

Bestimmung von lipophilen Algantoxinen mittels HPLC-MS/MS

J. Bauer, Geestland/D, N. Helle, Geestland/D, F. Chmelka, Geestland/D, H. Riering, Düren/D
Dr. Judith Bauer, TeLA GmbH, Handelpark 4-6, Geestland/D

Einleitung

Nach dem Verzehr von Muschelfleisch treten beim Menschen immer wieder Vergiftungserscheinungen wie starke Übelkeit oder Lähmungen auf. Die Vergiftungserscheinungen werden von Phycotoxinen (Algantoxinen) verursacht, die von speziellen Algenarten gebildet werden. Diese wiederum werden von den Muscheln aufgenommen und reichern sich in deren Gewebe an.



Abb. 1: Miesmuscheln, Herzmuscheln, Austern (v. l. n. r.)

Es gibt drei Gruppen relevanter mariner Phycotoxine, wobei die Einteilung anhand des auftretenden Krankheitsbildes sowie der Struktur erfolgt:

- 1) Die PSP-Gruppe (paralytic shellfish poisoning, Algantoxine, die paralytische Lähmungen auslösen)
- 2) Die ASP-Gruppe (amnesic shellfish poisoning, Algantoxine, die amnestische Lähmungen auslösen)
- 3) Die Gruppe der lipophilen Toxine (historisch: DSP-Gruppe: diarrhetic shellfish poisoning, Toxine, die diarrhoetischen Durchfall auslösen)

Durch die zunehmende Ausbreitung der toxischen Algen in den Weltmeeren und der steigenden Anzahl an registrierten Fällen von Erkrankungen, die auf den Verzehr von Muscheln zurückzuführen waren, forderten Verbraucherschützer weltweit ein Kontrollsystem zur Regelung der Gehalte an Phycotoxinen. In Europa sind die zugelassenen Höchstmengen der einzelnen marinen Biotoxine durch die Verordnungen der Europäischen Kommission [1, 2] geregelt. Muscheln dürfen, im ganzen Tierkörper oder in allen essbaren Teilen gesondert gemessen, keine Gesamtmengen enthalten von mehr als:

- A. 800 µg/kg, der Lähmungen hervorrufenden Algantoxinen (Paralytic Shellfish Poison - PSP)
- B. 20 mg/kg, der Amnesie hervorrufenden Domoinsäuren (Amnesic Shellfish Poison - ASP)
- C. 160 µg Okadasäure-Äquivalent je Kilogramm bestimmt als Summe von Okadasäure, Dinophysistoxinen und Pectenotoxinen
- D. 3,75 mg Yessotoxin-Äquivalent je Kilogramm und
- E. 160 µg Azaspiracid-Äquivalent je Kilogramm bestimmt als Summe von Azaspiracid-1, -2 und -3.

In Europa sind die lipophilen Algantoxine die am häufigsten vorkommenden Algantoxine. Ihr Nachweis erfolgt in der Regel mittels Reversed Phase HPLC mit massenspektrometrischer Detektion [3]. Zu den lipophilen Algantoxinen zählen die Okadasäuregruppe, die Azaspirosäuren sowie die Pectenotoxine.

In dieser Arbeit soll eine HPLC-Methode vorgestellt werden, welche die Toxine der Okadasäuregruppe, die Azaspirosäuren sowie die Pectenotoxine erfasst. Ziel war es eine geeignete Säule zur Trennung der einzelnen Substanzen zu finden. Die Herausforderung liegt dabei darin, dass es sich bei zwei Toxinen der Okadasäuregruppe – Okadasäure und Dinophysistoxin-2 – um Strukturisomere handelt (siehe Abb. 2).

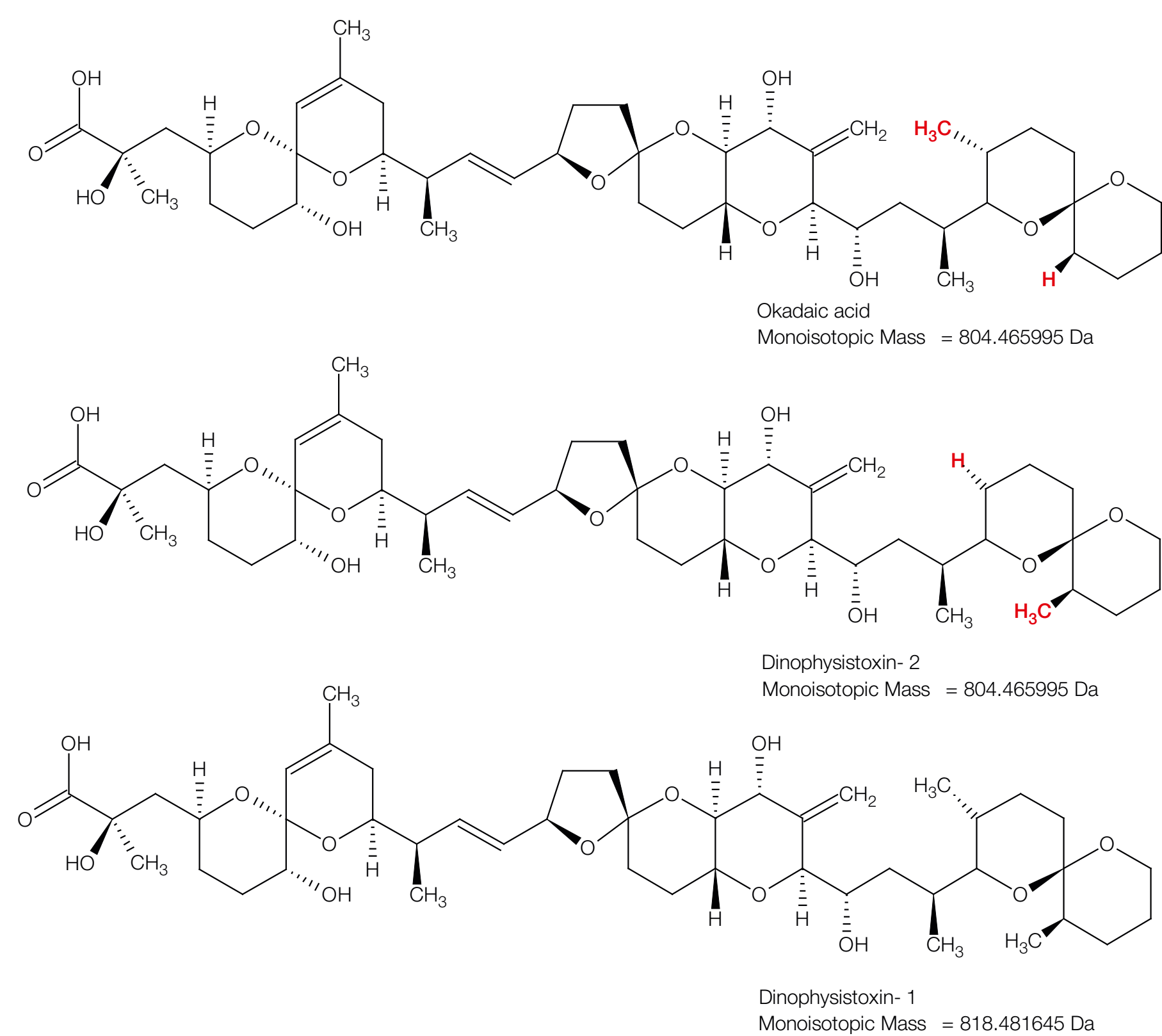


Abb. 2: Chemische Strukturen der Verbindungen OA, DTX-2 und DTX-1

Chromatographische Bedingungen

Eluent A:	50mM Ameisensäure	Flussrate:	0,3 mL/min
Eluent B:	Methanol	Temperatur:	40 °C
Gradient:	0 min – 79% Eluent B 4 min – 79% Eluent B 4.1 min – 83% Eluent B 15 min – 86% Eluent B 15.1 min – 98% Eluent B 18 min – 98% Eluent B 18.1 min – 79% Eluent B	Injektionsvolumen:	10 µL
		Detektion:	Agilent Triple Quadrupole 6460
		Quelle:	Agilent Jetstream ESI positiv

Ergebnisse

Eine chromatographische Trennung dieser Substanzen ist erforderlich, da eine massenspektrometrische Unterscheidung nicht möglich ist und die beiden Toxine unterschiedliche Toxizitäten besitzen. Eine separate Quantifizierung ist daher zur Beurteilung einer belasteten Probe unbedingt notwendig.

In einer belasteten Probe werden die gefundenen Konzentrationen der Einzelsubstanzen anhand von Toxizitätsäquivalentfaktoren (TEF) umgerechnet und als Total-OA-Äquivalent angegeben. Okadasäure und Dinophysistoxin-1 besitzen dabei einen TEF von 1. Dinophysistoxin-2 hat einen TEF von 0,6.

Die Abb. 3 zeigt ein Standardgemisch der Azaspirosäuren-1, -2, -3 sowie der Okadasäure und Dinophysistoxin-1 und -2. Zur Trennung wurde eine C₁₈-Phase eingesetzt und die Elution wurde weitestgehend optimiert, nichtsdestotrotz konnte keine Basislinientrennung für Okadasäure und Dinophysistoxin-2 erreicht werden. Zudem zeigen die Azaspirosäuren im vorderen Bereich des Chromatogramms verbreiterte Peakformen und Peak-Fronting-Effekte.

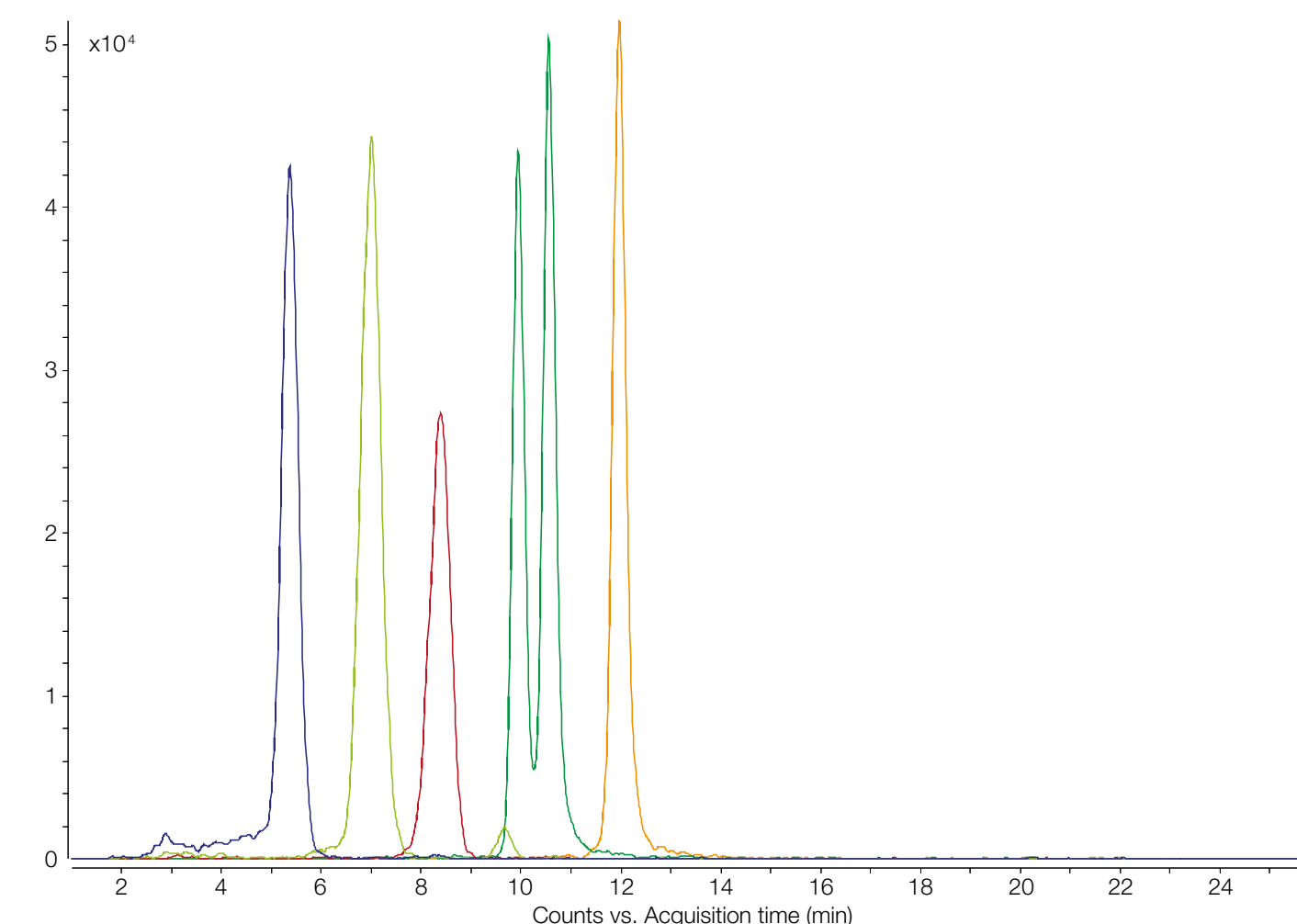


Abb. 3: C₁₈-Phase Standardgemisch AZA3, AZA1, AZA2, OA, DTX-2, DTX-1

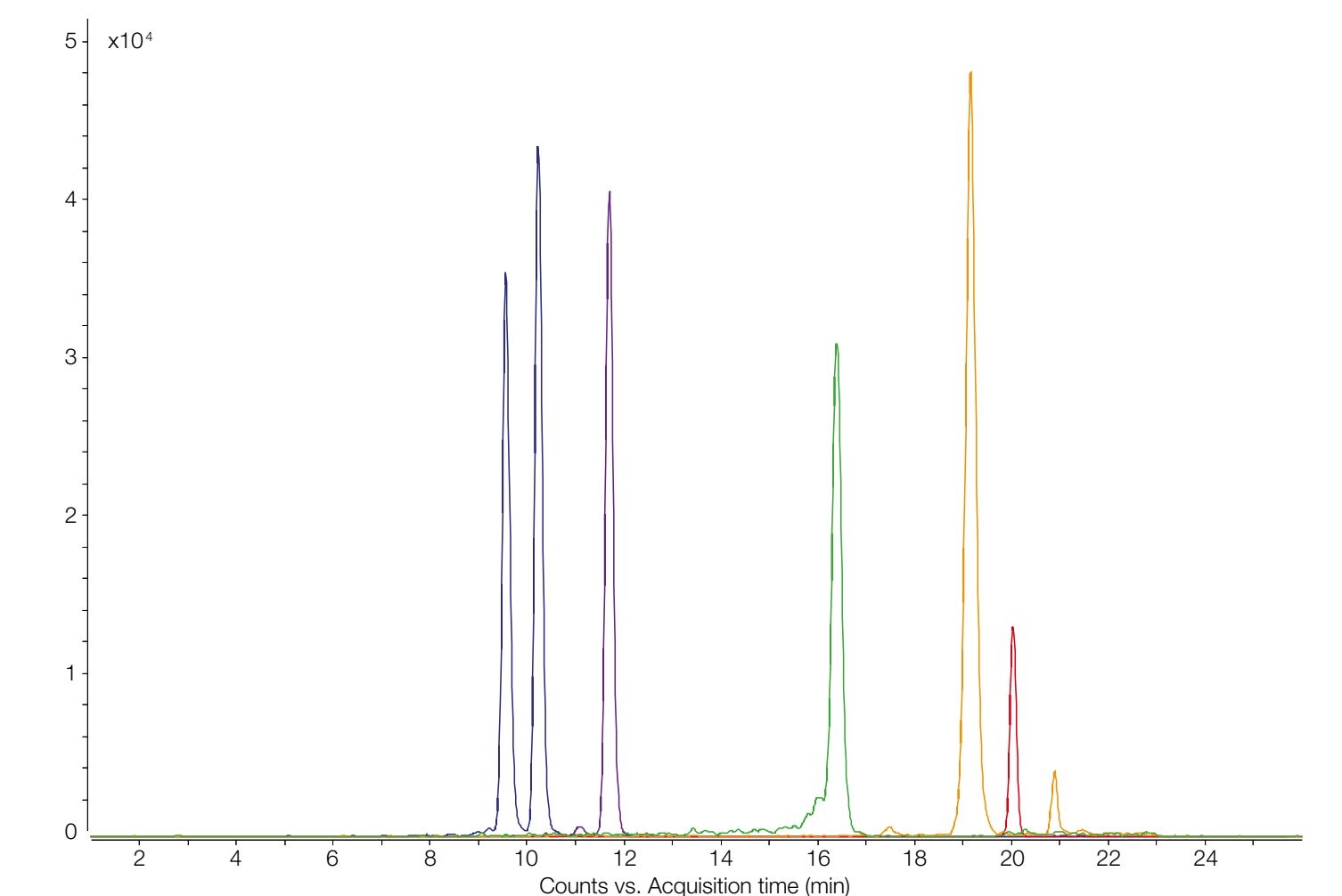


Abb. 4: NUCLEOSHELL® Biphenyl Standardgemisch (OA, DTX2, DTX1, AZA3, AZA1, AZA2)

Stationäre Phasen mit Biphenylliganden zeigen im Gegensatz zu RP18-Phasen eine gute Selektivität zur Trennung der Okadasäure und des Dinophysistoxin-2. Bereits mit NUCLEODUR® π² (MACHEREY-NAGEL), einem vollporösen Kieselgel (5 µm) mit Biphenylmodifizierung gelingt eine Trennung dieser Substanzen mit der Auflösung von 1.1. Im Gegensatz dazu wird eine Basislinientrennung mit NUCLEOSHELL® Biphenyl, 2.7 µm (ebenfalls MACHEREY-NAGEL) erzielt. Die bessere Trennleistung dieses Materials beruht auf dem Einsatz eines Core shell-Kieselgels und der kleineren Partikelgröße. Auch die Azaspirosäuren eluieren mit einer guten Peakform (siehe Abb. 4).

Abb. 5 zeigt die Chromatogramme einer mit Okadasäure und DTX-2 belasteten Muschelprobe. Das obere Chromatogramm zeigt die Trennung auf der NUCLEOSHELL® Biphenyl Phase, das untere Chromatogramm auf der NUCLEODUR® π² Phase.

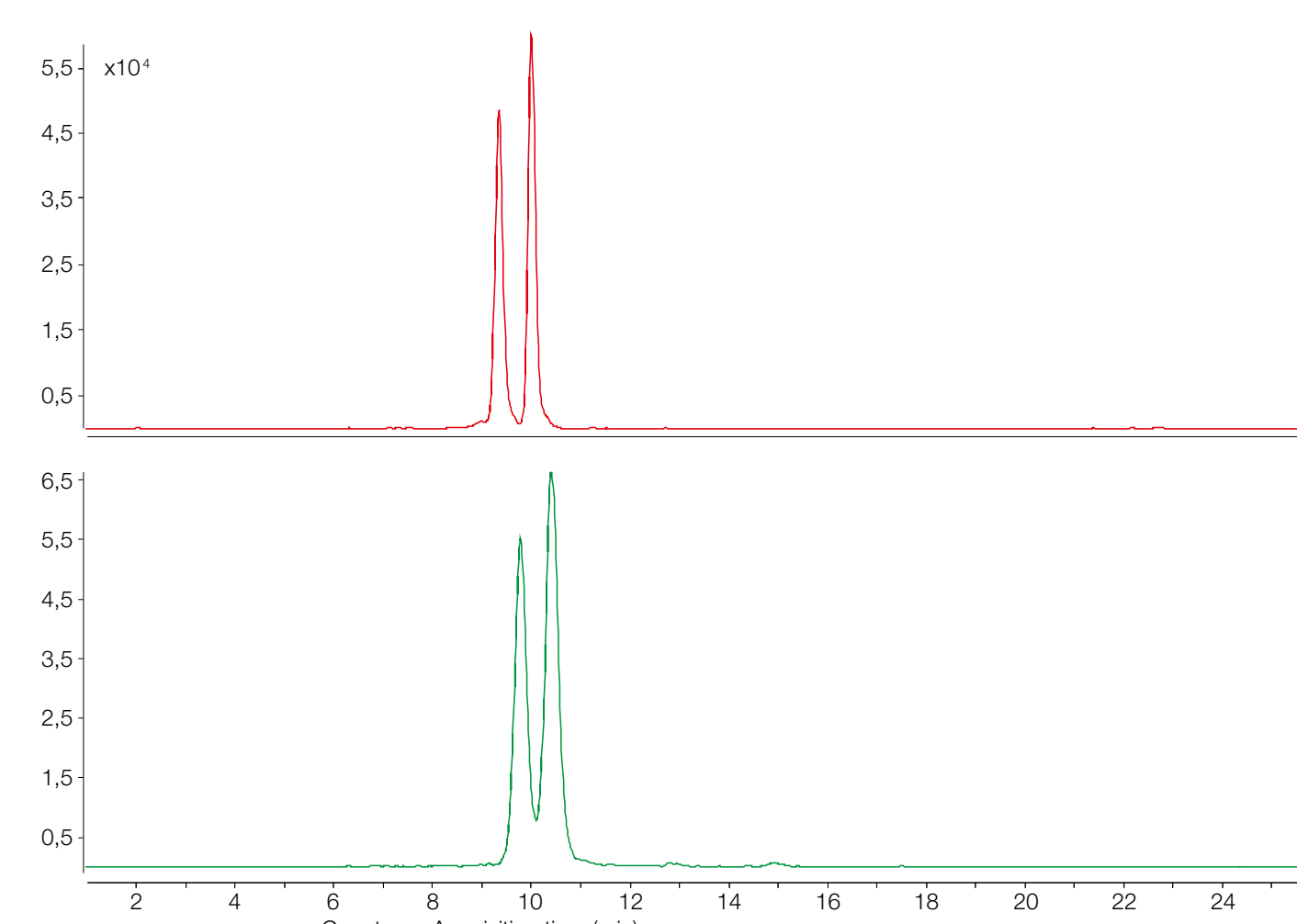


Abb. 5: Mit OA und DTX-2 belastete Muschelprobe auf NUCLEOSHELL® Biphenyl (oben) und NUCLEODUR® π² (unten)

Analyt	Q1 (Precursor)	Q2 (Product)
Okadasäure/DTX-2:	827,5	809,4
Okadasäure/DTX-2:	827,5	723,4
DTX-1:	841,5	823,4
DTX-1:	841,5	737,4
AZA-1:	842,5	824,4
AZA-1:	842,5	806,4
AZA-2:	856,5	838,4
AZA-2:	856,5	820,4
AZA-3:	828,5	810,4
AZA-3:	828,5	792,4

Tab. 1: MRM Übergänge

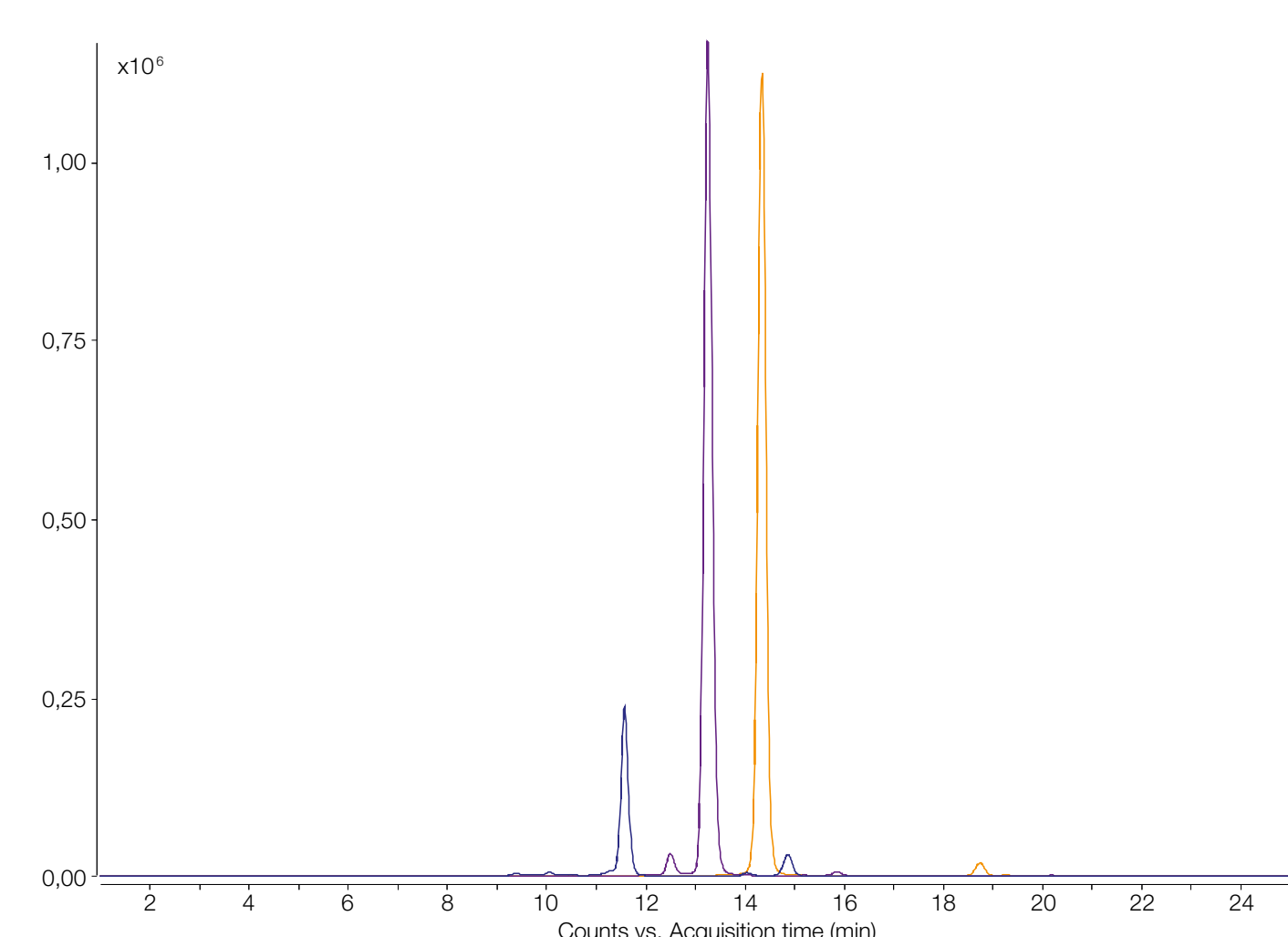


Abb. 6: Mit AZA-3, AZA-1 und AZA-2 belastete Muscheln auf NUCLEOSHELL® Biphenyl

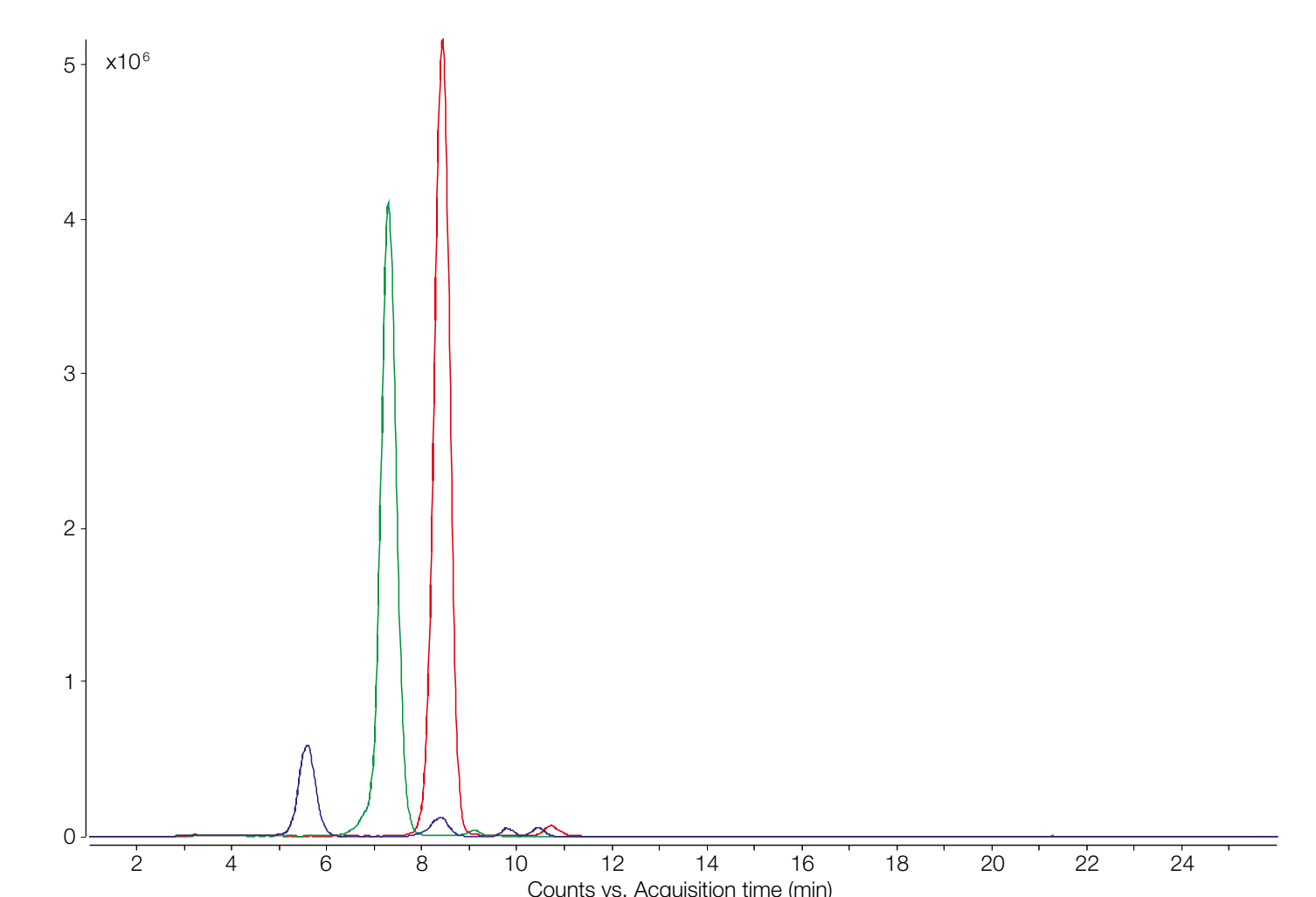


Abb. 7: Mit AZA-3, AZA-1 und AZA-2 belastete Muscheln auf NUCLEODUR® π²

Zusammenfassung

Biphenylmodifizierte Kieselgele wie NUCLEODUR® π² und NUCLEOSHELL® Biphenyl zeigen interessante Selektivitätsunterschiede zu RP18-Phasen. Dies betrifft nicht nur aromatische Verbindungen, auch nichtaromatische Verbindungen können starke Wechselwirkungen mit dieser Oberflächenmodifizierung eingehen. Steroide sind hierfür gängige Beispiele [4]. Auch für die hier untersuchten Algantoxine zeigen Biphenylliganden sehr gute Selektivitäten. Die beiden Strukturisomere OA und DTX-2 werden gut getrennt, die Azaspirosäuren zeigen neben längeren Retentionszeiten eine deutlich bessere Peakform und somit eine leichtere Quantifizierung der Toxine. Durch die Verwendung NUCLEOSHELL® Biphenyl (Core shell Kieselgel 2,7 µm) gelingt eine Basislinientrennung der Strukturisomeren.

Literatur:

- [1] VERORDNUNG (EG) NR. 853/2004 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 29. April 2004.
- [2] VERORDNUNG (EU) NR. 786/2013 DER KOMMISSION vom 16. August 2013.
- [3] Norbert Helle, Algengifte in Muscheln besser nachweisen, Laborpraxis 29 (2005) 62 (Maiausgabe).
- [4] H. Riering, N. Bilmann, G. Cozzupoli 2016 Comparison of various aryl and alkyl modified Sorbents in RP chromatography, Poster ISC 2016, Cork · www.mn-net.com