

**Algengifte in Muscheln besser nachweisen**

# Der Gesundheit zuliebe

Muscheln können tödlich sein – insbesondere, werden sie zur falschen Jahreszeit verzehrt. Grund sind Algengifte, die Schalentiere aufnehmen und in ihrem Gewebe anreichern. Um Verbraucher besser zu schützen, schreibt die Europäische Union (EU) routinemäßige Tierversuche vor. Deutsche Experten, wie der Chemiker Dr. Norbert Helle aus Bremerhaven, lehnen das ab – weil es für den Nachweis mariner Biotoxine, etwa für die hochgiftigen PSP-Toxine, mittlerweile ein deutlich besseres Nachweisverfahren gibt: die Flüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenzdetektion.



## Der Autor

Dr. Norbert Helle,  
Technische Lebensmittel-  
und Umweltanalytik (TeLA) GmbH,  
Fischkai 1, 27572 Bremerhaven

**M**uscheln stehen traditionell im Herbst auf dem Speiseplan. Volkesmund rät nämlich, Muscheln nur in Monaten zu verzehren, die ein „r“ im Namen tragen – also vor allem in den kalten Monaten des Jahres. Wer die Regel missachtete und Muscheln verzehrte, die etwa im Hochsommer geerntet wurden, riskierte früher eine Vergiftung mit so genannten marinen Biotoxinen, die Durchfall und Erbrechen auslösen, das vegetative Nervensystem stören, Lähmungserscheinungen hervorrufen oder in schwerwiegenden Fällen sogar den Tod herbeiführen können.

Marine Biotoxine stammen aus Algen, die Muscheln als Nahrung dienen. Algen können unterschiedliche Giftstoffe produzieren, die sich im Muschelgewebe anreichern. Das Risiko einer Vergiftung steigt in warmen Sommermonaten, weil auch die Algenmenge mit der Temperatur des Meeres drastisch ansteigt. Das Nahrungsangebot der Muscheln ist deutlich erhöht und damit auch ihre Belastung mit marinen Biotoxinen.

### Die verschiedenen Arten mariner Biotoxine

Zu den marinen Biotoxinen zählen unterschiedliche organische Verbindungen. Bei den PSP-Toxinen (Paralytic Shellfish Poisoning) handelt es sich um hochpolare Tetrahydropurin-Derivate. Es wurde bislang eine relativ große Anzahl unterschiedlich substituierter PSP-Toxine entdeckt, wobei nur ein Teil in den toxischen Algen, etwa den *Alexandrium*-Arten, direkt gebildet wird, während andere Derivate erst in der Muschel als Metaboliten entstehen.

PSP-Toxine gehören zu den stärksten Biogiften überhaupt. Der Verzehr PSP-belasteter Muscheln kann das Nervensystem beeinträchtigen, zum Atemstillstand führen und auch zum Tod.

Wirksubstanzen der DSP-Toxine (Diarrhetic Shellfish Poisoning) sind Verbindungen mit mehreren cyclischen Ethergruppen, so genannte Dinophysis-Toxine. Leitsubstanz ist die unter den DSP-Toxinen dominierende Okadasäure.

Eine Vergiftung mit DSP-Toxin kann zu Übelkeit, Erbrechen und Durchfall führen. Algen, die DSP-Toxin produzieren, etwa *Dinophysis accuminata* und *Dinophysis acuta*, treten zum Beispiel in Nord- und Ostsee auf.

Als Wirkstoff von ASP-Toxinen (Amnesic Shellfish Poisoning) gilt die Domoinsäure, die das zentrale Nervensys-

tem beeinflusst und ursächlich sein kann für den Verlust des Kurzzeitgedächtnisses (Amnesie).

Neben den drei Hauptgruppen mariner Biotoxine wurden weitere Toxine aus Algen oder Muscheln isoliert und bestimmt. Hierzu zählen Yessotoxine, Pectenotoxine und die Azaspirosäuren.

### EU-Richtlinien – Verbraucherschutz im Blick

Als sich toxische Algen zunehmend in den Weltmeeren ausbreiteten und die Zahl der Erkrankungen zunahm, die auf den Verzehr von Muscheln zurückzuführen waren, wurde weltweit der Ruf nach einem besseren Verbraucherschutz laut.

Die Europäische Union (EU) legte Richtlinien fest für die Kontrolle von Algentoxinen in Muscheln, die von den Mitgliedstaaten in nationales Recht umzuwandeln sind.

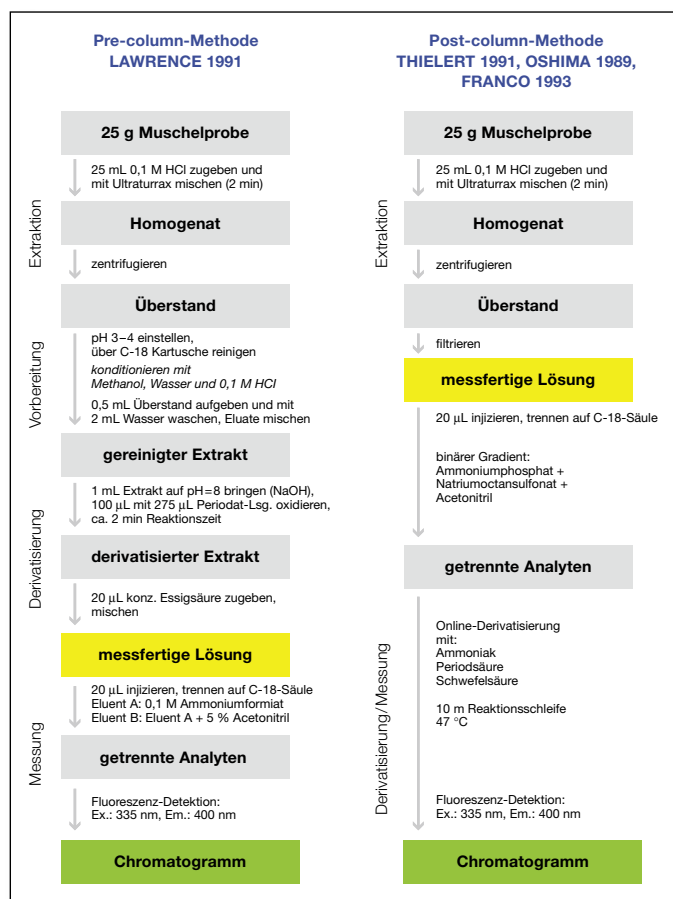
Als Basis dient die Kommissionsentscheidung 2002/225/EG vom 15.03.2002, die eine zulässige Höchstmenge für die einzelnen Toxingruppen formuliert und die anzuwendenden Analysemethoden festlegt. Die Umsetzung muss laut Verordnung (EG) Nr. 854/2004 (EU-Hygienepaket) bis 1. Januar 2006 erfolgt sein.

In Deutschland regelt die Fisch-Hygiene-Verordnung die Höchstmengen

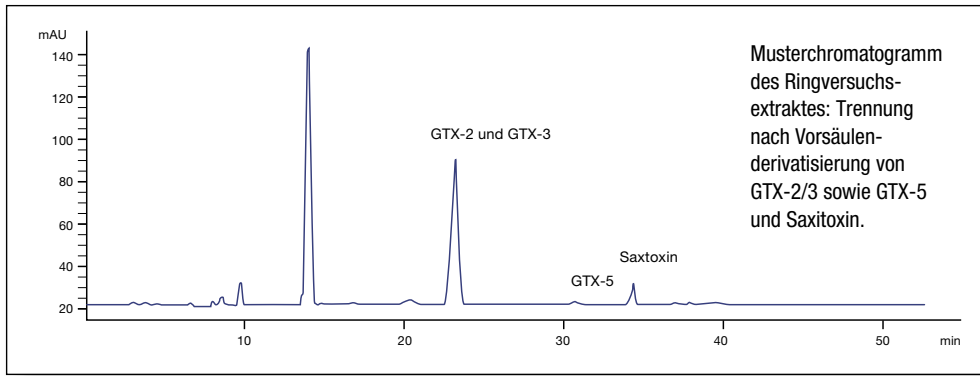
für ASP-Toxine (20 mg Domoinsäure/kg Muschelfleisch), DSP-Toxine (400 µg/kg Muschelhepatopankreas) und PSP-Toxine (800 µg/kg Muschelfleisch). Allerdings ist Deutschland bei der Umsetzung der europäischen Vorgaben von den Analyse-richtlinien abgewichen.

Die EU-Richtlinie sieht vor, den Nachweis mariner Biotoxine im Rahmen der Lebensmittelüberwachung routinemäßig mittels so genannter Bioassays zu erbringen, im vorliegenden Fall mit Tierversuchen: Um zu prüfen, ob eine Belastung mit marinen Biotoxinen vorliegt, wird Mäusen ein aufbereiteter Extrakt aus dem zu untersuchenden Muschelgewebe in die Bauchhöhle injiziert. Stirbt die Maus, ist der Nachweis erbracht.

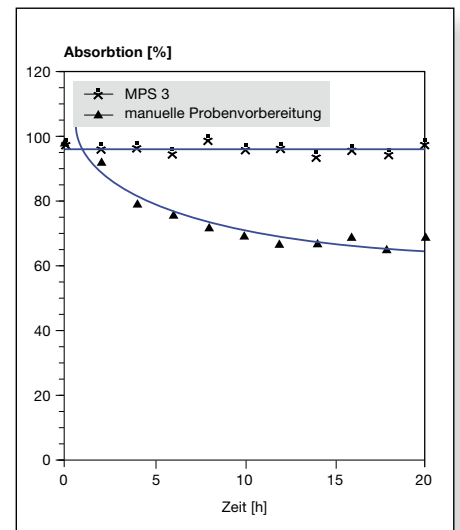
Der Tierversuch als routinemäßig einzusetzende Referenzmethode zum Nachweis von Algengiften wird unter anderem vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) kritisiert. In Deutschland werden chemisch-physikalische Verfahren eingesetzt und nur in Zweifelsfällen Tierversuche durchgeführt. Begründet ist dieses Vorgehen mit dem Anspruch, sowohl wissenschaftlich überprüfbare Methoden als auch das deutsche Tierschutzgesetz anzuwenden, wonach Tierversuche nur dann durchzuführen sind, wenn keine wissenschaftlich zufrieden stellen-



Schematische Gegenüberstellung der von Lawrence et al. [1] beschriebenen Vorsäulen-derivatisierung mit der On-Line-Nachsäulen-derivatisierung.



Die Proben für den Ringversuch wurden in der Weise hergestellt, dass unbelastetes Fleisch von Miesmuscheln mit einem Extrakt aus der toxischen Alge *Alexandrium fundyense* versetzt wurde, welches GTX-2 und GTX-3 sowie GTX-5 und Saxitoxin enthielt. Nach Extraktion mit Essigsäure und Oxidation mit Wasserstoffperoxid ergaben sich fluoreszierende Derivate, die auf einer Reversed Phase Säule gut trennbar und bei der Extinktionswellenlänge 330 nm und der Emissionswellenlänge 390 nm empfindlich nachzuweisen sind.



Vergleichsmessung zwischen der manuellen und der automatisierten Probenvorbereitung: Der MPS 3 liefert unverkennbar die besseren Ergebnisse.

Die Nachweisgrenze der Methode liegt in Abhängigkeit vom Detektor zwischen 5 µg/kg und 50 µg/kg Muschelfleisch – in Anbetracht des EU-Grenzwertes von 800 µg/kg ein ausreichend niedriger Wert. GTX-2 und GTX-3 sind mit der Vorsäulenderivatisierung nicht zu trennen, da sie das gleiche Produkt bilden. Sollen beide Komponenten getrennt ermittelt werden, bedarf es einer Nachsäulenderivatisierung. Dies ist jedoch nur für Forschungszwecke relevant.

### Bessere Ergebnisse durch eine automatisierte Probenvorbereitung

Das Ergebnis des Ringversuches fiel ausgesprochen positiv aus. Allerdings trat im Laufe der Homogenitätsstudie, die dem Ringversuch vorausging, und auch während des Ringversuchs selbst, bei teilnehmenden Laboratorien ein Problem auf: Die fluoreszierenden Derivate der PSP-Toxine sind thermolabil. Das FLD-Signal nahm bereits innerhalb we-

den, vertretbaren und praktikablen Alternativen zur Verfügung stehen.

Was im Übrigen auch der europäischen Richtlinie zum Schutz von Versuchstieren entspricht. Darüber hinaus ist die Anwendung chemisch-physikalischer Messverfahren nach Ansicht des BfR dem Test an Mäusen überlegen und besser geeignet, die Verbraucher zu schützen. Im Gegensatz zu den alternativen Methoden ist der Maus-Bioassay eine nicht nach wissenschaftlichen Kriterien überprüfte und genormte Methode.

Am weitesten vorangeschritten ist die Entwicklung chemisch-physikalischer Methoden auf Basis der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), bei der hochempfindliche Messinstrumente das Vorhandensein von Toxinen anzeigen.

### LC – Methode der Wahl zum Nachweis von PSP-Toxinen

Die chemische Struktur der PSP-Toxine basiert auf einem an mehreren Positionen substituierten Tetrahydropurin-Ring. Die bislang beschriebenen Derivate sind hochpolar, also sehr gut wasserlöslich, und verfügen über kein nennenswertes Chromophor. Für den notwendigen empfindlichen Nachweis der PSP-Toxine wurden deshalb bereits in den 1980-er Jahren Methoden entwickelt, die auf der Fluoreszenzdetektion basieren [1], wo-

bei man sich grundsätzlich die Bildung eines fluoreszenzaktiven aromatischen Systems durch Oxidation des Moleküls zu Nutze macht. Als Oxidationsmittel eignen sich unter anderem Wasserstoffperoxid und Perchlorsäure.

Während die von Lawrence et al. [1] beschriebene Vorsäulenderivatisierung den Vorteil eines einfacheren instrumentellen Aufbaus und eines geringeren Verbrauchs an Reagenzien bietet, hat die On-Line-Nachsäulenderivatisierung den Vorteil eines geringeren manuellen Arbeitsaufwands und der prinzipiell geringeren Standardabweichung.

Die § 35 LMBG Arbeitsgruppe „Muscheltoxine“ arbeitet seit mehreren Jahren an der Entwicklung eines standardisierten Verfahrens zur Bestimmung von PSP-Toxinen. Nach vorläufigen Ringversuchen mit beiden prinzipiellen Varianten wurde im Jahre 2004 eine abschließende Vergleichsstudie mit einer auf der Methode von Lawrence et al. basierenden und durch Walther [2] modifizierten Prozedur durchgeführt. Die Ergebnisse der Studie, an der neun Laboratorien teilnahmen, erwiesen sich als sehr gut, so dass einer Aufnahme des geprüften Verfahrens in die Sammlung der amtlichen Methoden nach § 35 LMBG nichts im Wege stand.

Programm zur Derivatisierung von PSP-Toxinen mit dem GERSTEL-MultiPurpose-Sampler MPS 3.

MOVE	Transport vom Tray 1 VT98 in den Agiator AgiTray
ADD 1	Zugabe von 50 µL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> zur Probe ! Start der Derivatisierung
MIX 1	Mischen der Probe durch den Agiator AgiTray mit 500rpm für 1,5 Minuten, 20 Sekunden Ontime, 2 Sekunden Offtime ! Richtungswechsel
ADD 2	Zugabe von 30 µL Eisessig zur Probe ! Stoppen der Derivatisierung
MIX 2	Mischen der Probe durch den Agiator AgiTray mit 500 rpm für 1,5 Minuten, 20 Sekunden Ontime, 2 Sekunden Offtime ! Richtungswechsel
MOVE	Transport von dem Agiator AgiTray zum Tray 1 VT98
INJECT	Injektion von 5 µL der Probe in die LC-Säule zur Trennung und anschließender Fluoreszenz-Detektion

# „Analytical Supplies“ neu aufgelegt

GERSTEL hat seinen Verbrauchsteilkatalog überarbeitet und neu aufgelegt. Der neue Katalog „Analytical Supplies 2005/2006“ gibt einen kompletten und strukturierten Überblick über sämtliche Einzelteile, die für einen dauerhaft reibungslosen und optimalen Betrieb aller GERSTEL-Produkte erforderlich sind. Das Portfo-

lio des Unternehmens umfasst Geräte und Systeme für die automatisierte Probenvorbereitung und Probenaufgabe in der GC (GC/MS) und LC (LC/MS), für die mehrdimensionale Analyse, zur olfaktorischen Bestimmung von Geruchsverursachern und zur präparativen Sammlung von Fraktionen. Katalog anfordern unter: [aktuell@gerstel.de](mailto:aktuell@gerstel.de).



niger Stunden bei Raumtemperatur ab; nach gut 24 Stunden war das Signal um bis zu 40 Prozent reduziert.

Die Derivate der einzelnen PSP-Komponenten erwiesen sich zudem als unterschiedlich stabil. Das GTX-5-Derivat etwa wird erheblich stärker abgebaut als das Saxitoxin-Derivat; insbesondere bei längeren Messreihen ein nicht zu unterschätzendes Problem. Man kann ihm teilweise begegnen, wird die Probe gekühlt. Idealerweise sollte aber von der Derivatisierung bis zur Messung stets die gleiche Zeit verstreichen.

## MPS 3 als Mittel der Wahl

Das Ziel lässt sich erreichen, kommen intelligente LC-Autosampler zum Einsatz. Idealerweise solche, die einen hohen Probendurchsatz garantieren, eine einfache Programmierung des Probenvorbereitungsablaufs ermöglichen und notwendige Vorbereitungsschritte beherrschen, wie Mischen, Temperieren oder Verdünnen. Auf der Suche nach dem geeigneten Probengeber rückte der GERSTEL-Multi-PurposeSampler MPS 3 ins Blickfeld.

Der MPS 3 wird über die in die ChemStation von Agilent Technologies eingebettete einfache, aber überaus leistungsfähige GERSTEL-MAStEr-Software programmiert und gesteuert. Die erforderlichen Schritte lassen sich aus einer Liste vorgegebener Möglichkeiten, wie MOVE, MIX oder ADD, bequem per Mausklick zusammenstellen. Die Derivatisierung der PSP-Toxine mit dem MPS 3 gestaltete sich wie folgt: Der mit 1 M NaOH versetzte Probenextrakt wird in den integrierten heizbaren Orbitalschüttler des MPS 3 gestellt [MOVE]. Danach wird das Derivatisierungsreagenz (zehnprozentige wässrige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung) [ADD 1] hinzugefügt. Die Probe wird für 1,5 min intensiv durchmischt [MIX 1], konzentrierte Essigsäure wird hinzu gegeben [ADD 2] und

	Saxitoxin				
Probe	x	S <sub>r</sub>	S <sub>R</sub>	r	R
Probe A	758,35	52,55	97,65	147,13	273,41
Probe B	400,82	33,95	63,22	95,05	177,02
Probe C	1144,23	49,72	121,41	139,22	339,94
	GTX 2/3				
Probe A	7462,17	568,15	1082,19	1590,83	3030,12
Probe B	3909,12	267,24	641,77	748,27	1796,97
Probe C	12140,39	861,54	2100,28	2412,32	5880,79
	GTX-5				
Probe A	165,46	10,21	34,01	28,59	95,23
Probe B	84,18	5,61	10,33	15,7	28,91
Probe C	271,92	12,83	60,32	35,91	168,9

Ringversuch zur Bestimmung von Algentoxinen in Muschelfleisch und Muschelerzeugnissen. Zahl der Teilnehmer: 9; Gesamtmittelwert Toxin: x; Wiederholstandardabweichung: S<sub>r</sub>; Vergleichstandardabweichung: S<sub>R</sub>; Wiederholgenze: r; Vergleichsgrenze: R

danach wieder für weitere 1,5 min durchmischt [MIX 2].

Die Oxidation stoppt, sobald der pH-Wert gesenkt wird. Der Roboterarm setzt das jeweilige Vial an seine ursprüngliche Tray-Position zurück, wo es bis zur Injektion „geparkt“ bleibt. Exakt fünf Minuten nach Beginn der Derivatisierung wird die Probe in den LC injiziert.

## Ergebnisse

Die Proben zeigten aufgrund des reproduzierbaren Zeitablaufs erheblich bessere Korrelationskoeffizienten bei der Erstellung externer Kalibrierungen beziehungsweise geringere Standardabweichungen gegenüber einer manuellen Probenaufbereitung. Der Vergleich von zehn aufeinanderfolgenden Messungen an einem 1100 HPLC-System von Agilent Technologies machte deutlich:

Erfolgte die Probenaufbereitung vor der Messung manuell, zeigte sich eine signifikante Abnahme der Signalintensität aufgrund der Instabilität des Oxidationsproduktes. Bereits nach 12 h (Temperatur des Autosamplers: 25 °C) wird nur noch

70 Prozent der ursprünglichen Intensität des Gonyautoxins GTX-5 gemessen. Erfolgte die Probenvorbereitung allerdings mit dem MPS 3, automatisiert und zeitlich verschachtelt, blieben Signalintensität und Messergebnisse über einen weiten Zeitraum konstant.

## Fazit

Die vorliegende Untersuchung macht deutlich: Die Zukunft der Kontrolle der Algentoxine in Muschelfleisch liegt nicht im Einsatz von Bioassays, sondern auf dem Gebiet der instrumentellen Analytik mittels Flüssigkeitschromatographie. ■

## Literatur

- [1] Lawrence, J.F. and Menard, C. (1991), "Liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish after prechromatographic oxidation", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Vol.74, no.6, 1006-1012
- [2] Persönliche Mitteilung von Dr. Lutz Walther, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit