HILIC) erreicht. Die Methode nach Dell'Aversano *et al.* [31] verwendet einen niedrig konzentrierten Ammoniumformiat-Puffer in der mobilen Phasen, so dass deutlich niedrigere LODs bei der MS/MS-Detektion erreicht werden. Die Trennung der Toxine ist allerdings unvollständig und verhindert somit die PSP-Bestimmung mit Nachsäulenderivatisierung und anschließender Fluoreszenzdetektion. Außerdem kommt es unter Matrixeinfluss zu Schwankungen bei den Retentionszeiten der einzelnen PSP-Toxine.

Diese Schwierigkeiten konnten erst nach dem Einsatz einer neuen zwitterionischen (ZIC)-HILIC Säule überwunden werden.

1.2. Tetrodotoxin und seine Analoga

Tetrodotoxin und seine Analoga (TTXs), ebenfalls Neurotoxine, sind weit verbreitet, sowohl in marinen als auch in terrestrisch lebenden Organismen [32]. Diese Neurotoxine sind hauptsächlich als Verursacher von Vergiftungen bekannt, die in Zusammenhang mit dem Verzehr von Kugelfischen auftreten. Insbesondere in Japan, wo Kugelfisch als Delikatesse bekannt ist, kommt es häufiger zu Vergiftungen mit meist tödlichem Ausgang.

1.2.1. Produzenten sowie Verbreitung

TTX und seine Analoga werden von Bakterien der Gattung *Pseudomonas*, *Bacillus* und *Vibrio* produziert [33]. Kugelfische (*Tetraodontidae*) gelten heute als bekannteste Vertreter, die TTX-Intoxikationen hervorrufen. Neben den Kugelfischen enthalten auch Igelfische (*Diodontidae*) und Spitzkopfkugelfische (*Canthigasteridae*) das Neurotoxin [34]. Die meisten dieser Arten leben bevorzugt in den warmen und tropischen Meeren zwischen jeweils 47° nördlicher und südlicher Breite, meist in Küstennähe oder an Korallenriffen. TTX ist im gesamten Fischorganismus zu finden, die höchsten Giftkonzentrationen werden allerdings in der Haut, der Leber und den Gonaden/Ovarien detektiert. Die Konzentration des Toxins unterliegt jahreszeitlichen Schwankungen und ist abhängig vom Fanggebiet der Fische. Im Salz- und Brackwasser gibt es eine Reihe weiterer Lebewesen, z.B. Meeresschnecken und Tintenfische, die ebenfalls TTX-Vergiftungen verursachen können [35; 36].

Vertreter des Süßwassers sowie am Land lebende Tiere sind hauptsächlich den Amphibien zuzuordnen. Frösche, wie der im brasilianischen Atlantikwald lebende gelbe Frosch (*Brachycephalus ephippium*) sowie einige Lurche, z.B. der rot gepunktete Molch (*Notophthalmus viridescens*), enthalten ebenfalls TTX bzw. verwandte Strukturen [37-40].

1.2.2. Struktur und Wirkmechanismus

Die Struktur von TTX wurde 1964 von Goto *et al.* aufgeklärt und das Racemat erstmals 1972 von Kishi *et al.* 1972 synthetisiert [41; 42].

Bei TTX und TTXs handelt es sich um Aminoperhydroxychinazolin-Derivate, die als Zwitterionen vorliegen, und deren Polarität vergleichbar ist mit STX. TTX enthält allerdings

nur eine positiv geladene Guanidinogruppe, wobei das Kation resonanzstabilisiert ist. (Abb. 4) [43; 44].

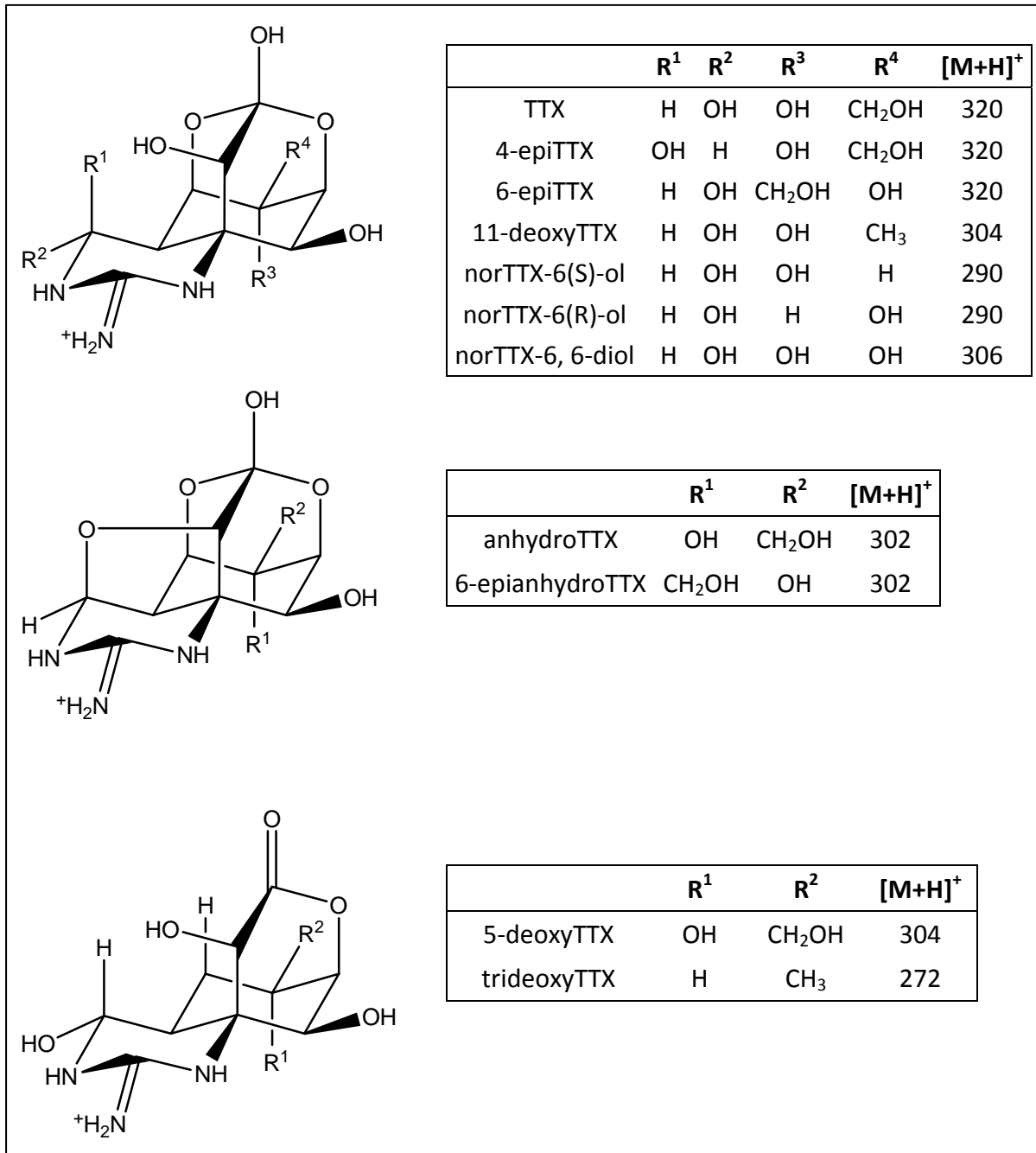


Abb. 4 Struktur von Tetrodotoxin und Analoga

Tetrodotoxin blockiert die spannungsabhängigen Natriumkanäle myelinisierter Neurone [45]. Die Bindung an den Natriumkanalrezeptor erfolgt reversibel, wobei TTX mit seiner Guanidinogruppe das von seiner Hydrathülle umgebene Natriumion imitiert. Dabei gelangt es in die Öffnung des Peptidkomplexes, verschließt diese und bewirkt eine Konformationsänderung des Kanal-Proteins, die in einer noch festeren Bindung von TTX im

Kanal resultiert. Ferner wird das Molekül elektrostatisch an die Öffnung des Natriumkanals fixiert [46]. Durch das Ausbleiben der Aktionspotentiale wird die Nerven- und Muskelerregung unterbunden. Daraus folgen motorische und sensible Lähmungen. Der Wirkmechanismus ist ähnlich wie beim Saxitoxin. Die Toxizitäten der verschiedenen TTX Analoga sind dabei stark unterschiedlich. So handelt es sich bei 5-deoxyTTX, trideoxyTTX und anhydroTTX um nicht toxische Analoga [47]. Während TTX und seine epi-Formen mit einer LD₅₀ von 8-20 µg/kg bei oraler Aufnahme und 8 µg/kg bei intravenöser Gabe stark toxisch sind. Das Toxin kann oral, inhalativ und dermal aufgenommen werden. In der neurologischen Forschung wird Tetrodotoxin deshalb häufig verwendet, um als Inhibitor selektiv Natriumkanäle zu blockieren.

1.2.3. Bestimmung

Um Intoxikation mit TTX und TTXs auszuschließen, benötigt man zuverlässige Bestimmungsmethoden. Die hohe Toxizität der Toxine erfordert dabei sehr niedrige Nachweisgrenzen der Analysemethoden. Somit sind eine eindeutige Identifikation sowie eine exakte Quantifizierung von TTX und TTXs sehr wichtig für die Lebensmittelüberwachung aber auch für pharmakologische Studien mit diesen Substanzen.

Der Maus-Bioassay stellt, wie bei vielen anderen marinen Toxinen, das Standardverfahren zur Toxizitätsbestimmung dar. Mit diesem Test kann aber nicht zwischen PSP-Toxin- und TTX-Vergiftungen unterschieden werden, da beide Gruppen von Neurotoxinen ähnliche Wirkungen aufweisen. Der Mangel an Spezifität und ethische Bedenken bezüglich der Tierversuche führten zur Entwicklung chemischer Analysemethoden [48].

Anfangs wurden chromatographische Methoden mit Nachsäulenderivatisierung in Kombination mit einer Fluoreszenzdetektion entwickelt. Bei der Methode nach Yasumoto *et al.* [49] wird TTX auf einer Umkehrphasen (reversed-phase (RP)) Säule unter Einsatz des Ionenpaarbildners Ammoniumheptafluorobutyrat getrennt. Anschließend werden die Substanzen im stark alkalischen Milieu, bei gleichzeitiger Erhitzung, in fluoreszenzaktive Substanzen überführt und mittels Fluoreszenzdetektor bestimmt. Allerdings gibt es Schwierigkeiten bei Identifizierung und Quantifizierung, da sich die Fluoreszenzintensitäten einiger TTXs stark unterscheiden. Vor allem 5-deoxyTTX und 11-deoxyTTX weisen nur 5 % bzw. 1 % der Fluoreszenzintensität im Vergleich zum TTX auf, während 11-norTTX und 6-epiTTX eine um den Faktor 10 bzw. 20 höhere Fluoreszenzintensität als TTX aufweisen [50].

Parallel dazu wurden eine Reihe weiterer Methoden zur Detektion von TTX entwickelt. Suenaga *et al.* [51] derivatisierten TTX mittels TMS und nutzten anschließend die Kombination aus Gaschromatographie (GC) und MS-Kopplung zur Bestimmung von TTX.

Nagashima *et al.* [52] nutzten die Dünnschichtchromatographie (TLC) in Verbindung mit fast atom bombardment (FAB) MS-Detektion zum Nachweis von TTX.

Neuere Methoden verwenden die Kombination aus chromatographischer Trennung und massenspektrometrischer Detektion zur eindeutigen Quantifizierung von Tetrodotoxin und seinen Analoga über charakteristische Fragmentierungsmuster. Shojij *et al.* [50] benutzt zur chromatographischen Trennung eine RP-Säule (C₃₀) bei gleichzeitigem Zusatz des Ionenpaarbildners Ammonium-heptafluorobutyrat zum Eluenten.

Aus diesem Grund wurde bei der Detektion von TTX und seinen Analoga auf HPLC Methoden mit MS-Kopplung gesetzt, denn hier ermöglichen die Kombination aus hoher Trennleistung und guter Detektionslimits eine eindeutige Quantifizierung von TTX [39; 50].

1.3. Zielstellung der Arbeit

Die eindeutige Identifizierung und quantitative Bestimmung der marinen Neurotoxine, PSP-Toxine sowie TTXs, aus unterschiedlichen Matrices ist hinsichtlich der Einhaltung von Grenz- und Richtwerten zum Schutz der Gesundheit des Menschen von großer Bedeutung. Steigender Welthandel mit „Seafood“ sowie die globale Klimaerwärmung werden zukünftig eher zu einer Zunahme an Vergiftungsfällen führen und machen es notwendig, mit zuverlässigen Methoden die Toxine zu erkennen, um Intoxikationen auszuschließen. Zusätzlich hat das vermehrte Auftreten von Algenblüten, auch in den gemäßigten Breiten zur Folge, dass mehr Muschelbänke kontaminiert werden, wodurch eine verstärkte Kontrolle des Vorkommens lebensmittelrechtlich relevanter PSP-Toxine in marinen Regionen dringend erforderlich ist. Hierbei könnte der Einsatz der HILIC-Chromatographie durch den Wegfall der Ionenpaarbildner die Ionisierung der Proben verbessern und somit die LODs herabsetzen. Da Tetrodotoxin sowohl in seiner physiologischen Wirkung als auch in den physikochemischen Eigenschaften dem STX sehr ähnlich ist, sollte bei dem chromatographischen Trennverfahren für TTX eine ZIC-HILIC Säule eingesetzt werden.

Vor diesem Hintergrund sollten für die Bestimmung der PSP-Toxine sowie des Tetrodotoxins und seiner Analoga folgende analytische Ziele erreicht werden.

- (1) Optimierung des Verfahrens nach Thielert *et al.* [27] zur Detektion der säurestabilen PSP-Toxine um die Bestimmung der rechtlich relevanten Toxine im Routinebetrieb der Lebensmittelkontrolle schnell und eindeutig durchführen zu können. Dabei sollten sowohl die Trennung der einzelnen Toxine verbessert als auch gleichzeitig die LODs der Fluoreszenzdetektion erniedrigt werden. Die aus den Optimierungen resultierende robuste neue HPLC-FLD Methode sollte dann mit verschiedenen komplexen Matrices, wie Muscheln und Phytoplankton, im Hinblick auf ihre Praxistauglichkeit überprüft werden.
- (2) Entwicklung einer neuen LC-MS/MS Methode zur simultanen Bestimmung und Quantifizierung aller PSP-Toxine (N-Sulfocarbamoyl-, Carbamoyl- und Decarbamoyltoxine). Die meisten aktuellen HPLC-Verfahren zur Trennung der PSP-Toxine mit Hilfe der Ionenaustausch- bzw. Ionenpaarchromatographie verhindern eine direkte Kopplung der HPLC-Apparatur mit dem Massenspektrometer. Aus diesem Grund sollte die Hydrophile Interaktionschromatographie zum Einsatz kommen. Stabile Retentionszeiten sollten dabei durch den Einsatz der neuartigen ZIC-HILIC Säule gewährleistet werden.

- (3) Anpassung des neuen HILIC-Trennverfahrens zur MS-Bestimmung der PSP-Toxine an die Kombination aus HPLC, Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion zur Quantifizierung der regulatorisch relevanten PSP-Toxine. Somit sollte die ZIC-HILIC Säule zur PSP-Bestimmung sowohl durch LC-FLD und Nachsäulenderivatisierung als auch in der LC-MS/MS Kopplung einsetzbar sein. Dies soll eine kostengünstige Überwachung von Lebensmitteln mariner Herkunft bzgl. ihrer PSP-Gehalte auch in Ländern mit relativ einfacher Laborausstattung ermöglichen.

- (4) Entwicklung einer LC-MS/MS Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von TTX und seinen Analoga. Da es sich bei TTX und TTXs ebenso wie bei den PSP-Toxinen um sehr polare Verbindungen handelt, sollte zur TTX-Trennung ebenfalls die Hydrophile Interaktionschromatographie zum Einsatz kommen. Das ist auch unter dem Aspekt vorteilhaft, dass sowohl TTX als auch PSP-Toxine in gleichen Organismen, z.B. einigen Kugelfischarten, vorzufinden sind und sich hinsichtlich der Wirkungsweise und Toxizität kaum unterscheiden. Außerdem war im Bezug auf den routinemäßigen Einsatz der Analysemethoden zur Erfassung beider Toxinklassen eine effektive gemeinsame Extraktion der Toxine vor ihrer selektiven Bestimmung wünschenswert. Die Verwendung des gleichen Säulenmaterials sowie ähnlicher mobiler Phasen soll die einfache Quantifizierung beider Neurotoxine in ein und demselben Analyselabor ermöglichen.

2. Übersicht zu den Manuskripten

Manuskript I

Determination of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins in dietary supplements by application of a new HPLC/FD method

Diener, M., Erler, K., Hiller, S., Christian, B., Luckas, B.

Eur. Food. Res. Technol. **224**, 147-151, 2006

Einige Algen sowie gewisse Spezies von Cyanobakterien sind in der Lage PSP-Toxine zu biosynthetisieren. Die zunehmende Bedeutung von Algenprodukten als Nahrungsergänzungsmittel oder als sinnvolle Erweiterung des Speiseplans macht es erforderlich, diese Produkte auch auf gesundheitsgefährdende Substanzen hin zu untersuchen. Die vorgestellte HPLC-Methode mit Nachsäulenderivatisierung sowie Fluoreszenzdetektion erlaubt die eindeutige Bestimmung dieser Substanzen in verschiedenen Matrices bei gleichzeitig verbesserter Empfindlichkeit der Detektion im Vergleich zu bestehenden Methoden.

Arbeitsanteile gemäß Autorenvereinbarung

Marc Diener:

Erstellung des Manuskriptes, Entwicklung der Methode sowie Durchführung der Messungen

Katrin Erler:

Entwicklung der Methode sowie Durchführung der Messungen

Susann Hiller, Bernd Christian und Bernd Luckas:

Überarbeitung des Manuskriptes

Manuskript II

Application of a new zwitterionic hydrophilic interaction chromatography column for determination of paralytic shellfish poisoning toxins

Diener, M., Erler, K., Christian, B., Luckas, B.

J. Sep. Sci. **30**, 1821-1826, 2007

Eine neue Methode zur Bestimmung von PSP-Toxinen, basierend auf deren chromatographischer Trennung unter Verwendung einer neuen zwitterionischen (ZIC)-HILIC Säule, wird präsentiert. Die effiziente Trennung der polaren Toxine mittels der ZIC-HILIC Säule ermöglicht eine selektive und sensitive Bestimmung mittels Massenspektrometrie. Gleichzeitig ermöglicht dieses Trennverfahren die Bestimmung der PSP-Toxine unter Anwendung von Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion. Die geringe Pufferkonzentration sowie das Fehlen von Ionenpaarbildner in der mobilen Phase senken die Nachweisgrenze für die MS/MS-Bestimmung der Substanzen. Die vorgestellte Methode eignet sich sowohl für die qualitative und quantitative Bestimmung von PSP-Toxinen in verschiedenen Arten von Phytoplankton, als auch zur Routineanalyse von Fisch und Meeresfrüchten.

Arbeitsanteile gemäß Autorenvereinbarung

Marc Diener:

Erstellung des Manuskriptes, Entwicklung der Methode sowie Durchführung der Messungen

Katrin Erler, Bernd Christian und Bernd Luckas:

Überarbeitung des Manuskriptes

Manuskript III

Determination of tetrodotoxin and its analogs in the puffer fish *Takifugu ablongus* from Bangladesh by hydrophilic interaction chromatography and mass-spectrometric detection

Diener, M., Christian, B., Ahmed, M.S., Luckas, B.

Anal. Bioanal. Chem. **389**, 1997–2002, 2007

Eine zunehmende Anzahl an Vergiftungserscheinungen, z.B. in Bangladesch nach dem Verzehr von Kugelfisch, macht es erforderlich Tetrodotoxin und seine Analoga zuverlässig und mit hoher Empfindlichkeit zu bestimmen. Die vorliegende Publikation beschreibt die Identifizierung und Quantifizierung von TTX mittels der Hydrophilen Interaktionschromatographie und MS/MS-Detektion. Zur Überprüfung des Analyseverfahrens wurden verschiedene Kompartimente des Kugelfisches aus der betroffenen Region untersucht und zum Vergleich der Toxizität ebenfalls ein Maus-Bioassay durchgeführt.

Arbeitsanteile gemäß Autorenvereinbarung

Marc Diener:

Erstellung des Manuskriptes, Entwicklung der Methode sowie Durchführung der HPLC-MS/MS Messungen

Md Sagir Ahmed:

Durchführung der biologischen Tests, Bereitstellung der Proben

Bernd Christian und Bernd Luckas:

Überarbeitung des Manuskriptes

3. Manuskript I

Determination of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins in dietary supplements by application of a new HPLC/FD method

Diener, M., Erler, K., Hiller, S., Christian, B., Luckas, B.

Eur. Food. Res. Technol. **224**, 147-151, 2006

Accepted: 21 February 2006

Institut für Ernährungswissenschaft,
LS Lebensmittelchemie
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Dornburger Str. 25,
D-07743 Jena, Germany

Korrespondierende Autoren:

Marc Diener
E-Mail: Marc.Diener@uni-jena.de
Tel.: +49-36-41-94-96-55
Fax: +49-36-41-94-96-52

Bernd Christian
E-Mail: Bernd.Christian@uni-jena.de
Tel.: +49-36-41-94-96-54
Fax: +49-36-41-94-96-52

Marc Diener · Katrin Erler · Susann Hiller ·
Bernd Christian · Bernd Luckas

Determination of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins in dietary supplements by application of a new HPLC/FD method

Received: 13 October 2005 / Revised: 15 February 2006 / Accepted: 21 February 2006 / Published online: 14 March 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract Over the past years the importance of food additives and the development of so-called novel food increased permanently. Especially, the application of dietary supplements was on the rise. Then, more and more new products based on plants hitherto not used for human consumption were launched. Algae products containing valuable amounts of essential nutrients such as amino acids and trace elements play a decisive role. On the other hand, some algae including the blue-green algae (cyanobacteria) are capable of synthesizing harmful substances depending on species and provenience. Therefore, methods must be available to evaluate possible risks caused by toxins in algae-based dietary supplements. There are different groups of toxins related to marine algae and cyanobacteria. However, both marine algae and cyanobacteria are able to produce Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins which are potential neurotoxins. Hence, analytical methods for PSP determination have to be developed. The method for PSP toxin determination described below is based on ion-pair chromatography of the underivatized PSP toxins followed by post-column oxidation and fluorescence detection (FD). The determination of very low amounts of PSP toxins in different matrices of novel food is possible. In addition, the method allows to compare PSP profiles of various algae-based dietary supplements.

Keywords PSP toxins · Ion-pair chromatography · Dietary supplements · HPLC with fluorescence detection · Post-column derivatization · Food control

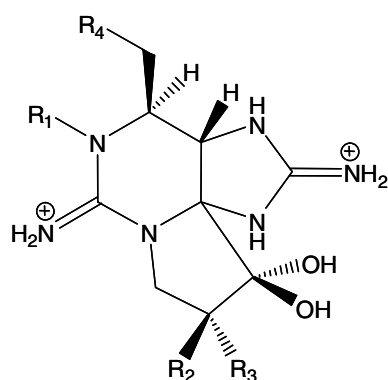
M. Diener (✉) · K. Erler · S. Hiller · B. Christian (✉) ·
B. Luckas
Department of Food Chemistry, Institute of Nutrition,
University of Jena,
Dornburger Str. 25,
D-07743 Jena, Germany
email: Marc.Diener@uni-jena.de
Tel.: +49-36-41-94-96-55
Fax: +49-36-41-94-96-52
e-mail: Bernd.Christian@uni-jena.de
Tel.: +49-36-41-94-96-54
Fax: +49-36-41-94-96-52

Introduction

Paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins (Fig. 1) induce dangerous intoxications by acting as potent sodium channel blockers. As a consequence of this reversible inhibition of the voltage-activated channels the toxins cause paralytic symptoms such as respiratory insufficiency and they can lead to death [1, 2].

PSP toxins are biosynthesized by marine dinoflagellates of the genus *Alexandrium*, *Gymnodium* and *Pyridinium* [3]. In addition, some freshwater cyanobacteria such as *Aphanizomenon flos-aquae*, *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Anabaena circinalis* can produce PSP toxins, too. As a consequence marine algae and cyanobacteria, e.g. *Aphanizomenon flos-aquae* (Afa) algae from Klamath Lake, Canada, and dried marine organisms used as dietary supplements or as raw materials for nutraceuticals may contain PSP toxins. Therefore, methods for PSP analyses must be available to control this novel food [4–6].

Normally, the AOAC mouse bioassay is used for routine analysis of PSP toxins [7], whereby that biological test only allows the determination of the total toxicity of sample material. In addition, there is a lack of sensitivity if the PSP toxins are present in very low concentrations. For this reason, chemical methods based on ion-pair chromatographic separation and post-column derivatization of the toxins prior to fluorescence detection are often applied for the analysis of PSP toxins. However, these HPLC/FD methods are either time consuming or the separation efficiency is insufficient. HPLC methods with ion-pair reagents and phosphate buffer prior to post-column derivatization have been developed [8]. The method according to Oshima et al. [9] requires three separate isocratic runs to analyze most of the PSP toxins and necessitate much time and labour capacity. On the other hand, methods based on Sullivan et al. [10] with gradient elution enable the determination of NEO, dcSTX, STX and GTX 2/3 by one chromatographic run, but the separation of GTX 1/4 is difficult. As a consequence, the development of a new method allowing complete separation of all relevant PSP toxins using one



Toxin	R1	R2	R3	R4	Toxicity factor [11]	Molecular weight
STX	H	H	H		1	301
NEO	OH	H	H		0,92	317
GTX I	OH	H	OSO ₃ ⁻	H ₂ N-COO	0,99	412
GTX II	H	H	OSO ₃ ⁻	(Carbamoyl-)	0,36	396
GTX III	H	OSO ₃ ⁻	H		0,64	396
GTX IV	OH	OSO ₃ ⁻	H		0,73	412
B1	H	H	H		0,06	380
B2	OH	H	H		no data	396
C3	OH	H	OSO ₃ ⁻	O ₃ S-NH-COO	0,01	492
C1	H	H	OSO ₃ ⁻	(N-Sulfo-	< 0,01	476
C2	H	OSO ₃ ⁻	H	carbamoyl-)	0,10	476
C4	OH	OSO ₃ ⁻	H		0,06	492
dc-STX	H	H	H		0,51	258
dc-NEO	OH	H	H		no data	274
dc-GTX I	OH	H	OSO ₃ ⁻	HO	no data	369
dc-GTX II	H	H	OSO ₃ ⁻	(Decarbamoyl-)	0,65	353
dc-GTX III	H	OSO ₃ ⁻	H		0,75	353
dc-GTX IV	OH	OSO ₃ ⁻	H		no data	369

Fig. 1 Chemical structures of PSP toxins

chromatographic run followed by their exact quantification with high sensitivity was necessary.

Materials and methods

Extraction

For the extraction of PSP toxins from algal biomass or lyophilized material the protocol according to AOAC [7] was applied. Filters with algae cells were homogenized with 1 mL acetic acid (0.03 mol/L) using an ultrasonic probe. The suspension was centrifuged for 10 min (2980 × *g*) and passed through a 0.45 μm nylon filter. Parallely, the same sample material was extracted with 1 mL hydrochloric acid (0.2 mol/L) by applying the identical protocol. These extracts were heated for 10 min and 100 °C. The treatment with HCl causes a conversion of *N*-sulfocarbamoyl toxins into the corresponding carbamoyl toxins. The heated extracts were centrifuged, cleaned by ultrafiltration and aliquots of them were injected directly in the HPLC device.

Chemicals and standards

All solvents used were analytical grade; periodic acid, ortho-phosphoric acid, ammonia and nitric acid were delivered by Merck, Darmstadt (Germany). Acetonitrile, octanesulfonic acid, heptanesulfonic acid and ammonium phosphate were purchased from ACROS Organics, Geel (Belgium). Tetrahydrofuran was ordered from Fisher Scientific, Loughborough, UK.

The water (HPLC-grade) was taken from a Millipore-Q RG Ultra Pure Water System, Millipore, Milford, USA.

Quantitative PSP standards of GTX 1-4, NEO, dcSTX and STX were purchased from National Research Council Canada, Marine Analytical Chemistry Standards Program (NRC-CRM b), Halifax, Nova Scotia, Canada.

Chromatography

The chromatographic determination was carried out with a HPLC apparatus equipped with AS 950 auto sampler, PU 980 pump, and a FP920 fluorescence detector (Jasco, Groß-Umstadt, Germany). A Luna C18(2) 100A (250 mm × 4.6 mm) HPLC column from Phenomenex, Torrance, USA was applied. The separation of the underivatized toxins was performed using two eluents. Eluent A contained 6 mmol/L octanesulfonic acid and heptanesulfonic acid, 40 mmol/L ammonium phosphate and 0.75% tetrahydrofuran (v/v) in water. Eluent B consists of 7 mmol/L octanesulfonic acid and heptanesulfonic acid, 48 mmol/mL ammonium phosphate, 1% tetrahydrofuran (v/v), and 10% acetonitrile (v/v) in water. The pH of both eluents was adjusted to 7 with phosphoric acid (20% (v/v)). The final eluents were degassed in an ultrasonic bath for 15 min. The gradient formation and flow rate used for the chromatographic separation is presented in Table 1.

For post-column oxidation a CRX 400 reacting unit [with TFE Teflon coil, 15 m × 0.3 mm ID (1.0 mL)—Pickering Laboratories, Mountain View, CA, USA] at a temperature of 50 °C was applied. The derivatization was performed using a solution containing 10 mmol/L periodic acid and 550 mmol/L ammonia in water (flow rate 0.3 mL/min). Nitric acid (0.75 mol/L in water; flow rate 0.4 mL/min) was utilized for reducing the pH value to 2–3.

Fluorescence detection was applied for the determination of PSP oxidation products (Ex.: 330 nm; Em.: 395 nm). The HPLC system with post-column derivatization and fluorescence detection unit is shown in Fig. 2.

Table 1 The HPLC gradient program

Time (min)	Flow (mL/min)	A (%)	B (%)
00.0	1.0	100	0
15.0	1.0	100	0
16.0	1.0	0	100
43.0	1.0	0	100
44.0	1.0	100	0
65.0	1.0	100	0

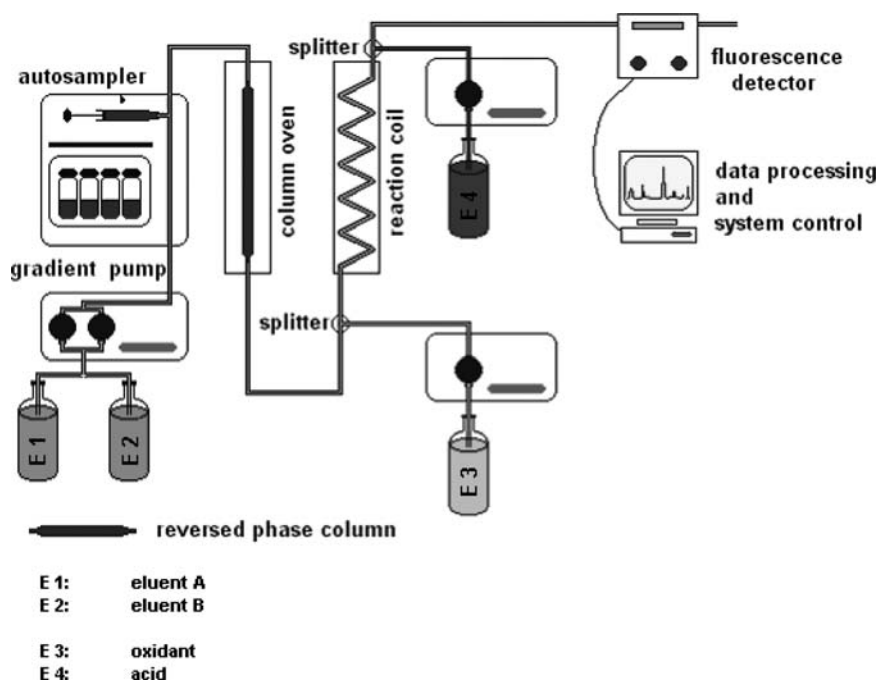


Fig. 2 HPLC device with post-column oxidation and fluorescence detection unit

Calibration

Calibration was performed by injecting standard solutions of different concentrations and determining them thrice. Afterwards, the mean of peak areas for each concentration was plotted and the resulting linear regression curve was calculated. In Table 2 the equations for the regression curves are put down for those experiments. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated by multiplication of the noise with factor five and 10, respectively.

Results and discussion

The method above was developed for an exact quantification of individual PSP toxins present in a sample with regard to international regulations. Therefore, the results obtained by application of chemical methods using the ac-

Table 2 Calibration equation for different amounts of the PSP-toxins

Toxin	Amount on column (ng)	Calibration equation (five data points)	Correlation
GTX1	10.9–87.22	$Y = 7520x$	0.9970
GTX2	0.58–4.67	$Y = 244409x$	0.9938
GTX3	0.19–1.54	$Y = 265182x$	0.9988
GTX4	3.6–28.8	$Y = 8527x$	0.9976
NEO	2.05–16.4	$Y = 22515x$	0.9989
dcSTX	0.79–6.36	$Y = 150002x$	0.9911
STX	0.72–5.75	$Y = 224733x$	0.9977

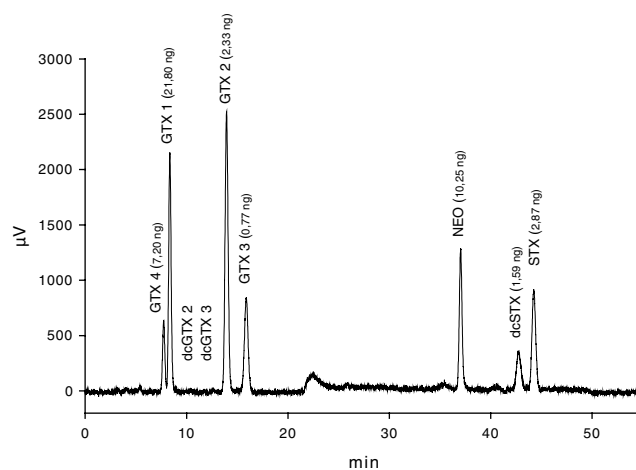


Fig. 3 Chromatogram of a PSP standard mixture containing GTX 1–4, NEO, dcSTX and STX

tual toxicity factors for the PSP toxins of interest (Fig. 1) have to be comparable to the total PSP toxicity determined by mouse bioassay [8].

In order to guarantee comparability of the HPLC/FD results with the results obtained by the mouse bioassay the same extraction protocol according to AOAC must be applied. The use of a two-step isocratic elution with buffers containing two ion-pair reagents allows the separation of all relevant PSP toxins in one chromatographic run. The PSP toxins were eluted in the following sequence GTX 4, GTX 1, dcGTX 2, dcGTX 3, GTX 2, B1, GTX 3, NEO, dcSTX, STX (Figs. 3 and 4). Consequently, the method is well suited for the determination of PSP toxins in biological samples such as algae-based dietary supplements. In addition, the retention times of each PSP toxin were

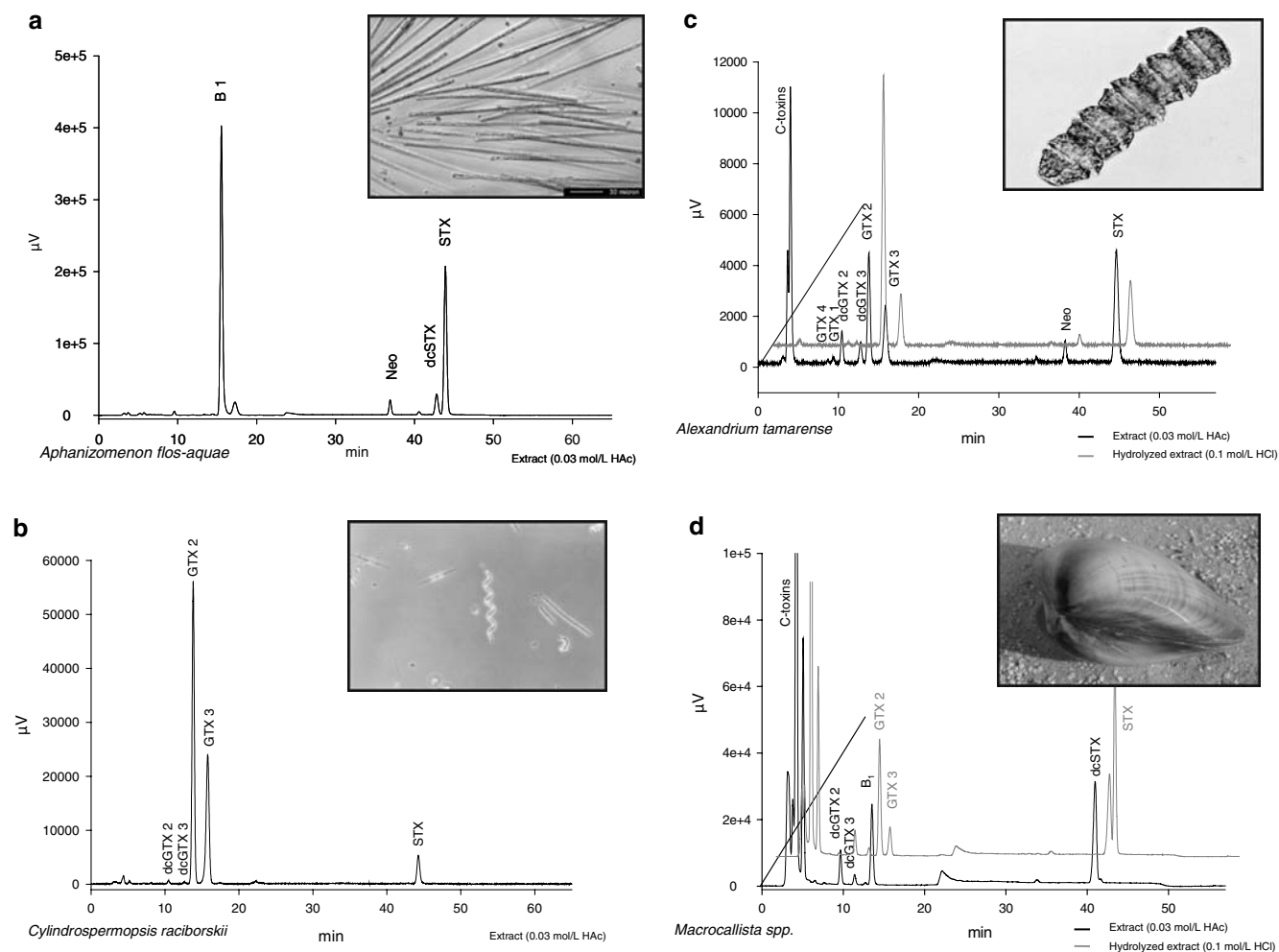


Fig. 4 a Chromatogram of an *Aphanizomenon flos-aquae* extract. b Chromatogram of a *Cyndrospermopsis raciborskii* extract. c Chromatograms of *Alexandrium tamarense* extracts. d Chromatograms of *Macrocallista spp.* extracts

stable for different sample matrices (Fig. 4a–d). The limits of detection (LODs) especially for GTX 2/3, dcSTX and STX (Table 3) are lower in comparison to other HPLC/FD methods [11].

Conclusion

The more perfect determination of the respective PSP toxin concentrations is, the more exactly will be the calculation of

Table 3 LOD (factor five) and LOQ (factor 10) for the different PSP toxins

Toxin	LOD (ng)	LOQ (ng)
GTX1	0.820	1.640
GTX2	0.014	0.028
GTX3	0.015	0.030
GTX4	0.960	1.920
NEO	0.306	0.612
dcSTX	0.060	0.120
STX	0.035	0.070

the total PSP toxicity. This results from the fact that the total PSP toxicity after HPLC separation is obtained by summing up the individual PSP toxicities. Hence, the unambiguous assignment of the peaks in the chromatograms to definite PSP toxins is necessary for a proper quantification of PSP toxins.

The lowering of the detection limits represents an improvement in comparison to other methods for PSP determination. Consequently, this method can also be applied to quantify PSP toxins in dietary supplements.

References

1. Luckas B (1992) Phycotoxins in seafood-toxicological and chromatographic aspects. *J Chromatogr* 624:439–456
2. McFarren EF, Schafer ML, Campbell JE, Lewis KH, Jensen ET, Schantz EJ (1960) Public health significance of paralytic shellfish poison. *Adv Food Res* 10:135–179
3. Steidinger KA (1993) Some taxonomic and biologic aspects of toxic dinoflagellates. In: Falconer IR (ed) *Algal toxins in seafood and drinking water*. Academic, London, pp 1–28

4. Mahmood NA, Carmichael WW (1986) Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *Toxicon* 24:175–186
5. Ferreira FM, Franco Soler JM, Fidalgo ML, Fernandez-Vila P (2001) PSP toxins from *Aphanizomenon flos-aquae* (cyanobacteria) collected in the Crestuma-Lever reservoir (Douro river, northern Portugal). *Toxicon* 39:757–761
6. Carmichael WW, Drapeau C, Anderson DM (2000) Harvesting and quality control of *Aphanizomenon flos-aquae* from Klamath Lake for human dietary use. *J Appl Phycol* 12:585–595
7. Association of Official Analytical Chemists (1990) Official methods of analysis, 15th edn. Arlington, VA, pp 881–882
8. Botana LM (2000) Seafood and freshwater toxins, pharmacology, physiology and detection. Marcel Dekker, New York, Basel
9. Oshima Y (1995) Harmful and toxic algal blooms. *J AOAC Int* 2:528
10. Sullivan JJ, Wekell MM, Kentala LL (1985) Application of HPLC for the determination of PSP toxins in shellfish. *J Food Sci* 50:26–29
11. Luckas B, Hummert C, Oshima Y (2003) Analytical methods for paralytic shellfish poisons. In: Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD (eds.) Manual on harmful marine microalgae. Oceanographic Commission of UNESCO, 7 Place de Fontenoy, 75352 Paris 07 SP, France

4. Manuskript II

Application of a new zwitterionic hydrophilic interaction chromatography column for determination of paralytic shellfish poisoning toxins

Diener, M., Erler, K., Christian, B., Luckas, B.

J. Sep. Sci. **30**, 1821-1826, 2007

Accepted: 12 March 2007

Institut für Ernährungswissenschaft,
LS Lebensmittelchemie
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Dornburger Str. 25,
D-07743 Jena, Germany

Korrespondierender Autor:

Marc Diener
E-Mail: Marc.Diener@uni-jena.de
Tel.: +49-36-41-94-96-55
Fax: +49-36-41-94-96-52

Marc Diener
Katrin Erler
Bernd Christian
Bernd Luckas

Institute for Nutrition,
Department of Food Chemistry,
Friedrich-Schiller-University of
Jena, Dornburger Straße, Jena,
Germany

Original Paper

Application of a new zwitterionic hydrophilic interaction chromatography column for determination of paralytic shellfish poisoning toxins

A novel method for paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins which is based on the chromatographic separation of the toxins using a zwitterionic (ZIC) hydrophilic interaction chromatography (HILIC) column is presented. Efficient retention of the polar PSP toxins on the ZIC-HILIC column allowed their selective and sensitive determination by the application of mass spectrometric (MS/MS) detection or as derivatives after oxidation prior to fluorescence detection (FD). Low buffer concentrations and the omission of ion-pair reagents decreased the limits of detection (LODs) by MS/MS analysis and showed a good linearity for both methods of detection. This method can be applied for the qualitative and quantitative determination of PSP toxins in various types of phytoplankton, and for the routine analysis of seafood.

Keywords: Hydrophilic interaction chromatography / LC-MS/MS / Paralytic shellfish poisoning / Zwitterionic-HILIC column

Received: February 16, 2007; revised: March 8, 2007; accepted: March 12, 2007

DOI 10.1002/jssc.200700025

1 Introduction

Paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins (Fig. 1) are biosynthesized by marine dinoflagellates of the genus *Alexandrium*, *Gymnodinium*, *Pyrodinium*, and some freshwater cyanobacteria like *Aphanizomenon flos-aquae*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Anabaena circinalis*, respectively [1]. These toxins induce dangerous intoxications by acting as potent sodium channel blockers. As a consequence of this reversible inhibition of the voltage-activated channels, those toxins cause paralytic symptoms such as respiratory insufficiency and they can finally lead to death [2]. PSP toxins raise persistent problems due to their accumulation in shellfish. Therefore, efficient methods for PSP analyses have to be established for the control of seafood [3, 4].

Usually, the AOAC mouse bioassay [5] is applied for the routine analysis of PSP toxins. The biological test allows exclusively the determination of the total toxicity of the

sample material. Alternatively, there exist chemical methods based on HPLC separation combined with pre- or postcolumn derivatization and fluorescence detection of the PSP toxins [6]. The method by Lawrence *et al.* [7] with two prechromatographic oxidations (hydrogen peroxide and periodate) of the PSP toxins is a good screening method but it is time consuming and sometimes problematic for a full quantitative test [8]. However, the method with postcolumn derivatization according to Oshima *et al.* [9] requires three separate isocratic runs to analyze PSP toxins. In addition, other methods based on ion-pair chromatography with gradient elution enable the determination of carbamoyl and decarbamoyl toxins by a single chromatographic run, but the *N*-sulfocarbamoyl toxins (*e.g.*, C 1 and C 2) must be analyzed in a separate run after hydrolyzation [10]. Moreover, HPLC methods based on ion-pair chromatography complicate an online coupling to a mass spectrometer due to the ion-pair reagents, which cause suppression effects on the ionization of the PSP toxins [11].

A recently published method based on hydrophilic interaction chromatography (HILIC) using a TSK-gel Amide-80 column separates the PSP toxins in completely; *e.g.*, GTX 1 coelutes with GTX 2. For this reason, the method could be used in combination with MS, but lacks in the combination with a fluorescence detector. Furthermore, inconstant retention times for PSP toxins in different seafood matrices were observed.

Correspondence: Marc Diener, Institute for Nutrition, Department of Food Chemistry, Friedrich-Schiller-University of Jena, Dornburger Straße 25, D-07743 Jena, Germany
E-mail: marc.diener@uni-jena.de
Fax: +49-36-41-94-96-52

Abbreviations: FD, Fluorescence detection; GTX, Gonyautoxin; HILIC, Hydrophilic interaction chromatography; NEO, Neosaxitoxin; PSP, Paralytic shellfish poisoning; SRM, Selected reaction monitoring; STX, Saxitoxin; ZIC, Zwitterionic

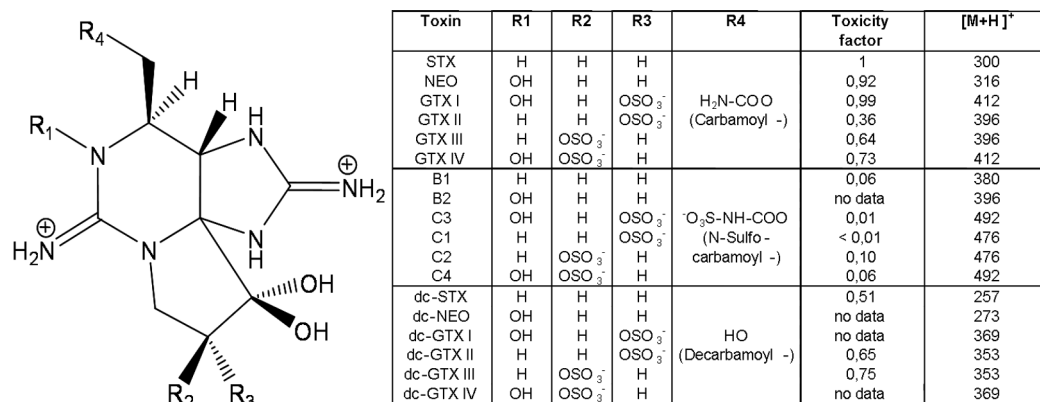


Figure 1. Chemical structure of PSP toxins.

As a consequence, the development of a new method allowing a complete separation of all regulation relevant PSP toxins using one chromatographic run followed by their selective and sensitive quantification by the application of mass spectrometric or fluorometric detection was required.

2 Experimental

2.1 PSP toxin standards

PSP standards of GTX 1–4, decarbamoyl-gonyautoxin (dcGTX) 2/3, *N*-sulfocarbamoyl-GTX 2 and 3 (C 1 and C 2), neosaxitoxin (NEO), saxitoxin (STX), decarbamoyl-saxitoxin (dcSTX), and *N*-sulfocarbamoyl-STX were purchased from National Research Council, Marine Analytical Chemistry Standards Program (NRC-CRM), Institute for Marine Biosciences, Halifax, Nova Scotia, Canada.

2.2 Chemicals

All solvents used were of analytical grade; periodic acid, orthophosphoric acid, ammonia, and nitric acid were delivered by Merck (Darmstadt, Germany). ACN, ammonium formate, and formic acid were purchased from ACROS Organics (Geel, Belgium). Water (HPLC-grade) was obtained from a Millipore-QRG Ultra Pure Water System, Millipore (Milford, USA).

2.3 Extraction

The protocol according to AOAC [5] was applied for the extraction of PSP toxins from shellfish material. The sample material (2 g) was homogenized with 3 mL of hydrochloric acid (0.2 M) using an ultra sonic probe. The extracts were heated for 15 min at 90°C and the suspension was centrifuged (Z 200 MH, Hermle Labortechnik,

Wehingen, Germany) for 10 min (14000 rpm), afterwards the supernatant was passed through a 0.45 µm nylon filter. The treatment with HCl induced a conversion of *N*-sulfocarbamoyl toxins to the corresponding carbamoyl toxins.

For the extraction of the PSP toxins from *Alexandrium catenella* and *Gymnodinium catenatum*, the protocol of Hummert *et al.* [13] was applied. Aqueous acetic acid (2 mL, 0.03 M) was added to a suspension of algae cells (1 mL). The suspension was then homogenized with an ultra sonic probe and centrifuged for 10 min (14000 rpm). The supernatant was passed through a 0.45 µm nylon filter and the extracts obtained were used as a qualitative PSP standard solution during the development and optimization of the HILIC method.

2.4 HILIC with MS detection

LC-MS/MS was performed using the following system: SIL-10ADvp intelligent autosampler, LC-10AT pumps, SCL-10Avp system controller, CTO 10ASvp column oven (Shimadzu, Duisburg, Germany), triple quadrupole API 365 PE Sciex mass spectrometer equipped with a turbo ion spray interface using software analyst 1.4.1 (PE Sciex, Halifax, Canada).

HILIC was operated with Eluent A consisting of 10 mM ammonium formate and 10 mM formic acid in water. Eluent B contained 80% ACN and 20% water with a final concentration of 5 mM ammonium formate and 2 mM formic acid. The chromatographic separation was realized by the application of a 5 µm zwitterionic (ZIC) HILIC column, 250 × 4.6 mm id (SeQuant, Haltern, Germany). Gradient formation applied for HILIC with MS detection is presented in Table 1. The mobile phase, flow 0.7 mL/min, was transferred into ion spray interface using a split ratio of 1:1 and the mass spectrometric detection was carried out in positive mode with an electrospray voltage of

Table 1. HPLC gradient program for HILIC-MS/MS

Time (min)	A (%)	B (%)
0.0	20	80
5.0	35	65
10.0	40	60
20.0	40	60
25.1	20	80
40.0	20	80

Table 2. Recommended SRM parameter for PSP toxin determination by MS/MS

Parameter	Period 1 (0–26.5 min)	Period 2 (26.5–40.0 min)
Nebulizer gas (NEB)	12	12
Curtain gas (CUR)	12	12
Collision gas (CAD)	7	10
Declustering potential (DP)	20	20
Focusing potential (FP)	200	175
Entrance potential (EP)	10	10
Collision energy (CE)	25	25
Collision cell exit potential (CXP)	20	20

5000 V. Data acquisition by selected reaction monitoring (SRM) was split into two time periods (period 1: 0–26.5 min; period 2: 26.5–40.0 min) on the API 365. SRM transitions for HILIC-MS detection of the PSP toxins are presented in Table 2. The turbo ion spray source was operated with nitrogen (8 L/min) as the nebulizer gas at a temperature of 325°C for period 1 and 500°C for period 2, respectively.

2.5 HILIC with fluorescence detection

HPLC with postcolumn derivatization and fluorescence detection for PSP determination based on an HILIC column was performed with SIL-10A intelligent autosampler, LC-10ATvp pump, SCL-10A system controller, CTO-10AC column oven, RF-10Ax1 fluorescence detector using Class-vp 4.3 software (Shimadzu). For postcolumn oxidation a CRX 400 reacting unit with a TFE Teflon coil, 15 m × 0.3 mm id (1.0 mL) (Pickering Laboratories, Mountain View, CA, USA), at a temperature of 50°C and two LC-9A pumps (Shimadzu) were used. Eluent A consisted of 10 mM ammonium formate and 10 mM formic acid in water. Eluent B contained 80% ACN and 20% water v/v with a final concentration of 8 mM ammonium formate. Both eluents were degassed by sonification for 15 min. Gradient formation used for the chromatographic separation and fluorescence detection are presented in Table 3 (flow 0.7 mL/min). The stationary phase was the same as for HILIC with mass spectrometric detection.

Table 3. LC gradient program for HILIC-FD

Time (min)	A (%)	B (%)
0.0	18	82
24.0	18	82
24.1	30	70
35.0	30	70
35.1	35	65
50.0	35	65
55.0	30	70
55.1	18	82
70.0	18	82

Postcolumn oxidation prior to FD was performed using a solution containing 10 mM periodic acid and 550 mM ammonia in water (flow rate 0.3 mL/min). Aqueous nitric acid (0.75 M; flow rate 0.3 mL/min) was utilized to lower the pH value to 2–3. Fluorescence detection with excitation and emission wavelengths of 330 and 395 nm, respectively, was applied for the determination of the oxidized PSP toxins.

3 Results and discussion

A new method was developed for a reliable quantification of the individual PSP toxins present in biological samples with regard to international regulations. To separate the PSP toxins in a single chromatographic run, a ZIC-HILIC column was applied which realized a good separation of all regulation relevant toxins, *i.e.*, the carbamoyl- and decarbamoyl toxins. The mobile phase contained a high percentage of organic solvent and a volatile buffer in low concentration allowing an online mass spectrometric detection. The application of gradient elution with eluents without ion-pair reagents facilitates high sensitivity concerning the MS detection. The PSP toxins were eluted in the following order: GTX 1, GTX 2, C 1, dcGTX 2, GTX 4, GTX 3, dcGTX 3, C 2, B 1, NEO, STX, and dcSTX (Table 4). Hence, the new LC-MS/MS method includes the separation of all three groups of PSP toxins (*N*-sulfocarbamoyl, carbamoyl-, and decarbamoyl toxins) in one chromatographic run (Fig. 2). Furthermore, the modification of the gradient elution resulted in a complete separation of all regulation relevant PSP toxins, present in a 0.2 M hydrochloric acid extract, necessary for fluorescence determination of those toxins (Figs. 2 and 3). In addition, mass spectrometric detection of all regulation relevant PSP toxins using SRM resulted in a more selective detection of the substances and allowed a shorter run time by modification of the gradient elution (40 min by application of mass spectrometric detection instead of 70 min by the fluorescence detection necessary for a more effective separation of the PSP toxins).

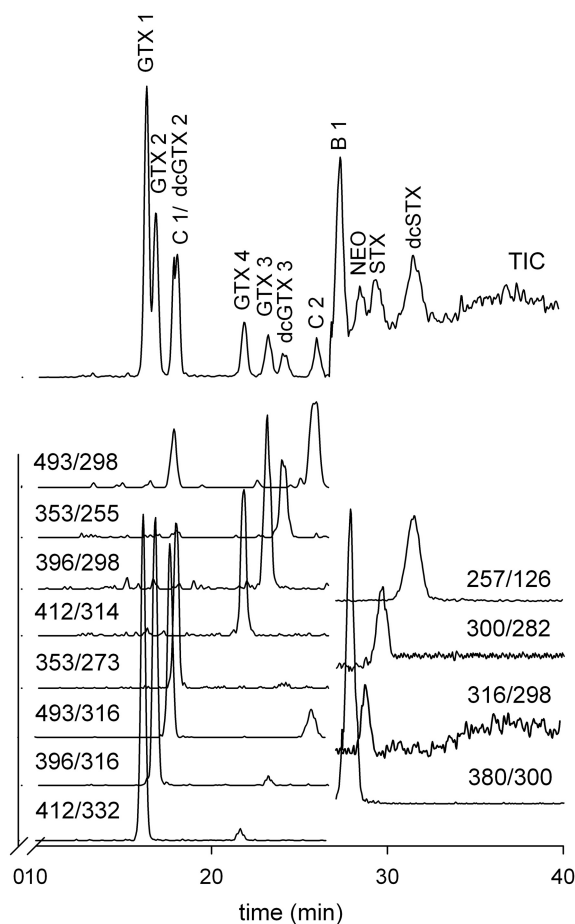


Figure 2. HILIC-MS/MS analysis of the PSP standard mixture 1 containing GTX 1 (6.60 ng), GTX 2 (3.45 ng), dcGTX 2 (3.00 ng), C 1 (4.20 ng), GTX 4 (2.10 ng), GTX 3 (1.16 ng), dcGTX 3 (0.84 ng), NEO (7.65 ng), C 2 (6.00 ng), STX (4.20 ng), B 1 (4.90 ng), and dcSTX (4.80 ng). Experiments for time periods 1 and 2 were carried out in SRM mode.

Five-point calibration curves for both mass spectrometric and fluorometric detection were calculated for GTX 1, GTX 2, dcGTX 2, GTX 4, GTX 3, dcGTX 3, NEO, dcSTX, and STX (for statistic information in detail see Tables 5 and 6). To compare the results obtained by HILIC-MS/MS and HILIC-FD, mixtures of PSP toxin standards were injected. The chromatographic separation using the ZIC-HILIC column in combination with MS/MS and FD detection allowed a quantification of each individual PSP toxin (Figs. 2 and 3). Comparison of MS/MS and FD detection reveals that fluorescence detection shows a higher sensitivity for most of the PSP toxins in general. However, for GTX 1/4 the MS/MS method (SRM mode) is more sensitive. Therefore, both methods of detection are suitable for the determination of PSP toxins in seafood after chromatographic separation, if the extraction is carried out according to the official AOAC protocol [5]. For PSP toxin research, the LC-MS/MS method is the better choice

Table 4. Retention times for different PSP toxins analyzed by HILIC-MS/MS and HILIC-FD

PSP toxins	Retention time (min)	
	HILIC-MS/MS	HILIC-FD
GTX 1	16.2 ± 0.1	27.1 ± 0.1
GTX 2	16.7 ± 0.1	28.6 ± 0.1
C 1	17.7 ± 0.1	33.3 ± 0.1
dcGTX 2	17.9 ± 0.1	32.3 ± 0.1
GTX 4	21.7 ± 0.1	41.8 ± 0.1
GTX 3	23.0 ± 0.1	44.7 ± 0.1
dcGTX 3	24.0 ± 0.1	46.6 ± 0.1
C 2	25.7 ± 0.1	50.4 ± 0.1
B 1	27.1 ± 0.1	52.0 ± 0.1
NEO	28.3 ± 0.1	51.4 ± 0.1
STX	29.2 ± 0.1	53.0 ± 0.1
DcSTX	31.3 ± 0.1	55.9 ± 0.1

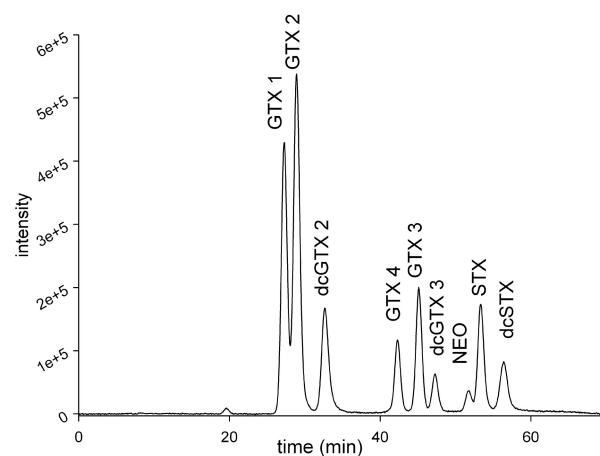


Figure 3. HILIC-FD analysis of the PSP standard mixture 2 containing GTX 1 (10.20 ng), GTX 2 (0.58 ng), dcGTX 2 (0.50 ng), GTX 4 (3.60 ng), GTX 3 (0.20 ng), dcGTX 3 (0.14 ng), NEO (2.05 ng), STX (0.72 ng), and dcSTX (0.79 ng).

because of the possibility to use SRM for identifying rare PSP derivatives.

In order to prove the applicability of the new method for various sample materials, mussel extract spiked with a PSP standard mixture and the marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* were analyzed by the application of the new ZIC-HILIC column and MS/MS detection (SRM mode).

Independent of the sample matrix, mussels or algae, all present PSP toxins could be determined, whereby in the alga *Gymnodinium catenatum*, the PSP toxins C 1/2 and dcGTX 2/3 dominated (Figs. 4 and 5).

To demonstrate the performance of the chromatographic separation using the new ZIC-HILIC column in combination with fluorescence detection for PSP determination from different samples, a mussel extract spiked with a PSP standard mixture and an alga (*A. catenella*)

Table 5. LOD ($S/N = 3$) and equation of calibration curve for different amounts of PSP toxins analyzed by HILIC-MS/MS (SRM mode)

Toxin	$m/z > m/z$	Amount on column (ng)	Calibration equation (five data points)	Correlation	LOD (ng)
GTX 1	412 > 332	4.40–13.20	$y = 2930x + 2230$	0.995	0.10
GTX 2	396 > 316	2.30–6.90	$y = 3610x + 985$	0.995	0.10
GTX 3	396 > 298	0.77–2.31	$y = 3640x - 92$	0.994	0.08
GTX 4	412 > 314	1.40–4.20	$y = 2160x - 600$	0.994	0.10
dcGTX 2	353 > 273	2.00–6.00	$y = 4070x - 1100$	0.999	0.03
dcGTX 3	353 > 255	0.56–3.20	$y = 2330x + 358$	0.990	0.07
NEO	316 > 298	5.13–15.40	$y = 682x + 1820$	0.995	0.60
dcSTX	257 > 126	3.20–9.60	$y = 2930x - 811$	0.997	0.30
STX	300 > 282	2.87–8.61	$y = 1570x + 545$	0.999	0.50

Table 6. LOD ($S/N = 3$) and equation of calibration curve for different amounts of PSP toxins analyzed by HILIC-FD

Toxin	Amount on column (ng)	Calibration equation (five data points)	Correlation	LOD (ng)
GTX 1	10.90–43.61	$y = 247\,972x + 1E + 06$	0.999	0.45
GTX 2	0.58–2.33	$y = 8E + 06x + 278\,303$	0.999	0.04
GTX 3	0.19–0.56	$y = 9E + 06x + 284\,292$	0.996	0.04
GTX 4	3.60–14.40	$y = 214\,721x + 430\,446$	0.992	0.35
dcGTX 2	0.50–2.01	$y = 2E + 06x + 364\,738$	0.998	0.05
dcGTX 3	0.14–0.56	$y = 3E + 06x + 134\,197$	0.988	0.04
NEO	2.05–8.20	$y = 128\,151x + 373\,129$	0.992	0.80
dcSTX	0.79–3.18	$y = 824\,543x - 23\,150$	0.989	0.10
STX	0.72–2.87	$y = 2E+06x + 411\,122$	0.997	0.10

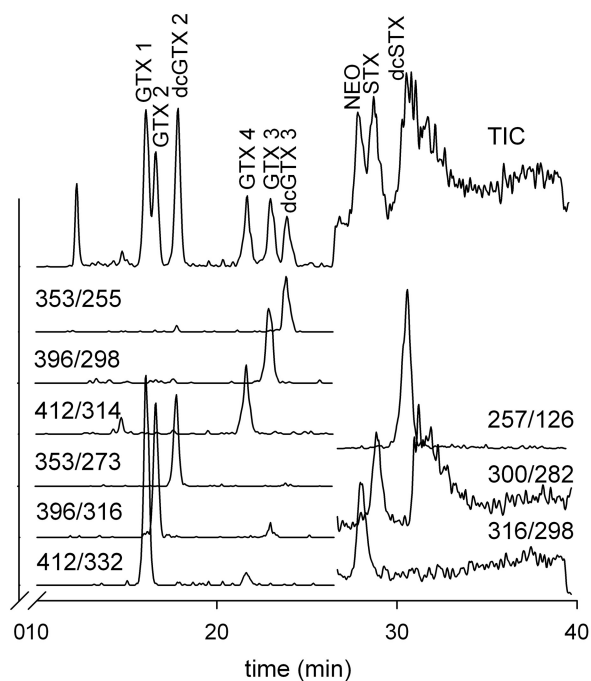


Figure 4. HILIC-MS/MS analysis of a mussel extract (0.2 M HCl) spiked with the PSP standard mixture 2 (1 mussel extract:1 standard – v/v).

were analyzed (Figs. 6 and 7). As shown in Fig. 7, it is also possible to separate C 1 and C 2, present in a 0.03 M HAC extract, using the HILIC-FD detection method. C 1 co-

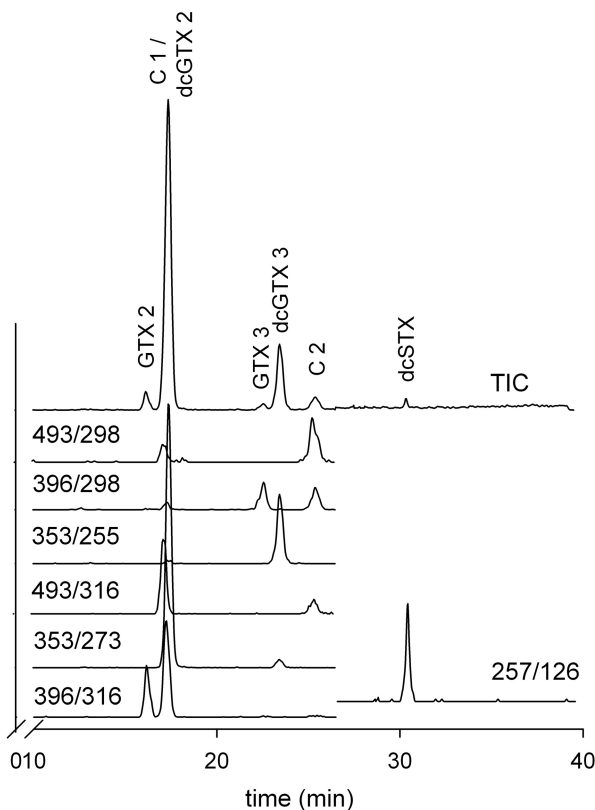


Figure 5. HILIC-MS/MS analysis of a *Gymnodinium catenatum* extract (0.03 M HAC), Baja California, Mexico.

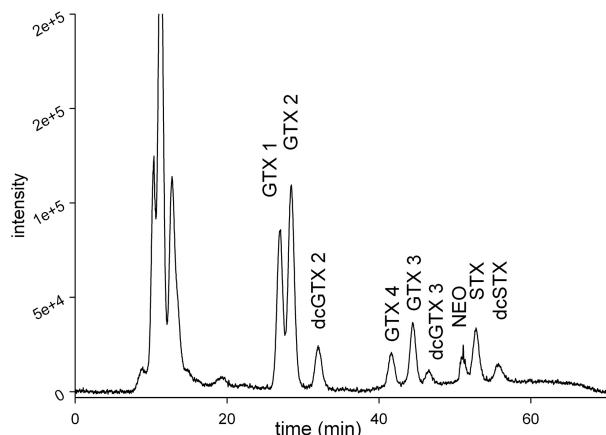


Figure 6. HILIC-FD analysis of a PSP free mussel extract (0.2 M HCl) spiked with the PSP standard mixture 2 (3 mussel extract:1 standard – v/v).

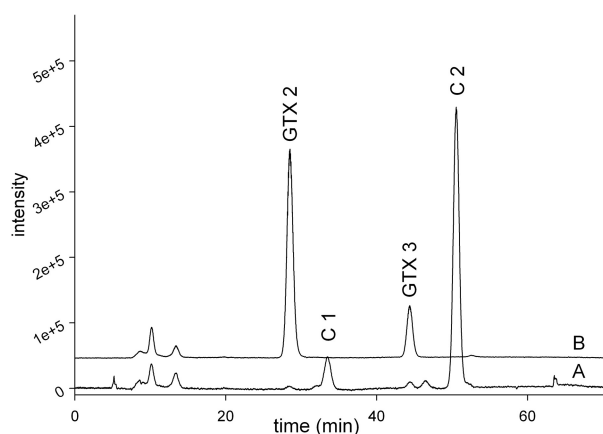


Figure 7. HILIC-FD analysis of an *Alexandrium catenella* extract, Yellow Sea, China. (A) Extracted with 0.03 M HAc, (B) extracted with 0.2 M HCl.

elutes with dcGTX 2 and for this reason the FD is not applicable to detect C 1 and C 2 in samples containing dcGTX 2. Comparable results for all samples independent of the detection methods were obtained and constant retention times were observed. For instance 10.20 ng GTX 1 and 0.58 ng GTX 2 were detected in the PSP standard 2 with HILIC-FD (Fig. 3). For the spiked material, analyzed with HILIC-FD (Fig. 6), amounts of 2.49 ng GTX 1 and 0.15 ng GTX 2 were detected. Under consideration of the dilution of 3 parts mussel extract with 1 part PSP standard 2 (v/v), the spiked material should contain 2.55 ng GTX 1 and 0.15 ng GTX 2. The analysis by HILIC-MS/MS resulted in 4.90 ng GTX 1 and 0.27 ng GTX 2 (dilution of 1 part mussel extract with 1 part PSP standard 2 – v/v, equivalent to 5.10 ng GTX 1 and 0.29 ng GTX 2), respectively (Fig. 4). The comparison of Figs. 4 and 6 shows different ratios for GTX 1/2 depending on the

detection method. Because of the diverse relative fluorescence intensities of the derivatized PSP toxins the signal for GTX 2 is higher than for GTX 1 [14]. In addition, there are no differences in terms of the sensitivity by HILIC-MS/MS analyses of the GTXs, e.g., GTX 1. Therefore the limits of detection (LODs) of the HILIC-MS/MS method is higher for GTX 1, but less for GTX 2, compared to the HILIC-FD method (Tables 5 and 6).

4 Concluding remarks

The present HILIC-based determination method enables the separation of all regulation relevant PSP toxins in a single chromatographic run. In addition, a new ZIC-HILIC column produces stable retention times for each PSP toxin in different sample matrices. By the application of different types of detectors, i.e., MS/MS detection of the underivatized PSP toxins or postcolumn oxidation and fluorescence detection of the derivatized PSP toxins, the determination of all regulation relevant PSP toxins is possible.

5 References

- [1] Steidinger, K. A., in: Falconer, I. R. (Ed.), *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*, Academic Press, London 1993, pp. 1–28.
- [2] McFarren, E. F., Schafer, M. L., Campbell, J. E., Lewis, K. H., Jensen, E. T., Schantz, E. J., *Adv. Food Res.* 1960, 10, 135–179.
- [3] Ferreira, F. M. B., Soler, J. M. F., Fidalgo, M. L., Fernandez-Vila, P., *Toxicol.* 2001, 39, 757–761.
- [4] Luckas, B., in: Conti, M. E., Botrè, F. (Eds.), *The Control of Marine Pollution. Current Status and Future Trends*, Interscience Enterprises Ltd., Oxford 2000, pp. 148–172.
- [5] AOAC International, in: Horwitz, W. (Ed.), *Official Methods of Analysis of AOAC International*, AOAC, International, Gaithersburg, MD, USA 2000.
- [6] Luckas, B., in: Botana, L. M. (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins, Pharmacology, Physiology and Detection*, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel 2000, p. 173.
- [7] Lawrence, J. F., Niedzwiedek, B., Menard, C., *J. AOAC Int.* 2005, 88, 1714–1727.
- [8] Ben-Gigirey, B., Rodriguez-Velasco, M. L., Villar-Gonzalez, A., Botana, L. M., *J. Chromatogr. A* 2007, 1140, 78–87.
- [9] Oshima, Y., Sugino, K., Yasumoto, T., in: Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, Y. (Eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins*, Elsevier Science, Amsterdam 1989, pp. 319–328.
- [10] Luckas, B., Hummert, C., Oshima, Y., in: Hallegraef, G., Anderson, D., Cembella, A. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*, Oceanographic Commission of UNESCO, Paris 2003, pp. 191–209.
- [11] Diener, M., Erler, K., Hiller, S., Christian, B., Luckas, B., *Eur. Food Res. Technol.* 2006, 224, 147–151.
- [12] Aversano, C. D., Hess, P., Quilliam, M. A., *J. Chromatogr. A* 2005, 1081, 190–201.
- [13] Hummert, C., Ritscher, M., Reinhardt, K., Luckas, B., *Chromatographia* 1997, 45, 312–316.
- [14] Botana, L. M., Rodrigues-Vieytes, M., Alfonso, A., Louzao, M. C., in: Nollet, L. M. (Ed.), *Handbook of Food Analysis*, Marcel Dekker, New York 1994, pp. 1147–1169.

5. Manuskript III

Determination of tetrodotoxin and its analogs in the puffer fish *Takifugu ablongus* from Bangladesh by hydrophilic interaction chromatography and mass-spectrometric detection

Diener, M.¹, Christian, B.¹, Ahmed², M.S., Luckas, B.¹

Anal. Bioanal. Chem. **389**, 1997–2002, 2007

Accepted: 28 August 2007

¹ Institut für Ernährungswissenschaft,
LS Lebensmittelchemie
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Dornburger Str. 25,
D-07743 Jena, Germany

² Laboratory of Aquatic Resource Management,
Department of Zoology, University of Dhaka,
Dhaka 1000, Bangladesh

Korrespondierender Autor:

Marc Diener
E-Mail: Marc.Diener@uni-jena.de
Tel.: +49-36-41-94-96-55
Fax: +49-36-41-94-96-52

Determination of tetrodotoxin and its analogs in the puffer fish *Takifugu oblongus* from Bangladesh by hydrophilic interaction chromatography and mass-spectrometric detection

Marc Diener · Bernd Christian · M. Sagir Ahmed · Bernd Luckas

Received: 29 June 2007 / Revised: 24 August 2007 / Accepted: 28 August 2007 / Published online: 27 September 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract Tetrodotoxin (TTX) and its analogs (TTXs), widely distributed among marine as well as terrestrial animals, induce dangerous intoxications. These highly potential toxins are also known as the causative agent of puffer fish poisoning. A newly developed highly sensitive method for determination of TTXs based on hydrophilic interaction chromatography and mass-spectrometric detection is presented. TTX, anhydrotetrodotoxin, 11-deoxytetrodotoxin and trideoxytetrodotoxin were determined in separated tissues of Bangladeshi marine puffers, *Takifugu oblongus*. TTX was predominant in skin, muscle and liver, whereas trideoxytetrodotoxin preponderated in the ovary. The toxicity of the various tissues was determined by a mouse bioassay.

Keywords Hydrophilic interaction chromatography · Liquid chromatography–tandem mass spectrometry · *Takifugu oblongus* · Tetrodotoxin · Zwitterionic hydrophilic interaction chromatography column

Abbreviations

AnhydroTTX Anhydrotetrodotoxin
4-CysTTX 4-S-Cysteinyltetrodotoxin
dcSTX Decarbamoyl saxitoxin

5-DeoxyTTX	5-Deoxytetrodotoxin
11-DeoxyTTX	11-Deoxytetrodotoxin
6-EpiTTX	6-Epitetrodotoxin
HILIC	Hydrophilic interaction chromatography
LC	Liquid chromatography
LOD	Limit of detection
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Mass spectrometry
MU	Mouse unit
PSP	Paralytic shellfish poisoning
SIM	Selected ion monitoring
S/N	Signal-to-noise ratio
STX	Saxitoxin (STX)
TrideoxyTTX	Trideoxytetrodotoxin
TTX	Tetrodotoxin
ZIC	Zwitterionic

Introduction

Puffer fish poisoning is relatively common in some Asian countries, including Bangladesh, which has 13 species of puffers, two of them are freshwater species. Two tragic accidents have shown the importance of this potential toxin in Bangladesh. First in 1998, when five of eight affected people died after consumption of roe from *Takifugu oblongus* [1]. The second incident occurred in 2002, when seven of 36 humans died also after consumption of the same species [2].

Tetrodotoxin (TTX) is the toxic agent of puffer fish poisoning, a powerful and specific sodium channel blocker [3]. The reversible inhibition of the voltage-activated sodium channels induces paralytic symptoms, such as respiratory insufficiency. TTX usually exists as a mixture of its analogs in

M. Diener (✉) · B. Christian · B. Luckas
Institute of Nutrition, University of Jena,
Dornburger Street 25,
07743 Jena, Germany
e-mail: marc.diener@uni-jena.de

M. S. Ahmed
Laboratory of Aquatic Resource Management,
Department of Zoology, University of Dhaka,
Dhaka 1000, Bangladesh
e-mail: ms2ahmed@yahoo.com

puffer fish (Fig. 1) [4, 5]. Goto et al. [6] reported that 4-epitetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin (anhydroTTX) were chemically equivalent with TTX. Natural analogs of TTX, such as 6-epitetrodotoxin (6-epiTTX) [7], 11-nortetrodotoxin-(6*R*)-ol [8], 11-nortetrodotoxin-(6*S*)-ol [9], 5-deoxytetrodotoxin (5-deoxyTTX) [10], 11-deoxytetrodotoxin (11-deoxyTTX) [7], trideoxytetrodotoxin (trideoxyTTX) [11], and 4-*S*-cysteinyltetrodotoxin (4-CysTTX) [12] have also been isolated from puffer fish and newts. 5-DeoxyTTX, trideoxyTTX, 4-CysTTX and anhydroTTX are almost nontoxic analogs.

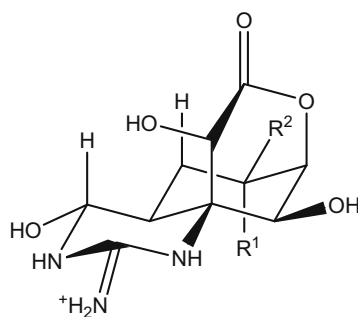
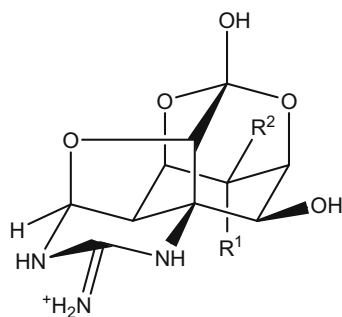
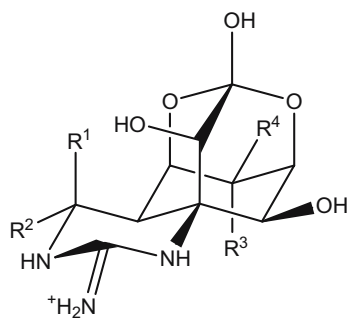
In contrast, in marine puffers, *T. pardalis* (= *Fugu pardalis*) [13], *T. poecilonotus*, *T. vermicularis* [14] and *Arothron firmamentum* [15] collected in Japan, the presence of paralytic shellfish poisoning (PSP) components, such as saxitoxin (STX) and decarbamoyl saxitoxin (dcSTX), has been reported. Sato et al. [16] identified STX as the major component of PSP, whereas dcSTX, neosaxitoxin and *N*-sulfocarbamoyl saxitoxin are minor components in seven marine puffer fish species of the genus *Arothron* collected in the Philippines.

STXs and dcSTX are also reported as the major toxins of freshwater puffer fish in Bangladesh and Thailand [17–20].

The mouse has been the animal of choice for determination of the toxicity of TTX. Nevertheless, to obtain critical information such as the toxin profile, the amount of single toxins and to have reliable and fast analysis, chromatographic methods are necessary. Therefore, chemical methods based on liquid chromatography (LC) and fluorescence detection of the derivatized TTXs were developed [21]. These methods guarantee low limits of detection (LODs) for most of the TTXs, but the different fluorescence intensities of some TTX analogs, e.g., 5% for 11-deoxyTTX and 1% for 6-epiTTX in comparison with TTX, cause problems in quantification [22]. For this reason, a substantial development had been made in analysis of TTX and its analogs with considerable accuracy and precision by LC–mass spectrometry (MS) and LC-MS/MS [22, 23].

The increasing trends of marine puffer fish poisoning in Bangladesh demanded the determination of toxicity and

Fig. 1 Chemical structures of tetrodotoxin (TTX) and its analogs



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	[M+H] ⁺
TTX	H	OH	OH	CH ₂ OH	320
4-epiTTX	OH	H	OH	CH ₂ OH	320
6-epiTTX	H	OH	CH ₂ OH	OH	320
11-deoxyTTX	H	OH	OH	CH ₃	304
norTTX-6(<i>S</i>)-ol	H	OH	OH	H	290
norTTX-6(<i>R</i>)-ol	H	OH	H	OH	290
norTTX-6, 6-diol	H	OH	OH	OH	306

	R ¹	R ²	[M+H] ⁺
anhydroTTX	OH	CH ₂ OH	302
6-epianhydroTTX	CH ₂ OH	OH	302

	R ¹	R ²	[M+H] ⁺
5-deoxyTTX	OH	CH ₂ OH	304
trideoxyTTX	H	CH ₃	272

toxic components of *T. oblongus* collected from the offshore area of the Bay of Bengal, Bangladesh.

Here we report an approach which facilitates the quantification of TTXs in puffer fish by the enhanced sensitivity and accuracy of a reliable LC-MS method. The LC-MS method applied a zwitterionic (ZIC) hydrophilic interaction chromatography (HILIC) column and decreased the LODs 3 times compared with previous LC-MS methods. Therefore, the method allowed the affirmation of the toxicity results obtained by a mouse bioassay. Moreover, a similar ZIC-HILIC column allows the detection of PSP toxins [24] which could appear as major toxins in puffer fish [15] or combined with TTX [25].

Materials and methods

Puffer fish specimens

Five specimens of *T. oblongus* (body weight from 240 to 625 g) were collected from the area adjacent to the poisoning incident of 2002, in the coastal district of Khulna on 25 March 2006. They were caught concomitantly with other commercially important fish by seine nets from the offshore area of the Bay of Bengal. All the samples were immediately frozen at -20°C , transported to the laboratory at the Department of Zoology, University of Dhaka, and subsequently kept frozen at below -30°C until use.

Assay of toxicity

The puffer specimens were partially thawed and dissected into skin, muscle, liver, testis/ovary and viscera. Each tissue was minced and a small portion (3–5 g) was extracted with an equal volume of 0.1% acetic acid by heating in a boiling water bath for 5 min and the extractant was centrifuged at 11,000 g for 10 min. The supernatant was examined for toxicity by the standard method for TTX, since the toxin was suspected to be TTX. Lethal potency was expressed in mouse units (MU), where 1 MU is defined as the amount of toxin that kills an 18–20 g male mouse in 30 min after intraperitoneal injection [26]. Representative parts of the remaining tissues (except viscera) were sun-dried and transport-

Table 1 High-performance liquid chromatography gradient program

Time (min)	A (%)	B (%)
0.0	0	100
0.1	35	65
7.0	35	65
10.0	0	100
30.0	0	100

Table 2 Recommended tandem mass spectrometry (MS/MS) parameters for tetrodotoxin (TTX) determination

Parameter	Data
Nebulizer gas	12
Curtain gas	12
Ionspray voltage	5,000
Temperature	500
Collision gas	10
Declustering potential	40
Focusing potential	200
Entrance potential	6
Collision energy	50
Collision cell exit potential	15

ed to the Institute of Nutrition, University of Jena, Germany, for determination of toxic components.

Extraction

The dried *T. oblongus* samples (0.2 g) were homogenized with 2 mL acetic acid (0.03 M) using an ultrasonic probe. Afterwards, the samples were centrifuged (Z 200 MH, Hermle Labortechnik, Wehingen, Germany) for 10 min (16,000 g), and subsequently the supernatant was passed through a 0.45 μm nylon filter.

Toxin standards

The TTX standard (part number 630–002–M001) was purchased from Axxora, Grünberg, Germany. This solution also contained anhydroTTX and 11-deoxyTTX as minor compounds. Reference material for trideoxyTTX was not available; therefore, the concentration of trideoxyTTX was calculated with the calibration equation for TTX.

Chemicals

All solvents used were of analytical grade; acetonitrile, ammonium formate and formic acid were purchased from Acros Organics (Geel, Belgium). Water (high-performance LC grade) was taken from a Millipore-Q RG ultrapure water system (Millipore, Milford, USA).

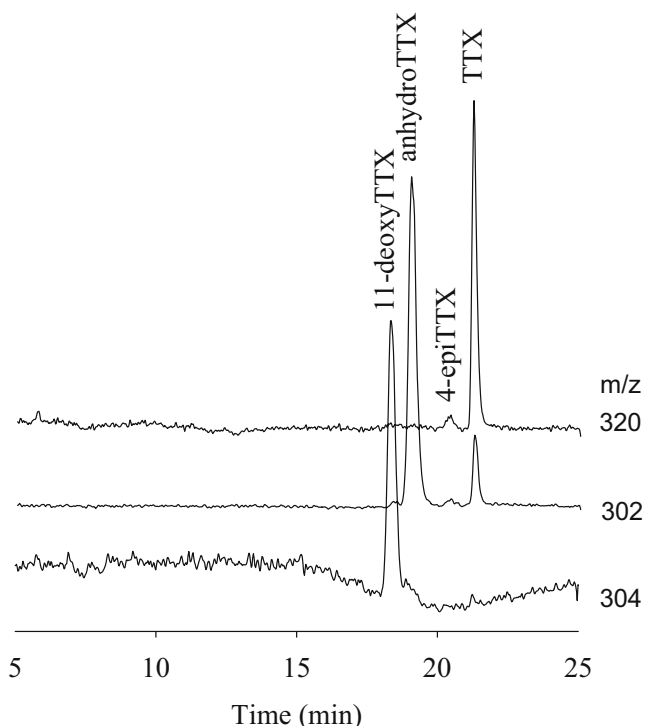
Liquid chromatography–tandem mass spectrometry

LC-MS/MS was performed using the following system: an SIL-10ADvp intelligent autosampler, LC-10AT pumps, an SCL-10Avp system controller, a CTO 10ASvp column oven (Shimadzu, Duisburg, Germany) and a triple-quadrupole API 365 PE Sciex mass spectrometer equipped with a turbo ion spray interface (PE Sciex, Halifax, Canada).

Table 3 The toxicity of tissues from *Takifugu oblongus* collected on 25 March 2006 from Khulna district

Sex	Body weight (g)	Toxicity (MU g ⁻¹)				
		Skin	Muscle	Liver	Testis/ovary	Viscera
♀	625	18.0	3.8	126.0	398.0	112.0
♀	590	17.0	6.3	239.0	485.0	62.0
♀	450	15.6	3.5	112.0	350.0	75.0
♂	240	13.5	3.2	3.9	2.9	22.7
♂	259	16.9	2.8	3.8	3.6	22.0
Mean	432.8	16.7	3.9	96.9	247.9	58.7

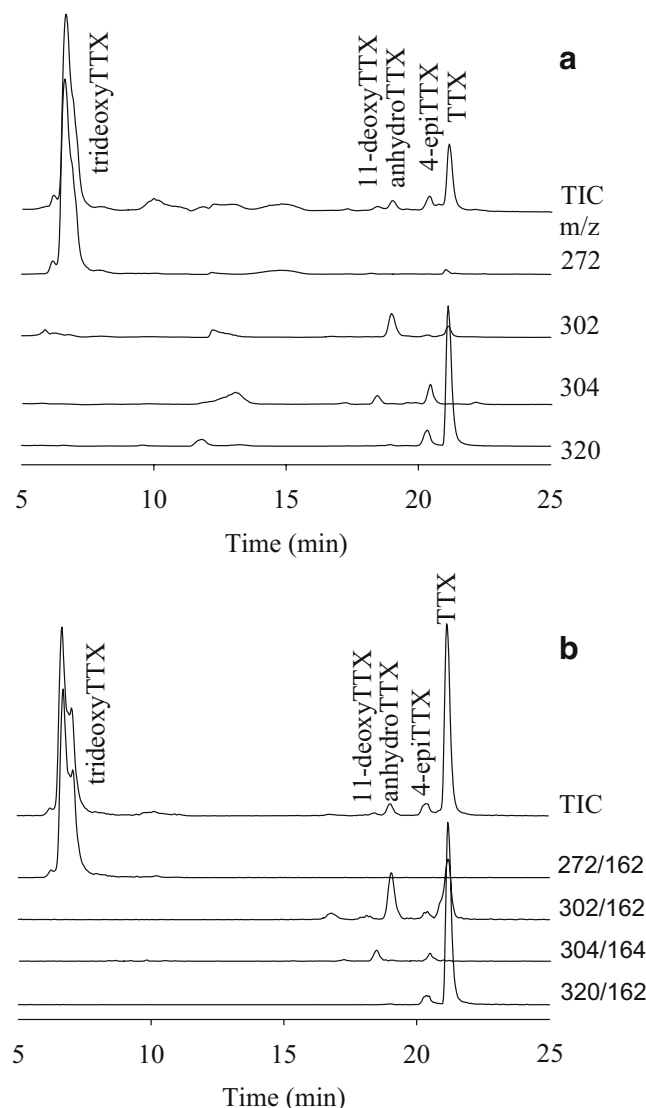
HILIC was operated with eluent A consisting of 10 mM ammonium formate and 10 mM formic acid in water. Eluent B contained 80% acetonitrile and 20% water with a final concentration of 5 mM ammonium formate and 2 mM formic acid. Gradient formation applied for the chromatographic separation of TTX is presented in Table 1. A 5- μ m ZIC-HILIC column, 150 mm \times 2.1-mm inner diameter and a corresponding guard column 20 mm \times 2.1-mm inner diameter (SeQuant, Haltern, Germany) were used. The mobile phase, flow 0.25 mL min⁻¹, was transferred directly into the ion spray interface and the mass-spectrometric detection was carried out in positive mode. Multiple reac-

**Fig. 2** Hydrophilic interaction chromatography (HILIC)–mass spectrometry (MS) analysis of a TTXs standard containing TTX (1.0 ng), anhydrotetrodotoxin (*anhydroTTX*) (1.0 ng) and 11-deoxytetrodotoxin (*11-deoxyTTX*) (0.8 ng) carried out in selective ion monitoring (SIM) mode

tion monitoring (MRM) transitions and the selected ion monitoring (SIM) parameters for HILIC-MS detection of TTX are presented in Table 2. The turbo ion spray source was operated with nitrogen (8 L min⁻¹) as the nebulizer gas at 500°C.

Results and discussion

The female specimens contained a considerably higher level of toxin in their ovaries in comparison with the testes of male specimens (Table 3). The victims usually eat whole fish except viscera. The range of toxicity in whole body content except viscera (in females) was 147.84 MU g⁻¹. This means that 100 g of consumed fish, equivalent to 14,784 MU, is lethal. Since the minimum lethal dose (MLD) for humans is estimated to be 10,000 MU [27], it is likely that con-

**Fig. 3** HILIC-MS/MS analysis of a *Takifugu oblongus* (skin) extract: **a** SIM mode; **b** multiple reaction monitoring (MRM) mode. *TIC* total ion chromatogram

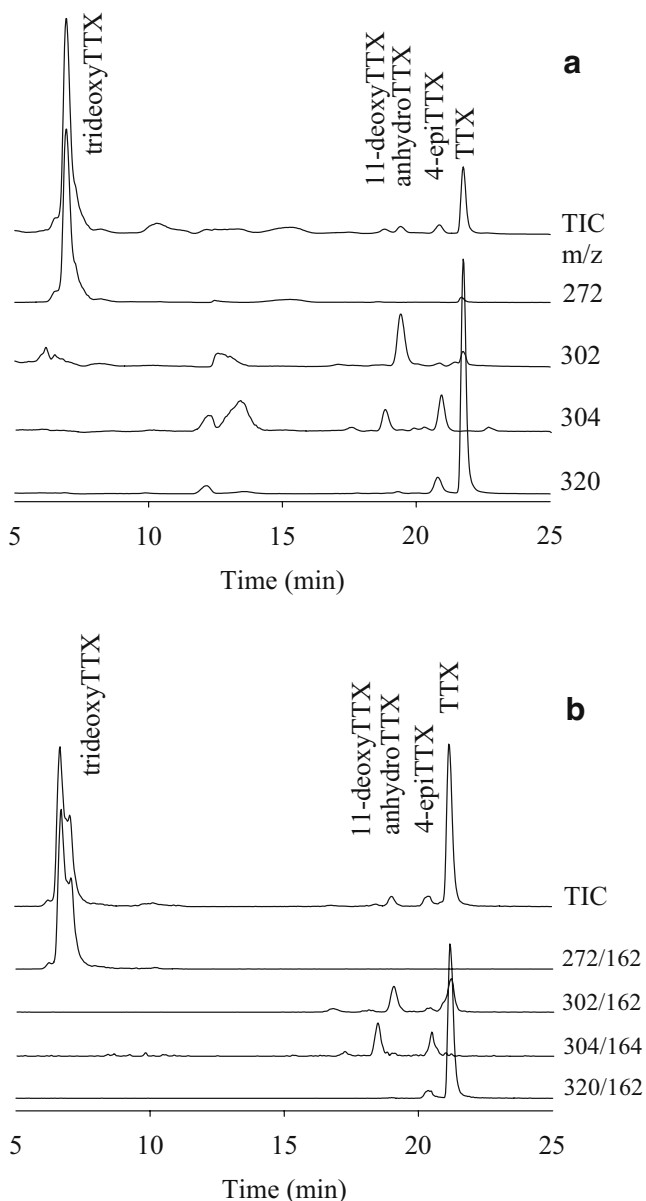


Fig. 4 HILIC-MS/MS analysis of a *T. oblongus* (ovary) extract: **a** SIM mode; **b** MRM mode

sumption of female puffer fish including ovary/roe leads to a severe poisoning incident.

A new method was developed for a reliable quantification of the individual TTXs present in puffer fish. The dried puffer fish samples were extracted according to the protocol described. The recovery of TTX, anhydroTTX and 11-deoxyTTX

Table 5 TTX concentration in different tissues of *Takifugu oblongus*

Toxin	TTXs concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
	Skin	Muscle	Liver	Ovary
TTX	25.35	1.64	45.71	356.00
Anhydrotetrodotoxin	7.71	–	29.17	85.87
11-Deoxytetrodotoxin	1.12	–	–	26.00
Trideoxytetrodotoxin	15.31	–	9.09	2,929.70

by this extraction was more than 85% ($N=3$). Losses of TTXs during the sun-drying process were not examined. A ZIC-HILIC column was applied and realized a good separation of the principal TTXs and guaranteed stable retention times for the toxins in different sample materials (Figs. 2, 3 and 4). The mobile phase contained a high percentage of organic solvent and a volatile buffer in low concentration without ion-pair reagents, allowing on-line mass-spectrometric detection. In addition, mass-spectrometric detection of TTXs using SIM or MRM resulted in a sensitive and selective detection of the substances. The detection limit for TTX in SIM mode was estimated to be 0.3 pmol (signal-to-noise ratio, S/N 3), lower than for the previous reversed-phase LC-MS method (1 pmol, S/N 3) or the HILIC-MS method (0.9 pmol, S/N 3) [22, 23].

Five-point calibration curves for mass-spectrometric detection were calculated for TTX, anhydroTTX and 11-deoxyTTX. Low LODs for TTXs and a good correlation of the data for the concentration ranges tested could be observed (Table 4). Therefore, independent of the puffer fish matrix, all TTXs toxins present could be determined.

Four different tissues of *T. oblongus* were analyzed by the new method. Each sample was injected three times and the variation coefficient for the calculated TTXs concentration averaged out at 5% (Table 5). To ensure the results obtained by HILIC-MS, all samples were also analyzed by HILIC-MS/MS (Figs. 2, 3 and 4). The results of mass-spectrometric detection by SIM or MRM mode showed no variations in the sequence of TTXs in our samples. Therefore, the method allowed a selective and sensitive detection of the TTXs also in SIM mode. Comparison of the different tissues from *T. oblongus* showed that TTX was the major toxin in skin, muscle and liver. The nontoxic trideoxyTTX dominated in the ovary, but nevertheless TTX is the main source of toxicity for this organ (Figs. 3, 4,

Table 4 Limit of detection (LOD) (signal-to-noise ratio 3) and equation of calibration curve for different variations of TTXs (selective ion monitoring mode)

Toxin	<i>m/z</i>	Amount (ng)	Calibration equation	Correlation	LOD (ng)
TTX	320	0.25–10.00	$y=97,854x+31,313$	0.994	0.09
Anhydrotetrodotoxin	302	0.25–5.80	$y=98,639x+33,019$	0.996	0.14
11-Deoxytetrodotoxin	304	0.20–5.00	$y=95,506x+28,658$	0.996	0.20

Table 5). The analytical results obtained by HILIC-MS reinforce the results of the biological assay.

All puffer fish samples were also checked for PSP contamination by a LC-MS method [24], but no PSP toxins could be determined.

To our knowledge, this is the first complete report on the occurrence of TTXs from Bangladeshi marine puffers. To ensure the safety of consumers in Bangladesh and some other Asian countries where puffer fish consumption has been increasing, a comprehensive investigation should be carried out to identify the toxic and nontoxic puffers. On the basis of the results, consumer awareness should be created through the media in order to reduce the number of poisoning incidents.

Conclusion

The new HILIC-MS/MS method allows the selective and sensitive detection of the major TTXs in a single 30 min analysis. The composition of the mobile phase, low buffer concentration and a high percentage of organic solvent results in a high ionization efficiency and guarantees low LODs for TTXs. The results demonstrates the successful application of this method for qualitative analysis of different organs of *T. oblongus*. It was demonstrated that the occurrence of TTXs in Bangladeshi marine puffers caused intoxication of consumers.

References

- Mahmud Y, Tanu MB, Noguchi T (1999) *J Food Hyg Soc Jpn* 40:473–480
- Ahmed S (2006) *Afr J Mar Sci* 28:457–458
- Kao CY (1966) *Pharmacol Rev* 18:997–1049
- Nakamura M, Yasumoto T (1985) *Toxicon* 23:271–276
- Yotsu-Yamashita M (2001) *Toxin Rev* 20:51–66
- Goto T, Kishi Y, Takahashi S, Hirata Y (1965) *Tetrahedron* 21:2059–2088
- Yasumoto T, Yotsu M, Murata M, Naoki H (1988) *J Am Chem Soc* 110:2344–2345
- Endo A, Khora SS, Murata M, Yasumoto T (1988) *Tetrahedron Lett* 29:4127–4128
- Yotsu M, Hayashi Y, Khora SS, Sato S, Yasumoto T (1992) *Biosci Biotechnol Biochem* 56:370–371
- Yotsu-Yamashita M, Schimmele B, Yasumoto T (1999) *Biosci Biotechnol Biochem* 63:961–963
- Yotsu-Yamashita M, Yamagishi Y, Yasumoto T (1995) *Tetrahedron Lett* 36:9329–9332
- Yotsu-Yamashita M, Goto A, Nakagawa T (2005) *Chem Res Toxicol* 18:865–871
- Kodama M, Ogata T, Noguchi T, Maruyama J, Hashimoto K (1983) *Toxicon* 21:897–900
- Nakamura M, Oshima Y, Yasumoto T (1984) *Toxicon* 22:381–385
- Nakashima K, Arakawa O, Taniyama S, Nonaka M, Takatani T, Yamamori K, Fuchi Y, Noguchi T (2004) *Toxicon* 43:207–212
- Sato S, Ogata T, Borja V, Gonzales C, Fukuyo Y, Kodama M (2000) *Toxicon* 38:1101–1109
- Kungsuwan A, Arakawa O, Promdet M, Onoue Y (1997) *Toxicon* 35:1341–1346
- Sato S, Kodama M, Ogata T, Saitanu K, Furuya M, Hirayama K, Kakinuma K (1997) *Toxicon* 35:137–140
- Zaman L, Arakawa O, Shimosu A, Onoue Y (1997) *Toxicon* 35:423–431
- Ahmed MS, Jaime E, Reichelt MB, Luckas B (2001) Paralytic shellfish poison in freshwater puffer fish (*Tetraodon cutcutia*) from the river Burigonga, Bangladesh. Intergovernmental Oceanographic Commission, Paris
- Yasumoto T, Michishita T (1985) *Agric Biol Chem* 49:3077–3080
- Shoji Y, Yotsu-Yamashita M, Miyazawa T, Yasumoto T (2001) *Anal Biochem* 290:10–17
- Nakagawa T, Jang J, Yotsu-Yamashita M (2006) *Anal Biochem* 352:142–144
- Diener M, Erler K, Christian B, Luckas B (2007) *J Sep Sci* (in press)
- Jang J, Yotsu-Yamashita M (2006) *Toxicon* 48:980–987
- Kawabata T (1978) Puffer toxin. Japan Hygienic Association, Tokyo
- Noguchi T, Ebesu JSM (2001) *J Toxicol Toxin Rev* 20:1–10

6. Gesamtdiskussion

Determination of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins in dietary supplements by application of a new HPLC/FD method

Eine Analysemethode zur Erfassung der lebensmittelrechtlich relevanten PSP-Toxine muss die vollständige chromatographische Trennung gefolgt von der schnellen und eindeutigen Bestimmung der 12 säurebeständigen PSP-Toxine ermöglichen. Die meisten veröffentlichten HPLC-Methoden für den Einsatz in der Routineüberwachung basieren auf Vor- bzw. Nachsäulenderivatisierung der PSP-Toxine und deren anschließender Detektion mittels eines Fluoreszenzdetektors. Bei all diesen Methoden war es bisher nicht möglich, alle säurestabilen Carbamoyl- und Decarbamoyltoxine in einem einzigen chromatographischen Lauf vollständig voneinander zu trennen und anschließend zu detektieren. Dabei ist neben der strukturellen Ähnlichkeit der einzelnen PSP-Toxine deren Vorkommen in unterschiedlichsten Organismen ein zusätzlicher Grund für die Schwierigkeiten bei der Bestimmung der PSP-Toxine. Im Gegensatz zur Analytik von marinen Dinoflagellaten bzw. Cyanobakterien gestaltet sich die PSP-Bestimmung aus Muschel und Muschelkonserven deutlich schwieriger, denn vor allem im Hinblick auf stabile Retentionszeiten, während der chromatographischen Trennung der einzelnen PSP-Toxine, stellen stark matrixbelastete Proben wie z.B. Muschelextrakte eine Herausforderung dar.

Deshalb war die Optimierung eines bestehenden Verfahrens zur Trennung und Detektion der Carbamoyl- und Decarbamoyltoxine ein Ziel der vorliegenden Arbeit. Dabei war die ionenpaarchromatographische Trennung der einzelnen Toxine, speziell die Trennung der koelutierenden Epimere GTX 1/4, zu verbessern. Auch sollten die Nachweisgrenzen für die einzelnen Substanzen erniedrigt werden. Die daraus resultierende robuste Methode sollte die schnelle und zuverlässige Erfassung der rechtlich relevanten Toxine aus verschiedenen Matrices, wie Muscheln und Phytoplankton, im Routinebetrieb eines Kontrolllabors ermöglichen und war deshalb hinsichtlich ihrer Praxistauglichkeit zu überprüfen.

Mit dieser optimierten HPLC-FLD Methode sollte es möglich sein, die mit PSP-assoziierten toxischen Komponenten in Algenblüten zu beurteilen und eine Kontamination von Lebensmitteln wie z.B. Muscheln auszuschließen. Desweiteren ist es notwendig, das Lebensmittel selbst auf seine gesundheitsgefährdenden Komponenten hin zu untersuchen, um dessen toxikologische Bewertung zu ermöglichen.

Während der Entwicklung der Methode wurden über eine Vielzahl von Injektionen stabile Retentionszeiten für verschiedene Matrices abgesichert, denn diese sind Voraussetzung für die Anwendung eines Fluoreszenzdetektors und ermöglichen eine exakte Berechnung der PSP-Gehalte in Lebensmitteln.

Durch die Kombination zweier Alkylsulfonsäuren, Heptan- und Octansulfonsäure, in der mobilen Phase gelang es, die oben genannten relevanten PSP-Toxine ionenpaar-chromatographisch in einem Lauf zu trennen. Auch GTX 1/4 werden vollständig voneinander getrennt, so dass die genaue Bestimmung der PSP-Gesamtkonzentration mit dieser Methode möglich ist (Abb. 5).

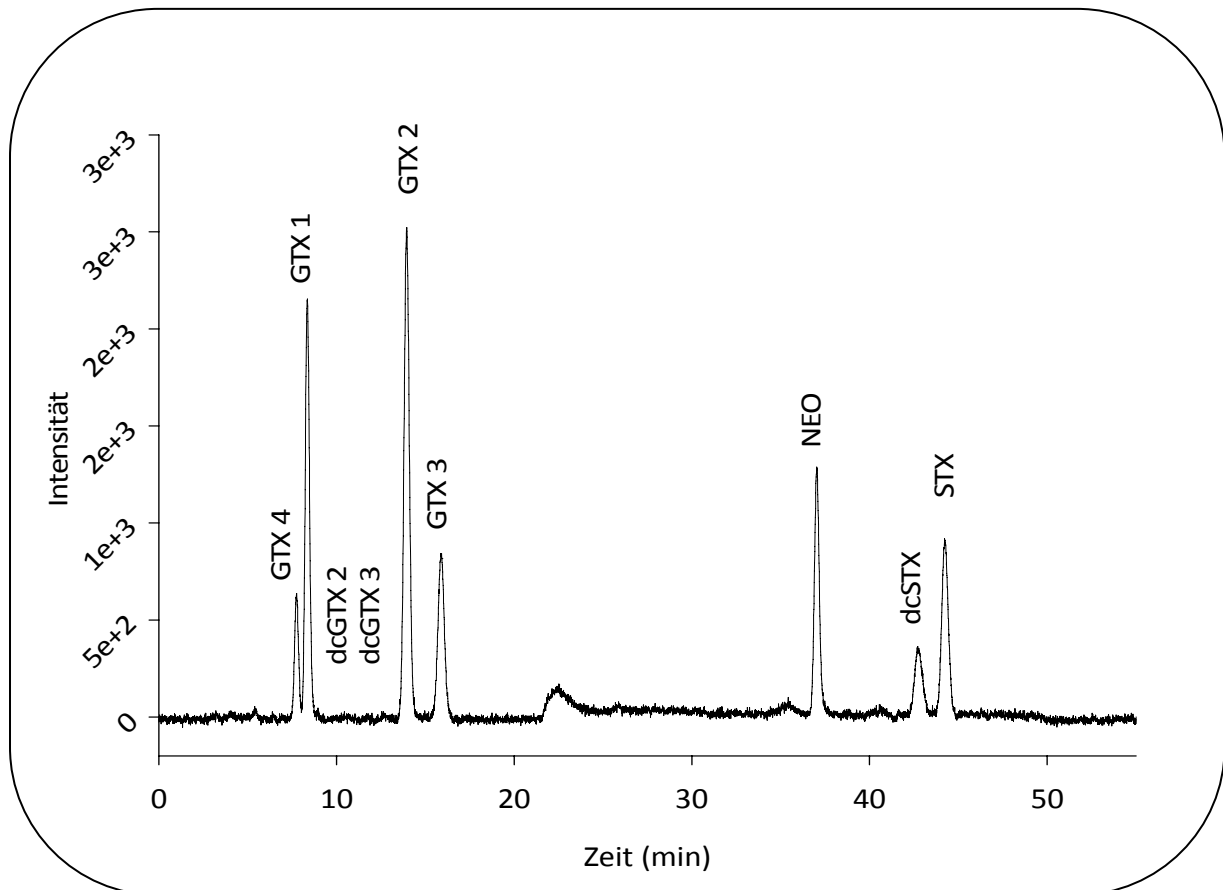


Abb. 5 Chromatogramm eines PSP-Standards (GTX 1-4, NEO, dcSTX und STX) [53]

Die erreichte chromatographische Trennung der Substanzen ist dabei unabhängig vom vorliegenden Probenmaterial, wie z.B. Muscheln oder Phytoplankton. Um internationale Richtlinien zur Toxinbestimmung einzuhalten sowie zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Proben nach dem AOAC-Protokoll mit 0,2 M Salzsäure extrahiert [25]. Zur Quantifizierung der PSP-Toxine erfolgte nach der binären Gradientenelution eine Nachsäulenderivatisierung mit Periodsäure und anschließend die Fluoreszenzdetektion der entstandenen Pyrimidopurine. Mit diesem HPLC-FLD Verfahren, basierend auf der Ionenpaarchromatographie, konnten für alle untersuchten PSP-Toxine sehr niedrige Nachweisgrenzen realisiert werden. Speziell für die besonders häufig vorkommenden Toxine GTX 2/3, STX und dcSTX konnten im Vergleich zu anderen HPLC-FLD Methoden die LODs weiter reduziert werden.

Durch die Verbesserung der LODs und die sehr effektive und stabile Trennung der jeweiligen Carbamoyl- und Decarbamoyltoxine wurde ihre genaue Identifizierung und Quantifizierung möglich, so dass diese neue Bestimmungsmethode anstatt des Maus-Bioassays zur routinemäßigen Lebensmittelüberwachung hinsichtlich von PSP-Kontaminationen einsetzbar ist.

Application of a new zwitterionic hydrophilic interaction chromatography column for determination of paralytic shellfish poisoning toxins

Bisherige Analysemethoden zur Bestimmung der sehr polaren PSP-Toxine basierten meist auf der Ionenaustausch- oder der Ionenpaarchromatographie. Diese ermöglichten eine empfindliche Detektion der PSP-Toxine mittels Fluoreszenzdetektor, nach ihrer Überführung in fluoreszenzaktive Produkte. Allerdings wurde die sensitive und selektive MS/MS-Detektion durch nichtflüchtige Substanzen in den Eluenten erschwert. Hingegen ermöglicht die Hydrophile Interaktionschromatographie hohe Trennleistung für polare Verbindungen und eignet sich aufgrund der verwendeten mobilen Phase mit einem hohen Anteil an Acetonitril bzw. niedrig konzentrierten Puffersubstanzen sowohl für die direkte Kopplung mit dem Massenspektrometer als auch für die klassische Detektion mit einem Fluoreszenzdetektor.

Das Ziel der Arbeit bestand in der Entwicklung einer neuen LC-MS/MS Methode zur simultanen Bestimmung der PSP-Toxine. Da aktuelle Verfahren zur Trennung der PSP-Toxine, auf Basis der Ionenaustausch- und Ionenpaarchromatographie, nicht für die Kopplung LC-MS/MS geeignet sind, sollte die HILIC-Chromatographie zum Einsatz kommen. Da PSP-Toxine als Kationen und Anionen vorliegen können, sollte vorrangig eine neuartige ZIC-HILIC Säule getestet werden.

Das Ziel bei der Entwicklung dieser LC-MS/MS Methode bestand darin, die chromatographische Trennung der PSP-Toxine in einem chromatographischen Lauf zu erreichen. Außerdem war eine Optimierung der massenspektrometrischen Bedingungen im Hinblick auf eine sensitive und selektive MS-Detektion der PSP-Toxine vorzunehmen.

PSP-Toxine sind relativ instabile Moleküle, die bei Anwendung sehr milder Fragmentierungsbedingungen in der Kollisionszelle intensive Produkt-Ionen-Spektren erzeugen, die eine gute Basis für den Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Modus bilden.

Die Grundlagen zu den MS/MS-Fragmentierungen der PSP-Toxine wurden von Sleno *et al.* und Dell'Aversano *et al.* gelegt [29; 31; 54]. Diese Erkenntnisse wurden in der vorliegenden Arbeit genutzt und die MS Parameter so gewählt, dass die gewünschten MRM-Übergänge die stärksten Signale ergeben. Zur Optimierung der MS/MS-Detektion wurden ausschließlich kommerziell erhältliche PSP-Toxin Standardsubstanzen verwendet und nur deren MRM-Übergänge sind dargestellt (Abb. 6). Die PSP-Toxine bilden bei der eingesetzten Elektrospray

Ionisierung (ESI) überwiegend $[M+H]^+$ -Ionen. STX, NEO, dcSTX und dcNEO zeigen zusätzlich ein durch Wasserabspaltung gebildetes Fragmentation $[M+H-H_2O]^+$, welches auch nach der Kollisionszelle im dritten Quadrupol (Q3) gemessen werden kann. Die GTXs und dcGTXs weisen in ihren Massenspektren neben dem protonierten Molekülion ein Fragment $[M+H-80]^+$ nach Abspaltung einer SO_3 -Gruppe auf. GTX 1/4 und GTX 2/3 und die Decarbamoylgonyautoxine dcGTX 2/3 stellen zwar jeweils Epimere mit gleichem Molekulargewicht dar, jedoch weisen die Toxinpaare nach ihrer Fragmentierung unterschiedliche Intensitäten der gleichen Tochterionen auf, so dass zur Quantifizierung der jeweiligen Epimere deren vollständige chromatographische Trennung notwendig ist (Abb. 3). Während bei GTX 3, GTX 4, dcGTX 3 und dcGTX 4 nach der Kollisionszelle das $[M+H-SO_3-H_2O]^+$ Signal dominiert, ergibt bei GTX 1, GTX 2 und dcGTX 2 das $[M+H-SO_3]^+$ -Ion das stärkste Signal im dritten Quadrupol. Die C-Toxine bilden bei ihrer Ionisation neben $[M+H]^+$ und $[M+H-SO_3]^+$ ein starkes Signal von $[M+NH_4]^+$ [29]. In Folge dessen wurden bei der Fragmentierung der PSP-Toxine meist die $[M+H]^+$ -Ionen als Ausgangsion (Q1 Ion) genutzt. Die C-Toxine bilden jedoch eine Ausnahme, denn die Fragmentationen (Q3 Ion) des Ammoniumadduktes weisen bei diesen Substanzen die höchste Intensität auf und folglich wurden dessen MRM-Übergänge gemessen. Die entstehenden Tochterionen sind auf Abspaltung von Wasser, Ammoniak und Teilen der Seitenketten zurückzuführen, so dass charakteristische Fragmente in Abhängigkeit von den Substituenten am Grundgerüst gebildet werden.

PSP-Toxin	Q1 Ion	Q3 Ion	Q1 Ion	Q3 Ion	
	$[M+H]^+$	$[M+H-H_2O]^+$			
NEO	316	> 298			nicht sulfatiert
dcNEO	273	> 255			
dcSTX	257	> 126			
STX	300	> 282			
	$[M+H]^+$	$[M+H-SO_3]^+$	$[M+H]^+$	$[M+H-SO_3-H_2O]^+$	
GTX 1	412	> 332	412	> 314	einfach sulfatiert
GTX 2	396	> 316	396	> 298	
GTX 3	396	> 316	396	> 298	
GTX 4	412	> 332	412	> 314	
dcGTX 2	353	> 273	353	> 255	
dcGTX 3	353	> 273	353	> 255	
B1	380	> 300	380	> 282	
	$[M+NH_4]^+$	$[M+H-SO_3]^+$	$[M+NH_4-NH_3-2SO_3]^+$	$[M+NH_4-NH_3-H_2O]^+$	
C 1	493	> 316	493	> 298	zweifach sulfatiert
C 2	493	> 316	493	> 298	

Abb. 6 Verwendete MRM-Übergänge für die jeweiligen PSP-Toxine

Die neue LC-MS/MS Bestimmungsmethode zur Erfassung der PSP-Toxine nach Trennung unter Einsatz einer ZIC-HILIC Säule ermöglicht die eindeutige Identifizierung und Auswertung aller 21 bekannten PSP-Toxine. Bei dieser Chromatographie werden, analog zur Normalphasen (NP)-Chromatographie, polare stationäre Phasen verwendet, aber mit Puffersystemen die identisch zur RP-Chromatographie sind, z.B. enthalten die Eluenten Ammoniumformiat/Ameisensäure. Im Gegensatz zur RP-Chromatographie ist Wasser das stärkste Elutionsmittel, so dass Gradienten typischerweise mit einer hohen Konzentration an Acetonitril beginnen und mit einem hohen Wasser/Puffer-Anteil in der mobilen Phase enden. Die Trennung wird durch polare funktionelle Gruppen, die kovalent in dem Silikamaterial gebunden sind, erreicht. Das Trennprinzip beruht dabei auf der Etablierung einer Wasserschicht, die sich an der zwitterionischen stationären Phase bildet. Die PSP-Toxine werden dann nach dem Prinzip der Verteilungschromatographie zwischen der extrem polaren wässrigen Phase und der unpolaren mobilen Phase getrennt. Die ZIC-HILIC Säule ermöglicht die Epimerentrennung von GTX 1/4 und GTX 2/3 und den Decarbamoylgonyautoxinen dcGTX 2/3 und dadurch ist ihre getrennte Quantifizierung mittels MS/MS-Detektion gewährleistet. Außerdem ermöglichen die zwitterionischen funktionellen Gruppen die gleichzeitige Trennung der kationischen und anionischen PSP-Toxine in einem chromatographischen Lauf. Dadurch können die N-Sulfocarbamoyl zusammen mit den Carbamoyl- und Decarbamolytoxinen quantifiziert werden (Abb. 7). Der hohe Anteil an organischem Lösungsmittel (Acetonitril) verbunden mit einem sehr gering konzentrierten Puffer (Ammoniumformiat/Ameisensäure) in der mobilen Phase garantieren eine sensitive MS-Detektion der Toxine. Zusätzlich vermindert die eindeutige Quantifizierung mit Hilfe der individuellen MRM-Übergänge der jeweiligen Substanzen das Risiko falsch positiver Ergebnisse in Bezug auf die Gesamttoxizität einer Probe. Eine kurze Analysezeit von 40 Minuten sowie die Möglichkeit auch nach unbekanntem PSP-Toxinen zu suchen stellen weitere Vorteile des neuen Bestimmungsverfahrens für PSP-Toxine dar. Die Stabilität der ZIC-HILIC Säule wurde mit verschiedenen Matrices getestet und bei der Untersuchung verschiedener Extrakte von Muscheln und Algen konnten konstante Retentionszeiten für die jeweiligen PSP-Toxine beobachtet werden. Diese sind wie bei der Fluoreszenzdetektion auch bei der MS/MS-Bestimmung Voraussetzung, um alle Strukturvarianten der PSP-Toxine eindeutig quantifizieren zu können, da einige PSP-Toxine aufgrund des gleichen Grundmoleküls teilweise gleiche Fragmente bilden. Auch entfallen systembedingte Nachteile der Nachsäulenderivatisierung, wie unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten der aus den PSP-Toxinen gebildeten fluoreszierenden Pyrimidopurine, da sich die Substanzen recht ähnlich bei der Ionisierung verhalten [55]. So resultieren z.B. bessere Nachweisgrenzen für die Epimere GTX 1/4 und im Durchschnitt liegen die LOQs im Bereich von 0,1-0,6 ng PSP-Toxin. Diese könnten durch den Einsatz eines MS/MS-Gerätes der neuesten Generation mindestens um den Faktor zehn weiter reduziert werden.

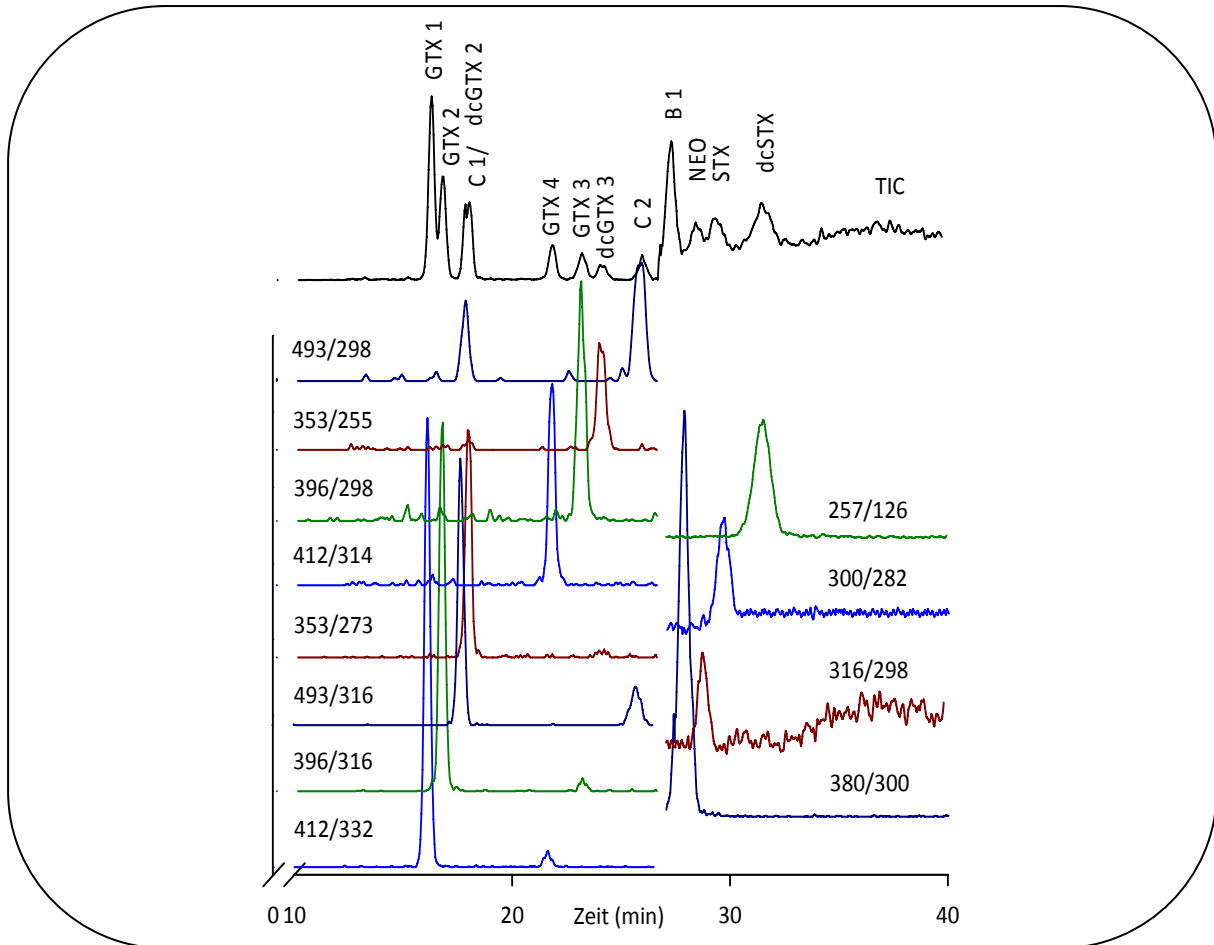


Abb. 7 HILIC-MS/MS Analyse eines PSP-Standards (B 1, C 1/2, GTX 1-4, dcGTX 2/3 NEO, dcSTX und STX) [56]

Somit eignet sich die neue LC-MS/MS Methode sowohl sehr gut zur sensitiven und selektiven Bestimmung von PSP-Toxinen im Rahmen der Lebensmittelüberwachung als auch zur Beantwortung von Fragen im Zusammenhang mit der Bildung unterschiedlicher PSP-Profile in Abhängigkeit der Algenspezies. Desweiteren ist das neue chromatographische Trennverfahren unter Verwendung der ZIC-HILIC Säule auch in der Forschung einsetzbar, da man beliebige PSP-haltige Proben mit Hilfe der MS/MS-Detektion auf bisher nicht beschriebene Saxitoxinderivate hin untersuchen kann.

Um die Vorteile der HILIC-Chromatographie auch ohne Massenspektrometer zur PSP-Bestimmung zu nutzen galt es, die neue Methode anzupassen. Somit bestand ein weiteres Ziel der Arbeit in der Optimierung des neuen HILIC-Trennverfahrens, um zumindest die lebensmittelrechtlich relevanten PSP-Toxine auch mittels Fluoreszenzdetektion nach erfolgter Nachsäulenderivatisierung quantifizieren zu können.

Hierzu müssen jedoch alle Carbamoyl- und Decarbamoyltoxine chromatographisch vollständig getrennt werden, während bei der MS/MS-Detektion nur die Epimere, wie z.B.

GTX 1/4 sowie Substanzen mit gleichen Fragmenten, wie z.B. B 1 und STX, getrennt werden müssen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde der zweistufige Gradient modifiziert und die Laufzeit der chromatographischen Trennung auf 70 Minuten erhöht. Die Überführung der PSP-Toxine in detektierbare Pyrimidopurine wurde durch die Oxidation mit Periodsäure bei 50°C und anschließender Ansäuerung mit 0,75 M Salpetersäure erreicht.

Die im Hinblick auf die Fluoreszenzdetektion veränderten chromatographischen Bedingungen ermöglichten die vollständige Trennung aller lebensmittelrechtlich relevanten PSP-Toxine (Abb. 8). Vergleicht man die Elutionsreihenfolge bei Einsatz einer ZIC-HILIC Säule mit dem eingangs beschriebenen Verfahren, basierend auf der Ionenpaarchromatographie mit RP-Säulen, werden große Unterschiede sichtbar. Insbesondere die Epimere wie GTX 1/4 werden auf der neuen ZIC-HILIC Säule besser retardiert als deren Ionenpaare auf einer herkömmlichen C₁₈-Säule (Abb. 5).

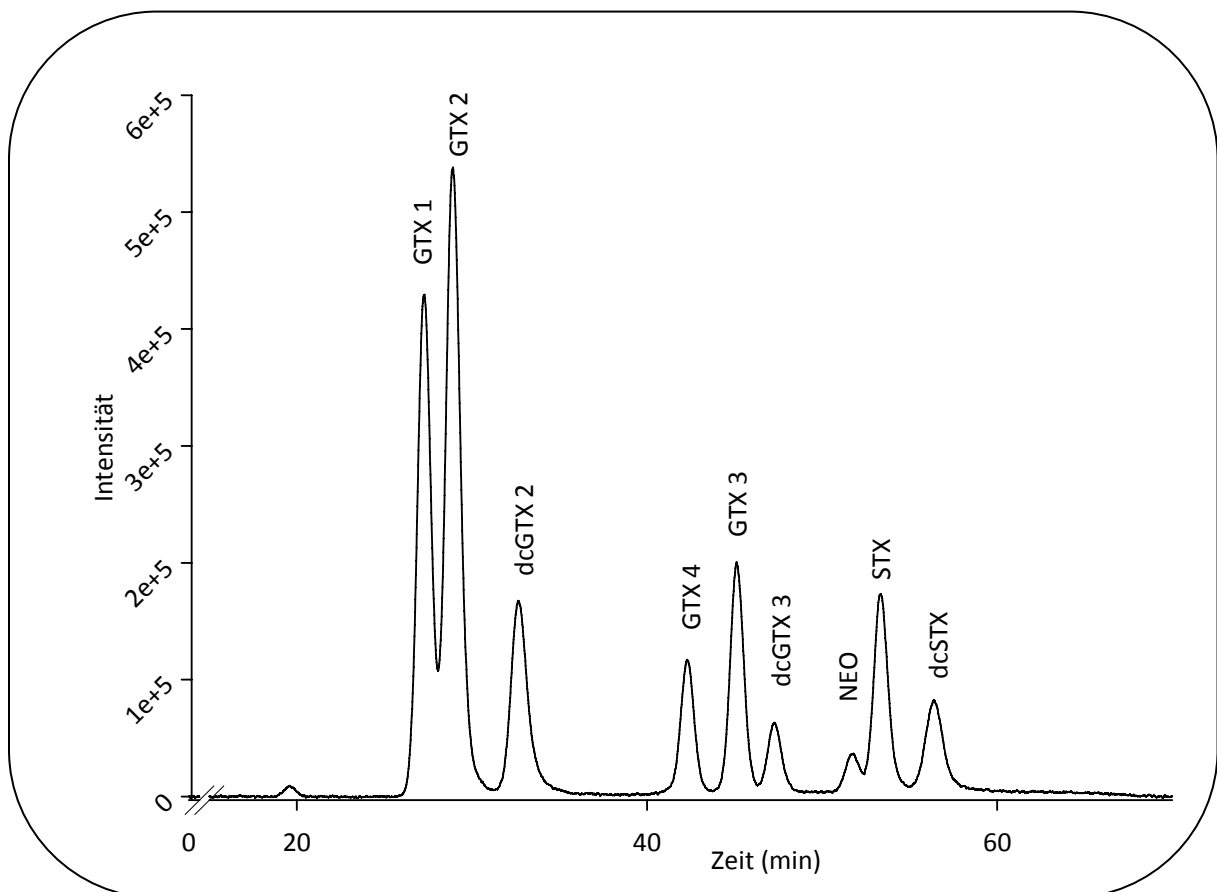


Abb. 8 HILIC-FLD Analyse eines PSP-Standards (GTX 1-4, dcGTX 2/3 NEO, dcSTX und STX) [56]

Der große Vorteil des neuen, auf der HILIC-Chromatographie basierenden Verfahrens besteht darin, dass man zur Absicherung der erhaltenen Ergebnisse (HPLC-FLD Methode) mit der gleichen ZIC-HILIC Säule über die MS-Detektion eine Bestätigung erreichen kann. Allerdings gelingt diese Absicherung auch in Laboratorien ohne LC-MS/MS Kopplung durch

einen Vergleich der mit der ZIC-HILIC Säule und der Ionenpaarchromatographie erhaltenen Chromatogramme in Verbindung mit Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion.

Durch die gute und stabile Trennung der jeweiligen Carbamoyl- und Decarbamoyltoxine verbunden mit niedrigen LODs ist eine genaue Identifizierung und Quantifizierung der PSP-Toxine möglich. Somit ist auch diese zweite auf dem Einsatz einer ZIC-HILIC Säule basierende Analyseverfahren zur routinemäßigen Überwachung von Lebensmitteln mariner Herkunft bezüglich PSP-Kontaminationen geeignet, wobei hier die gleiche stationäre Phase sowohl für FLD- als auch MS/MS-Bestimmung eingesetzt werden kann.

Determination of tetrodotoxin and its analogs in the puffer fish *Takifugu ablongus* from Bangladesh by hydrophilic interaction chromatography and mass-spectrometric detection

Wie Vergiftungsfälle aus Bangladesch belegen, ist es unbedingt notwendig mit geeigneten Analyseverfahren die Bevölkerung vor TTX-Intoxikationen zu schützen. Nach einem durchgeführten Maus-Bioassay konnten aber nur Aussagen zur Toxizität der Proben getroffen werden, jedoch blieb das auslösende Neurotoxin sowie die genaue Zusammensetzung des Toxinmusters unbekannt. Anhand der analysierten Spezies ließen sich auch keine näheren Informationen bzgl. des zu erwartenden Toxins erhalten, da sowohl PSP-Toxine als auch Tetrodotoxin und seine Analoga in Kugelfischen auftreten können [43; 57-59]. Deshalb sollte ein neues LC-MS/MS Verfahren zur Trennung und Detektion von TTX und TTXs entwickelt werden. Da TTX dem Saxitoxin sowohl in seiner Wirkungsweise als auch den chemischen Eigenschaften sehr ähnlich ist, sollte das Verfahren an die LC-MS/MS Bestimmung der PSP-Toxine angelehnt werden, wobei eine ähnliche Probenaufarbeitung, speziell in Bezug auf die Extraktion, erfolgen sollte. Während zur Chromatographie wieder die bereits bei der PSP-Bestimmung erfolgreich eingesetzte ZIC-HILIC Säule Anwendung finden sollte, lag bei der Detektion der Fokus auf dem Einsatz der Massenspektrometrie.

Besondere Aufmerksamkeit wurde zunächst der möglichst vollständigen Extraktion des sehr polaren TTX zusammen mit der Extraktion von PSP-Toxinen, die durchaus im gleichen Probenmaterial vorliegen können, geschenkt.

Die Ergebnisse hinsichtlich des Extraktionsmittels ergaben, dass sich 0,03 M Essigsäure zur Extraktion von Tetrodotoxin und seinen Analoga ebenso wie zur PSP-Extraktion eignet. Bei beiden Substanzklassen lag die Extraktionsausbeute nach einmaliger Extraktion bei durchschnittlich mehr als 85 %. Die Extraktionsprozedur für TTX gleicht der für die PSP-Bestimmung: Zugabe der 0,03 M HAc, Probenaufschluss mit Ultraschall, Vorfiltration mittels Zentrifuge (16000 g) und danach Ultrafiltration durch Spritzenfilter (0,45 µm, Nylonfilter). Dabei ist es nicht von Bedeutung ob gefriergetrocknetes, luftgetrocknetes oder frisches Probenmaterial extrahiert wird. Somit können TTX und PSP-Toxine gleichzeitig in einem

Schritt extrahiert werden und im Anschluss daran aus dem gleichen Extrakt heraus bestimmt werden. Bei Organismen, die beide Toxine enthalten können, wie z.B. der Kugelfisch, muss nur noch ein Extrakt hergestellt werden, der dann auf das Vorkommen beider Neurotoxine hin untersucht werden kann.

Die guten Resultate bezüglich der Trennung der PSP-Toxine führte zu einer Erprobung der ZIC-HILIC Säule auch im Hinblick auf die Analytik von TTX. Allerdings wurde die Säulendimension an die geänderte Zielstellung, alleiniger Einsatz der MS/MS-Detektion, angepasst. Die verwendete Säule (150 x 2,1 mm) gestattete eine Reduktion des Gesamtflusses des Eluenten von 0,7 mL auf 0,25 mL, wobei der geringere Innendurchmesser außerdem die splitlose Kopplung mit dem Massenspektrometer und somit bessere Ergebnisse bei der Detektion von TTX und TTXs ermöglichte. Die hohe Trennleistung der Säule verbunden mit einer zweistufigen Elution führte zur vollständigen chromatographischen Trennung der wichtigsten Tetrodotoxinanaloga innerhalb von 30 Minuten, so dass alle als Standard erhältlichen Toxine einzeln bestimmt werden können (Abb. 9). Diese separate Quantifizierung ist notwendig, um die Gesamtoxizität einer Probe zu ermitteln, da TTX und TTXs sehr unterschiedliche Toxizitäten aufweisen.

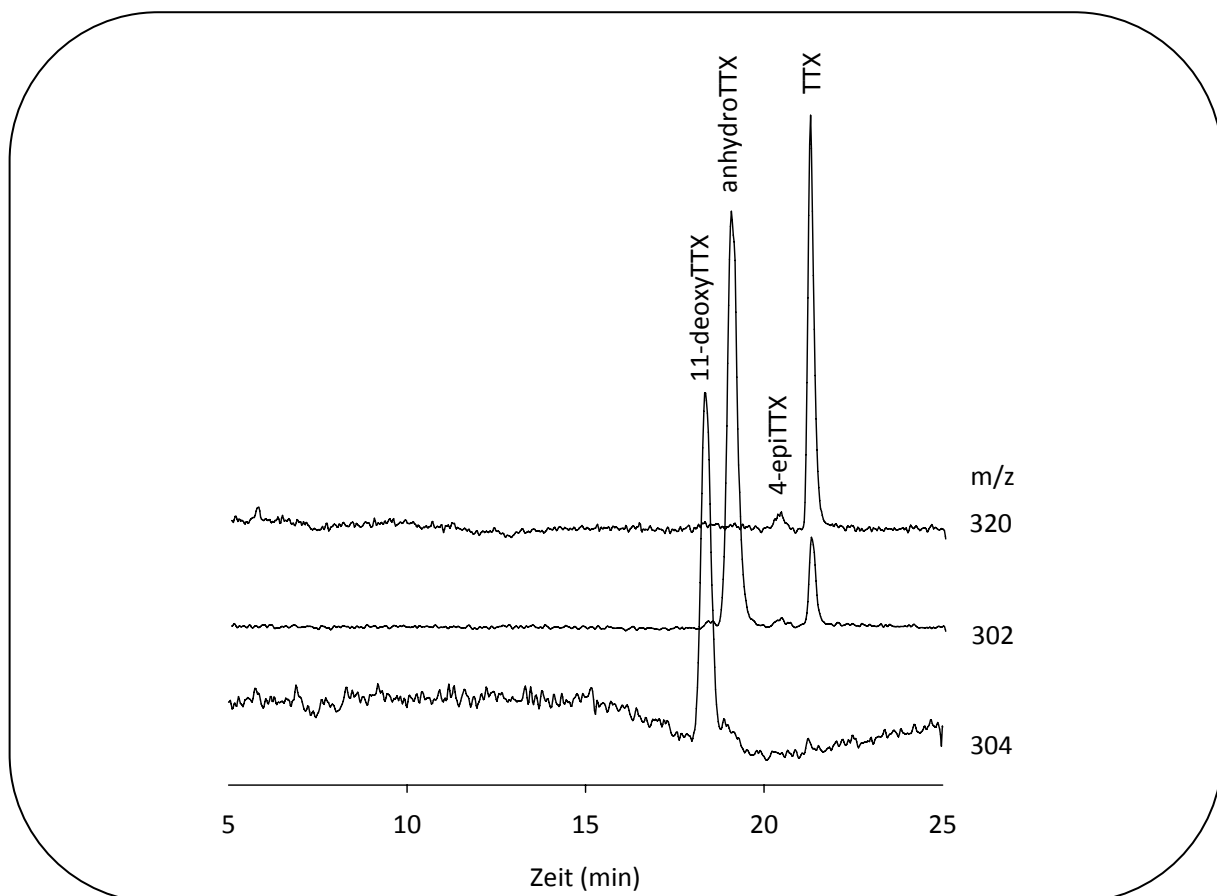


Abb. 9 HILIC-MS Analyse eines TTX-Standards (11-deoxyTTX, anhydroTTX, 4-epiTTX, TTX) [60]

Auch bei der Bestimmung von Tetrodotoxin und seiner Analoga aus natürlich kontaminierten Proben zeigte sich, dass es beim Einsatz der neuen ZIC-HILIC Säule keine Stabilitätsprobleme gibt. Die Retentionszeiten blieben über mehrere hundert Injektionen hinweg konstant.

Nach erfolgter Trennung waren die polaren TTXs direkt massenspektrometrisch zu bestimmen, wobei zur Optimierung der MS/MS-Detektion nur kommerziell erhältliche TTX und TTXs Standardsubstanzen eingesetzt wurden.

Es zeigte sich, dass TTX und seine Analoga bei der verwendeten Elektrospray Ionisierung überwiegend $[M+H]^+$ -Ionen bilden (Abb. 10)

Toxin	Q1 Ion	MRM	Q3 Ion	SIM
	$[M+H]^+$			$[M+H]^+$
TTX	320	>	162	320
anhydroTTX	302	>	162	302
11-deoxyTTX	304	>	164	304
trideoxyTTX	272	>	162	272

Abb. 10 Verwendete MRM-Übergänge und SIM Massen für TTX und TTXs

Fast alle TTXs bilden nach der Kollisionszelle im Q3 das Fragment 162, ein 2-Aminohydroquinazolin, welches auch für die Messungen der MRM-Übergänge als Fragment genutzt wird [50]. Im Vergleich zu den PSP-Toxinen handelt es sich bei TTXs um relativ stabile Moleküle, von denen erst nach Anwendung „stärkerer“ Fragmentierungsbedingungen in der Kollisionszelle intensive Produktionen-Spektren erhalten werden. Diese bilden dann eine gute Basis für das Arbeiten im MRM-Modus zur eindeutigen TTX-Bestimmung. Da TTXs aber auch relative hohe Ausbeuten an $[M+H]^+$ -Ionen im Q1 aufweisen und die Toxine vorher chromatographisch vollständig getrennt wurden, bot sich für die TTX-Bestimmung die etwas empfindlichere Detektion der Toxine im Selected Ion Monitoring (SIM)-Modus an (Abb. 10). Niedrige Puffergehalte (Ammoniumformiat/Ameisensäure) sowie die hohe Konzentration an Acetonitril in der mobilen Phase ermöglichten eine weitere Reduktion der Nachweisgrenzen für TTX und TTXs im Vergleich zu bereits publizierten LC-MS/MS Verfahren [50; 61]. Die Kalibriergeraden für die einzelnen Toxine weisen eine hohe Linearität auf und die relative Standardabweichung für die Standardsubstanzen war kleiner als 5 %.

Aus vier verschiedenen Gewebetypen von *Takifugu ablongus* wurden TTX und TTXs extrahiert und anschließend quantifiziert. Es traten bei keiner Probe Matrixeffekte auf und die jeweilige Quantifizierung mittels SIM-oder MRM-Modus ergaben gleiche Toxingehalte. Es wurde bei allen zur Untersuchung gelangten Fischen sehr hohe Toxinkonzentrationen festgestellt, so dass ein Verzehr von ca. 100 g Fisch zum Tod führen würde. Die höchsten

TTX-Gehalte konnten in den Ovarien sowie der Leber festgestellt werden. Somit enthalten, bezogen auf den gesamten Kugelfisch, die weiblichen Tiere wesentlich mehr Toxine. Die geringsten TTX-Konzentrationen wurden im Muskelgewebe detektiert, wobei speziell TTX in allen Organen die Hauptquellen für deren Toxizität darstellte.

Die vorgestellte LC-MS/MS Methode auf der Basis dieser ZIC-HILIC Säule eignet sich zum sensitiven und selektiven Nachweis von Tetrodotoxin und seinen Analoga. Durch niedrige LODs und eine effektive sowie robuste Trennung kann die Analysemethode zur routinemäßigen Lebensmittelüberwachung im Hinblick auf mögliche durch TTX und TTXs hervorgerufene Intoxikationen eingesetzt werden.

7. Zusammenfassung

7.1. Zusammenfassung

Durch das vermehrte Auftreten von Intoxikationen, verursacht durch PSP-Toxine sowie TTX und seinen Analoga, nimmt die Notwendigkeit für deren analytische Bestimmung zu. Grundlage hierfür bilden internationale Rechtsvorschriften, in denen sowohl für PSP-Toxine als auch TTXs verbindliche Regelungen in Bezug auf den Welthandel mit „Seafood“ festgeschrieben wurden. Die erhöhte Anzahl an PSP-Vergiftung wird auf die Zunahme von Massenvermehrungen der Dinoflagellaten und Cyanobakterien (harmful algal blooms, HABs), verursacht durch globale Erwärmung, zurückgeführt, wobei die Intensivierung der Aquakulturen sowie eine Überfischung der Weltmeere u.a. das Ausweichen auf andere Arten und damit auch zu einer Zunahme an Belastungen mit bestimmten Toxinen (TTXs) mit den beschriebenen Folgen führt.

Sowohl die PSP-Toxine als auch TTXs weisen verschiedene Strukturvarianten auf, die sich vom Saxitoxin (PSP) und Tetrodotoxin (TTXs) ableiten. Dabei sind die strukturellen Gemeinsamkeiten der beiden Toxinklassen mit ihren Guanidinogruppen Ursache für den ähnlichen Wirkmechanismus der Toxine, die Inhibition der Na⁺-Kanäle. Jedoch führen unterschiedlichen Funktionalisierungen innerhalb der beiden Toxingruppen zu unterschiedlichen Toxizitäten (LD₅₀) im Tierversuch.

Internationale Grenzwerte hinsichtlich einer PSP-Kontamination von Lebensmitteln sowie die Prävention von TTX-Intoxikationen machen es erforderlich, zum Schutz der Verbraucher, Lebensmittel, vor allem Muscheln und Fische, auf diese Substanzen hin zu kontrollieren. Hierfür war die Etablierung leistungsfähiger analytischer Verfahren zur eindeutigen und sensitiven Bestimmung der Toxine Voraussetzung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine auf der Ionenpaarchromatographie beruhende Methode nach Thielert *et al.* zur Erfassung der PSP-Toxine (Carbamoyl- und Decarbamoyltoxine) mittels HPLC-FLD, vor allem hinsichtlich der Vermeidung einer Ko-Elution der lebensmittelrechtlich relevanten PSP-Toxine, optimiert werden.

Außerdem war eine LC-MS/MS Methode zu entwickeln, mit der nicht nur die lebensmittelrechtlich relevanten PSP-Toxine detektiert werden können, sondern auch die Strukturvarianten der PSP-Toxine in nur einem chromatographischen Lauf erfasst werden können.

Ein weiteres Ziel der Dissertation stellte die Entwicklung eines LC-MS/MS Verfahren zur Bestimmung von TTX und TTXs dar. Aufgrund ähnlichen physikochemischer Eigenschaften, gleicher neurotoxischer Wirkung sowie ihrem parallelen Vorkommen in Organismen sollte

diese Methode eng an das neue LC-MS/MS Verfahren zur Erfassung der PSP-Toxine angelehnt werden, wobei auch die möglichst vollständige gemeinsame Extraktion der polaren Neurotoxine aus verschiedenen Matrices optimiert werden sollte.

Um die chromatographische Trennung der Carbamoyl- und Decarbamoyltoxine vor der fluorimetrischen Detektion zu erreichen, wurden verschiedene reversed phase HPLC-Säulen sowie unterschiedliche Eluenten getestet. Dabei gelang durch Kombination zweier Ionenpaarbildner, Heptan- und Octansulfonsäure, im Eluenten sowie dem Einsatz einer Luna C₁₈ HPLC-Säule als stationäre Phase die vollständige Trennung der Carbamoyl- und Decarbamoyltoxine.

Eine Vielzahl von sowohl Muscheln als auch Proben von Phytoplankton wurden auf das Vorhandensein von PSP-Toxinen hin untersucht. Es zeigte sich, dass die Ionenpaarchromatographische HPLC-FLD Methode wegen der guten Trennung und konstanter Retentionszeiten sehr gut für Routineuntersuchungen auf PSP-Toxine geeignet ist. Die Kombination aus Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion ermöglicht eine sensitive und kostengünstige Bestimmung der PSP-Toxine. Allerdings erlaubt der Einsatz der Alkylsulfonsäuren keine direkte Kopplung der HPLC-Apparatur mit einem Massenspektrometer. Die LC-MS/MS Kopplung ist jedoch unverzichtbar, wenn auch seltene Strukturvarianten der PSP-Toxine nachzuweisen oder bestimmte Resultate zu überprüfen und abzusichern sind.

Das mit der Entwicklung der LC-MS/MS Methode verfolgte Ziel bestand in einer möglichst vollständigen Trennung der PSP-Toxine unter Verwendung eines MS-gängigen Eluenten. Aus diesem Grund wurde zur Trennung aller 21 bekannten PSP-Toxine die HILIC Chromatographie angewendet. Diese ermöglicht die Trennung von polaren Substanzen, da analog zur Normalphasen-Chromatographie polare stationäre Phasen eingesetzt werden, jedoch mit Puffersystemen, die identisch zur RP-Chromatographie sind. Als flüchtiger und gut MS-gängiger Puffer wurde Ammoniumformiat/Ameisensäure im Eluenten verwendet, so dass diese auch für wasserlösliche Substanzen wie z.B. STX geeignet sind.

Im Gegensatz zur RP-Chromatographie stellt jedoch Wasser im Vergleich zum Acetonitril das stärkere Elutionsmittel dar, weshalb es bereits in geringer Konzentration in der mobilen Phase wirksam ist. Die relativ hohe Konzentration an Acetonitril sowie niedriger Puffergehalt ermöglichen eine effektive Ionisierung der Toxine mittels ESI und daraus resultieren niedrige LODs bei der MS/MS-Detektion.

Da PSP-Toxine als Anionen und Kationen vorliegen, wurde als stationäre Phase ein ZIC-HILIC Säule verwendet, die eine effektive Trennung speziell der Epimere ermöglichte und eine zweistufige Gradientenelution garantierte eine kurze Analysezeit von 40 Minuten. Die verwendete Säule erwies sich als stabil, auch bei vielmaliger Injektion von Extrakten verschiedener Matrices wurden keine Retentionszeitverschiebungen beobachtet. Diese robuste chromatographische Trennung sowie die sensitive und selektive MS/MS-Detektion

unter Nutzung der MRM-Übergänge ermöglichen die eindeutige Bestimmung aller bekannten PSP-Toxine.

Um die Vorteile der guten Epimerentrennung der ZIC-HILIC Säule bei den PSP-Toxinen auch mit der Kombination Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion zu nutzen, wurde die Gradientenelution modifiziert. Andere Pufferverhältnisse, die zu einer Verbesserung der chromatographischen Trennung, jedoch auch zu einer Verlängerung der Analysezeit von 40 auf 70 Minuten führten, ermöglichten die vollständige Trennung der Carbamoyl und Decarbamoyltoxine in nur einem chromatographischen Lauf. Auch hier wurden stabile Retentionszeiten sowie gute Nachweisempfindlichkeiten für die einzelnen PSP-Toxine beobachtet, so dass bei Fehlen einer LC-MS/MS Kopplung der routinemäßige Einsatz dieser HPLC-FLD Methode zur quantitativen Bestimmung von PSP-Toxinen aus Muschel und Phytoplankton zu empfehlen ist.

Durch die erfolgreiche Entwicklung der beiden HPLC-FLD und LC-MS/MS Methoden zur Bestimmung von PSP-Toxinen auf der Basis einer neuen ZIC-HILIC Säule gelang es erstmals die PSP-Toxine sowohl durch FLD als auch MS-Detektion, unter Verwendung der gleichen stationären Phase, zu analysieren. Somit können Routineproben zuerst mit der Kombination aus Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion kostengünstig bezüglich einer PSP-Kontamination analysiert werden. Für den Fall des positiven Nachweises von PSP-Toxinen können die mit Hilfe der HPLC-FLD Methode erhaltenen Resultate jederzeit mit der gleichen Säule durch MS/MS-Bestimmung abgesichert werden.

Für eine gemeinsame Extraktion von PSP-Toxinen und TTX sowie TTXs wurde als Extraktionsmittel 0,03 M Essigsäure getestet. Die Extraktionsausbeuten lagen, sowohl bei frischem als auch bei getrocknetem Probenmaterial, immer über 85 % und somit können beide Toxinklassen, aus Probenmaterial, das potentiell STX und TTX enthalten kann, zukünftig gemeinsam extrahiert werden.

Nach erfolgter effektiver Extraktion kann die LC-MS/MS Bestimmung von TTX und TTXs erfolgen. Hierzu wurden die Erkenntnisse im Hinblick auf eine chromatographische Trennung polarer Substanzen auf die TTX-Analytik übertragen. Durch die Verwendung der neuen ZIC-HILIC Säule konnte, wie schon bei der PSP-Analytik, eine vollständige Trennung der vorhandenen TTX-Variationen erreicht werden. Die zweistufige Gradientenelution garantiert eine kurze Analysenzeit von 30 Minuten. Die niedrigen Puffergehalte (Ammoniumformiat/Ameisensäure) sowie die hohe Konzentration an Acetonitril ermöglichten die gute Ionisierung der Substanzen mittels ESI und die sensitive MS-Bestimmung der Toxine wird mittels SIM oder MRM Modus erreicht. Durch die Analyse von Pufferfischen (vier verschiedene Gewebearten) konnte die neue LC-MS/MS Methode zur TTX-Bestimmung auf ihre Praxistauglichkeit geprüft werden. Dabei konnte eindeutig TTX als Ursache für die Todesfälle identifiziert werden, wohingegen der ebenfalls durchgeführte Maus-Bioassay nur über die Gesamtoxizität Auskunft gibt. Die neu entwickelte LC-MS/MS Methode kann somit

zur routinemäßigen Quantifizierung von Tetrodotoxin und seinen Analoga eingesetzt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es gelungen ist, zwei Methoden zur Bestimmung der PSP-Toxine mittels Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion zu entwickeln, die eine kostengünstige Bestimmung der lebensmittelrechtlich relevanten PSP-Toxine, sowohl mit Hilfe der Ionenpaarchromatographie als auch mit der Hydrophilen Interaktionschromatographie, gestatten.

Außerdem ermöglicht der Einsatz einer neuen ZIC-HILIC Säule die empfindliche LC-MS/MS Bestimmung von PSP-Toxinen sowie Tetrodotoxin. Bei allen neuen Analysenmethoden gelingt die vollständige Trennung der jeweils zu erfassenden Toxine in nur einem chromatographischen Lauf.

Für zukünftige Arbeiten wäre jedoch eine simultane chromatographische Trennung, gefolgt von einer gemeinsamen MS/MS-Detektion der PSP-Toxine sowie TTX und TTXs von Interesse, da im Routinebetrieb der Lebensmittelkontrolle immer häufiger sogenannte „Multikomponenten-Methoden“ zur Bestimmung eingesetzt werden.

7.2. Summary

The increased occurrence of intoxications caused by paralytic shellfish poisoning toxins as well as by tetrodotoxin and analogues demands analytical methods for their detection. International laws for PSP-toxins and TTXs concerning the world trade of seafood constitute the background for the control of seafood. The raised numbers of PSP intoxications are induced by the outbreak of Dinoflagellates and Cyanobacteria (harmful algal blooms, HABs) benefited by global warming. Whereas the intensification of aquacultures and overfishing of the sea results in an accession of toxin exposures with the described consequences.

PSP toxins as well as TTXs show different structure variants, which could be derived from STX (PSP) or Tetrodotoxin (TTXs). Structural conformities like guanidine groups are the reason for the similar biological mechanism of the toxins, inhibition of sodium channels in the human body. Different functional variations of the molecules inside the two toxin groups change the lethal dose (LD₅₀) of each toxin.

International limit values concerning PSP contamination in food or the prevention of TTXs intoxications necessitate controlling seafood with respect to those toxins to secure the consumers. Therefore new capable analytical methods for the reliable and sensitive detection of the toxins were required.

The present thesis should modify an analytical method by Thielert *et al.* based on ion pair chromatography for the determination of PSP toxins (Carbamoyl- and Decarbamoyl-toxins) with HPLC-FLD, to avoid co-elution of the PSP toxins relevant for regulation.

Furthermore the development of a LC-MS/MS method for the detection of all present PSP toxins, not only Carbamoyl- and Decarbamoyltoxins in one chromatographic run was necessary.

Another aim of this work was to develop a LC-MS/MS method for the determination of tetrodotoxin and analogues. Because of the similar physicochemical characteristics as well as the neurotoxic effect and the parallel occurrence in some organisms, this method should be inspired by the process for PSP detection. Whereas a complete and combined extraction of both polar compounds from different matrices should be optimized.

Different types of reversed phased columns and mobile phases were tested to reach the chromatographic separation of the Carbamoyl- and Decarbamoyltoxins before the fluorescence detection. The combination of two ion pair reagents, heptan- and octansulfonic acid, in combination with a Luna C₁₈ column guaranteed their complete separation.

A high amount of mussel and phytoplankton samples was analyzed concerning PSP toxins and it is demonstrated that the ion pair chromatography HPLC-FLD method is well suitable for the routine analysis of PSP toxin in seafood because of the good separation and stabile

retention times. Post column derivatization and fluorescence detection allow the sensitive and cost-efficient determination of the PSP toxins. But the supplementary alkylsulfonic acids complicate the direct coupling of a mass spectrometer. However the LC-MS/MS determination is required for the detection of rare PSP structures or to ensure positive results.

One of the targets during the development of the new LC-MS/MS method was the complete separation of the PSP toxins by using an adapted mobile phase for the MS detection. For this reason the HILIC chromatography was applied to separate all known 21 PSP toxins. This kind of chromatography allows the isolation of polar compounds because of the present polar stationary phase similar to the normal phase chromatography, but with eluent mixtures, e.g. buffers, analog to the reversed phase chromatography. Therefore an ammonium format/formic acid buffer was used in the mobile phase to separate the hydrophilic toxins like STX.

In contrast to the RP chromatography water is the strongest elution substance compared to acetonitrile, therefore water is not the major compound of the mobile phase. The high concentration of organic solution provides the effective ionization of the PSP toxins using electro spray ionization combined with low LODs for the MS/MS detection.

PSP toxins can occur as cations and anions. Hence a zwitterionic HILIC column was used to guarantee an effective separation of the PSP toxins, especially of the epimeres and a two step gradient formation allows short run times of 40 minutes. This robust chromatographic separation in combination with a selective and sensitive MS/MS detection by MRM transition enables the clear determination of all noted PSP toxins.

To apply the advantages of the good isolation of the PSP epimeres by the ZIC-HILIC column also for post column derivatization and fluorescence detection the gradient elution was modified. Adapted buffer concentration improves the chromatographic separation of the Carbamoyl- and Decarbamoyltoxins agglutinating with a longer run time of 70 minutes. Stable retention times and low limit of detections for each PSP toxin could be observed. For this reason the present HPLC-FLD method could be applied for routinely control of mussels or phytoplankton.

The successful development of both HPLC-FLD and LC-MS/MS methods for the determination of PSP toxins based on the new ZIC-HILIC column allows the detection by FLD as well as by MS with the same stationary phase for the first time. Therefore routine samples could first analyzed by the cost-saving combination of post column derivatization and fluorescence detection concerning a PSP contamination. In case of positive results of PSP by HPLC-FLD the findings can be proven with the same column by LC-MS/MS.

For the simultaneous extraction of PSP toxins and TTXs 0.03 M acetic acid was tested. The extraction recoveries for both fresh and dried material average more than 85 % for both

toxin groups. Therefore STX and TTX can be extracted in parallel from potentially toxic sample material.

After the effective extraction tetrodotoxin and its analogues can be determined by LC-MS/MS. Based on these cognitions concerning the separation of polar compound were transferred to the TTX analytic. The new ZIC-HILIC enables the complete separation of all present TTX variations as by the previous PSP analytic. Short run time of 30 minutes is realized by a two step gradient. Low buffer concentrations (ammonium format/formic acid) and high percentage of acetonitrile allow a good ionization via ESI followed by the sensitive MS detection of the toxins using SIM or MRM transition. In the analysis of puffer fish (four different tissues) the new LC-MS method was proven concerning the suitability in the routine analysis. Furthermore TTX could be identified as the cause of death after consuming puffer fish, whereas the performed mouse bioassay only determines the toxicity of the sample. The newly developed LC-MS/MS method could be applied for the routinely quantification of tetrodotoxin and its analogues.

To sum up two methods for the determination of PSP toxins by post column derivatization and fluorescence detection, based on ion pair and hydrophilic interaction chromatography for the cost-saving detection of the regulation relevant PSP toxins were developed.

In addition it's possible to determine PSP toxins and TTXs by the sensitive and selective quantification via LC-MS/MS by application of the new ZIC-HILIC column. All presented analytical methods enable the complete separation of the needed toxins in one chromatographic run.

For future projects it would be interesting to develop a "multi compound method" for the simultaneously chromatographic separation followed by the parallel MS/MS detection of PSP toxins and TTXs.

8. Literaturverzeichnis

- 1 Dale, B., and Yentsch, C. M. (1978). Red tide and paralytic shellfish poisoning. *Oceanus* **21**, 41-49.
- 2 Mold, J. D., Bowden, J. P., Stanger, D. W., Maurer, J. E., Lynch, J. M., Wyler, R. S., Schantz, E. J., and Riegel, B. (1957). Paralytic shellfish poison. VII. Evidence for the purity of the poison from toxic clams and mussels. *Journal of American Chemical Society* **79**, 5235-5238.
- 3 Schantz, E. J., Ghazarossian, V. E., Schnoes, H. K., and Strong, F. M. (1975). The Structure of Saxitoxin. *Journal of American Chemical Society* **97**, 1238-1239.
- 4 WHO (2006). http://www.who.edu/redtide/HABdistribution/PSP_worldmap_1970-2006.jpg.
- 5 Steidinger, K. A. (1993). *Some taxonomic and biologic aspects of toxic dinoflagellates*. Academic, London.
- 6 Mahmood, N. A., and Carmichael, W. W. (1986). Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. *Toxicon* **24**, 175-86.
- 7 Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P. A., Andrinolo, D., Azevedo, S. M. F. Q., and Oshima, Y. (1999). The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* **37**, 1359-1373.
- 8 Humpage, A. R., Rositano, J., Bretag, A. H., Brown, R., Baker, P. D., Nicholson, B. C., and Steffensen, D. A. (1994). Paralytic shellfish poisons from Australian cyanobacterial blooms. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* **45**, 761-71.
- 9 Wright, J. L. C. (1995). Dealing with seafood toxins: present approaches and future options. *Food Research International* **28**, 347-358.
- 10 Luckas, B., and Botana Luis, M. (2000). In Chemical analysis of PSP toxins, pp. 173-186. Marcel Decker, Inc., New York, Basel.
- 11 Hall, S., Strichartz, G. R., Moczydlowski, E., Ravindran, A., and Reichardt, P. B. (1990). The saxitoxins: sources, chemistry, and pharmacology (S. Hall and G. R. Strichartz, eds.), Vol. ACS Symposium Series 418, pp. 29-65. American Chemical Society, Washington, D.C.
- 12 Oshima, Y., Sugino, K., and Yasumoto, T. (1989). Latest advances in HPLC analysis of paralytic shellfish toxins (S. Natori, K. Hashimoto and Y. Ueno, eds.), pp. 319-326. Elsevier, Tokyo.
- 13 Shimizu, Y., Herz, W., Grisebach, H., and Kirby, G. W. (1984). Paralytic shellfish poisons. In *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, pp. 235-264. Springer-Verlag, NY.
- 14 Oshima, Y., Lassus, P., Arzul, G., Errad, E., Gentien, P., and Marcaillou, C. (1995). In Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms, pp. 475-480. Intercept Ltd., Lavoisier.
- 15 Koehn, F. E., Hall, S., Wichmann, C. F., Schnoes, H. K., and Reichardt, P. B. (1982). Dinoflagellate neurotoxins related to saxitoxin: structure and latent activity of toxins B1 and B2. *Tetrahedron Letters* **23**, 2247-8.
- 16 Shimizu, Y., and Yoshioka, M. (1981). Transformation of paralytic shellfish toxins as demonstrated in scallop homogenates. *Science* **212**, 547-549.
- 17 Sullivan, J. J., Iwaoka, W. T., and Liston, J. (1983). Enzymatic transformation of PSP toxins in the littleneck clam (*Protothaca staminea*). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **114**, 465-72.

- 18 Strichartz G, R. T., Hall S, Gitschier J, Hall L, Magnani B, and Bay CH, (1986). On the Mechanism by Which Saxitoxin Binds to and Blocks Sodium-Channels. *Annals of the New York Academy of Sciences* **479**, 96-112.
- 19 Schantz EJ (1986). Chemistry and Biology of Saxitoxin and Related Toxins. *Annals of the New York Academy of Sciences* **479**, 15-23.
- 20 Hall, S., Darling, S. D., Boyer, G. L., Reichardt, P. B., and Liu, H. W. (1984). Dinoflagellate neurotoxins related to saxitoxin: structures of toxins C3 and C4, and confirmation of the structure of neosaxitoxin. *Tetrahedron Letters* **25**, 3537-8.
- 21 Oshima, Y. (1995). *Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms*. Lavoisier, Paris.
- 22 Bates, H. A., and Rapoport, H. (1975). Chemical assay for saxitoxin, the paralytic shellfish poison. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **23**, 237-9.
- 23 International, A. (1995). Paralytic shellfish poison, biological method. In *Official Methods of Analysis*, Vol. 14th Edition, pp. Chapter 35, pp. 21-22. AOAC International, Arlington, VA.
- 24 Luckas, B. (1992). Phycotoxins in seafood - toxicological and chromatographic aspects. *J. Chromatogr.* **624**, 439-456.
- 25 Lawrence, J. F., Niedzwiadek, B., and Menard, C. (2005). Quantitative Determination of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish Using Prechromatographic Oxidation and Liquid Chromatography With Fluorescence Detection: Collaborative Study. *Journal of AOAC International* **88**, 1714-1732.
- 26 Sullivan, J. J., and Iwaoka, W. T. (1983). High-pressure liquid chromatographic determination of toxins associated with paralytic shellfish poisoning. *Journal of Association Official Analytical Chemistry* **66**, 297-303.
- 27 Thielert, G., Kaiser, I., and Luckas, B. (1991). HPLC determination of PSP toxins (J. M. Fremy, ed., pp. 121-125. Centre National d'Etudes Veterinaires et Alimentaires, Paris.
- 28 Oshima, Y. (1995). Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *Journal of AOAC International* **78**, 528-532.
- 29 Dell'Aversano C., Hess P., and Quilliam M. A. (2005). Hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. *Journal of Chromatography A* **1081**, 190-201.
- 30 Taleb, H., Vale, P., Jaime, E., and Blaghen, M. (2001). Study of paralytic shellfish poisoning toxin profile in shellfish from the Mediterranean shore of Morocco. *Toxicon* **39**, 1855-1861.
- 31 Dell'Aversano, C., Eaglesham, G. K., and Quilliam, M. A. (2004). Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1028**, 155-164.
- 32 Yasumoto, T., and Yotsu-Yamashita, M. (1996). Chemical and etiological studies on tetrodotoxin and its analogs. *Journal of Toxicology Toxin Reviews* **15**, 81-90.
- 33 Yotsu-Yamashita, M., and Mebs, D. (2003). Occurrence of 11-oxotetrodotoxin in the red-spotted newt, *Notophthalmus viridescens*, and further studies on the levels of tetrodotoxin and its analogues in the newt's efts. *Toxicon* **41**, 893-897.
- 34 Fuhrman, F. A. (1986). Tetrodotoxin, tarichatoxin, and chiriquitoxin: historical perspectives. In *Tetrodotoxin, Saxitoxin, Mol. Biol. Sodium Channel*, pp. 1-14, *Annals of the New York Academy of Sciences*.

- 35 Yotsu-Yamashita, M., Mebs, D., and Flachsenberger, W. (2007). Distribution of tetrodotoxin in the body of the blue-ringed octopus (*Hapalochlaena maculosa*). *Toxicon* **49**, 410-412.
- 36 Liu, F. M., Fu, Y. M., and Shih, Y. C. (2004). Occurrence of tetrodotoxin poisoning in *Nassarius papillosus Alectrion* and *Nassarius gruneri Niotta*. *Journal of Food and Drug Analysis* **12**, 189-192.
- 37 Yasumoto, T., Nagai, H., Yasumura, D., Michishita, T., Endo, A., Yotsu, M., and Kotaki, Y. (1986). Interspecies distribution and possible origin of tetrodotoxin. *Annals of the New York Academy of Sciences* **479**, 44-51.
- 38 Yotsu-Yamashita, M., Mebs, D., and Yasumoto, T. (1992). Tetrodotoxin and its analogues in extracts from the toad *Atelopus oxyrhynchus*. *Toxicon* **30**, 1489-1492.
- 39 Yotsu-Yamashita, M., and Mebs, D. (2001). The levels of tetrodotoxin and its analogue 6-epitetrodotoxin in the red-spotted newt, *Notophthalmus viridescens*. *Toxicon* **39**, 1261-1263.
- 40 Pires, O. R., Sebben, A., Schwartz, E. F., Bloch, C., Morales, R. A. V., and Schwartz, C. A. (2003). The occurrence of 11-oxotetrodotoxin, a rare tetrodotoxin analogue, in the brachycephalidae frog *Brachycephalus ephippium*. *Toxicon* **42**, 563-566.
- 41 Goto, T., Kishi, Y., Takahashi, S., and Hirata, Y. (1965). Tetrodotoxin. *Tetrahedron* **21**, 2059-88.
- 42 Kishi, Y., Fukuyama, T., Aratani, M., Nakatsubo, F., Goto, T., Inoue, S., Tanino, H., Sugiura, S., and Kakoi, H. (1972). Synthetic studies on tetrodotoxin and related compounds. IV. Stereospecific total syntheses of DL-tetrodotoxin. *Journal of American Chemical Society* **94**, 9219-21.
- 43 Nakamura, M., and Yasumoto, T. (1985). Tetrodotoxin derivatives in puffer fish. *Toxicon* **23**, 271-276.
- 44 Yotsu-Yamashita, M., and 20:51-66, T. R. (2001). CHEMISTRY OF PUFFER FISH TOXIN. *Toxin Reviews* **20**, 51-66.
- 45 Kao, C. Y. (1966). Tetrodotoxin, Saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. *Pharmacological Reviews* **18**, 997-1049.
- 46 Mosher, H. S. (1986). The chemistry of tetrodotoxin. *Annals of the New York Academy of Sciences* **479**, 32-43.
- 47 Jang, J., and Yotsu-Yamashita, M. (2006). Distribution of tetrodotoxin, saxitoxin, and their analogs among tissues of the puffer fish *Fugu pardalis*. *Toxicon* **48**, 980-987.
- 48 Horie, M., Kobayashi, S., Shimizu, N., and Nakazawa, H. (2002). Determination of tetrodotoxin in puffer-fish by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *The Analyst* **127**, 755-759.
- 49 Yasumoto, T., and Michishita, T. (1985). Fluorometric determination of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography. *Agricultur Biology and Chemistry* **49**, 3077-80.
- 50 Shoji, Y., Yotsu-Yamashita, M., Miyazawa, T., and Yasumoto, T. (2001). Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Tetrodotoxin and Its Analogs: Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, Tandem Mass Spectrometry, and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry* **290**, 10-17.
- 51 Suenaga, K., and Kotoku, S. (1980). Detection of tetrodotoxin in autopsy material by gas chromatography. *Archives of Toxicology* **44**, 291-297.
- 52 Nagashima, Y., Nishio, S., Noguchi, T., Arakawa, O., Kanoh, S., and Hashimoto, K. (1988). Detection of tetrodotoxin by thin-layer chromatography/fast atom bombardment mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **175**, 258-62.

- 53 Diener, M., Erler, K., Hiller, S., Christian, B., and Luckas, B. (2006). Determination of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins in dietary supplements by application of a new HPLC/FD method. *European Food Research and Technology* **224**, 147-151.
- 54 Sleno L, Volmer DA, Kovacevic B, and Maksic ZB (2004). Gas-phase dissociation reactions of protonated saxitoxin and neosaxitoxin. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **15**, 462-477.
- 55 Botana, L. M., Rodruiguez-Vieytes, M., Alfonso, A., and Louzao, M. C. (1996). Phycotoxins: paralytic shellfish poisoning and diarrhetic shellfish poisoning. *Food Science Technology* **77**, 1147-1169.
- 56 Diener, M., Erler, K., Christian, B., and Luckas, B. (2007). Application of a new zwitterionic hydrophilic interaction chromatography column for determination of paralytic shellfish poisoning toxins. *Journal of Separation Science* **30**, 1821-1826.
- 57 Nakamura, M., Oshima, Y., and Yasumoto, T. (1984). Occurrence of saxitoxin in puffer fish. *Toxicon* **22**, 381-385.
- 58 Yotsu-Yamashita, M. (2001). CHEMISTRY OF PUFFER FISH TOXIN. *Toxin Reviews* **20**, 51-66.
- 59 Nakashima, K., Arakawa, O., Taniyama, S., Nonaka, M., Takatani, T., Yamamori, K., Fuchi, Y., and Noguchi, T. (2004). Occurrence of saxitoxins as a major toxin in the ovary of a marine puffer *Arothron firmamentum*. *Toxicon* **43**, 207-212.
- 60 Diener, M., Christian, B., Ahmed, M. S., and Luckas, B. (2007). Determination of tetrodotoxin and its analogs in the puffer fish *Takifugu ablongus* from Bangladesh by hydrophilic interaction chromatography and mass-spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**, 1997-2002.
- 61 Nakagawa, T., Jang, J., and Yotsu-Yamashita, M. (2006). Hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of tetrodotoxin and its analogs. *Analytical Biochemistry* **352**, 142-144.

9. Eigenständigkeitserklärung

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

Mittwoch, 06. Februar 2008




Ehrenwörtliche Erklärung

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.

Mittwoch, 06. Februar 2008

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Anschrift	Kastanienstr. 4 07747 Jena  03641/226132  0176/24176101  diener.marc@googlemail.com
Geburtsdatum	26.07.1979
Geburtsort	Zeitz, Sachsen Anhalt
Familienstand	ledig, keine Kinder

Studium und Berufsbildung

04.2004 – 03.2008	Friedrich-Schiller-Universität, Jena Doktorarbeit am Lehrstuhl Lebensmittelchemie
10.1999 – 03.2004	Friedrich-Schiller-Universität, Jena Studium der Ernährungswissenschaften Abschluss: Diplom- Ernährungswissenschaftler
09.1998 – 06.1999	Wehrdienst, Bundeswehr

Schulbildung

08.1991 – 07.1998	Albert-Schweitzer-Gymnasium, Gera Abschluss: Abitur
08.1986 – 07.1991	Fritz Gäbler POS, Gera

Sonstiges

	Teilnahme an wissenschaftlichen Austauschprogrammen
11.2006	Auslandsaufenthalt in Qingdao, China Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences
10.2005	Auslandsaufenthalt in Brisbane, Australien Queensland Health
10.2004	Auslandsaufenthalt in La Paz, Mexiko Northwestern Center of Biological Research

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein Dank gilt Prof. Dr. Bernd Luckas für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung der Dissertation. Ich danke ihm für seine Unterstützung dieser Arbeit sowie die konstruktiven Diskussionen und Anregungen. Er ermöglichte mir die Teilnahme an internationalen Kongressen, sowie im Rahmen von Forschungsaufenthalten, Erfahrungen im wissenschaftlichen Austausch zu sammeln.

Danken möchte ich Doreen Schachtschabel für ihre sowohl fachliche als auch moralische Unterstützung während der gesamten Dissertation und bei der Fertigstellung meiner Arbeit. Ebenso danke ich meiner Familie, die durch ihre Unterstützung und Zuversicht ihren Beitrag geleistet haben.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Lehrstuhls Lebensmittelchemie möchte ich für die gute Teamarbeit und Hilfsbereitschaft danken, insbesondere Katrin Erler für die sehr gute Zusammenarbeit auf dem Gebiet der PSP-Toxine, Dr. Bernd Christian für die Hilfe bei mehreren Publikationen und Elke Stoll für die Unterstützung bei der Probenaufarbeitung.

Dank schulde ich den Wissenschaftlern, die mir Probenmaterial für die Analysen zur Verfügung gestellt haben: Dr. Ernani Pinto (Universität Sao Paulo, Brasilien), Dr. Geoff Eaglesham (Queensland Health Scientific Service, Australien), Dr. Peter Henriksen (Universität Kopenhagen, Dänemark) und Dr. Md Sagir Ahmed (Universität Dhaka, Bangladesch).