

**Friedrich-Schiller-Universität Jena**

Biologisch-Pharmazeutische Fakultät

Institut für Ernährungswissenschaften

Lehrstuhl Lebensmittelchemie



**ENTWICKLUNG UND ANWENDUNG VON ANALYSENVERFAHREN ZUR  
ERFASSUNG CYANOBAKTERIELLER TOXINE BASIEREND AUF  
FLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHISCHER TRENNUNG UND  
MASSENSPEKTROMETRISCHER DETEKTION**

**Dissertation**

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

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

im Mai 2007

von Diplom-Ernährungswissenschaftlerin Susann Hiller  
geboren am 7. März 1980 in Jena, Thüringen

Tag der Doktorprüfung: 11. Juni 2007

Tag der Verteidigung: 23. Oktober 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Luckas, Jena

2. Gutachter: Prof. Dr. Allan Cembella, Bremerhaven

3. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart, Hamburg

## INHALTSVERZEICHNIS

I	Abbildungsverzeichnis .....	VI
II	Tabellenverzeichnis .....	X
III	Abkürzungsverzeichnis .....	XII
<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretischer Hintergrund zu cyanobakteriellen Toxinen.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Einteilung der cyanobakteriellen Toxine .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Produzenten cyanobakterieller Toxine .....</b>	<b>3</b>
<b>2.3</b>	<b>Verbreitung cyanobakterieller Toxine.....</b>	<b>3</b>
2.3.1	Vergiftungsfälle .....	6
2.3.2	Belastung von Gewässern mit cyanobakteriellen Toxinen.....	7
2.3.3	Belastung von Badegewässern .....	8
2.3.4	Belastung von Nahrungsergänzungsmitteln .....	8
2.3.5	Lebensmittelrechtliche und dem Schutz der Gesundheit dienende Regelungen.....	9
2.3.5.1	Muscheln und Fischereierzeugnisse .....	9
2.3.5.2	Trinkwasser .....	9
2.3.5.3	Badegewässer.....	9
2.3.5.4	Nahrungsergänzungsmittel.....	10
<b>2.4</b>	<b>Struktur und Toxikologie .....</b>	<b>10</b>
2.4.1	Anatoxine.....	10
2.4.2	Anatoxin-a(s) .....	11
2.4.3	Cylindrospermopsine .....	12
2.4.4	Microcystine und Nodularine .....	13
2.4.5	PSP-Toxine .....	15

<b>2.5</b>	<b>Chromatographische Erfassung .....</b>	<b>18</b>
2.5.1	Detektion nach chromatographischer Trennung .....	18
2.5.1.1	Ultraviolett-Detektion .....	18
2.5.1.2	Fluoreszenzdetektion (FLD) .....	18
2.5.1.3	Massenspektrometrie (MS).....	18
2.5.1.4	Tandem-Massenspektrometrie .....	19
2.5.2	Anatoxine.....	19
2.5.3	Anatoxin-a(s) .....	21
2.5.4	Cylindrospermopsine .....	21
2.5.5	Microcystine und Nodularine .....	22
2.5.6	PSP-Toxine .....	24
<b>2.6</b>	<b>Extraktion der Toxine .....</b>	<b>27</b>
2.6.1	Anatoxine.....	27
2.6.2	Anatoxin-a(s) .....	27
2.6.3	Cylindrospermopsine .....	27
2.6.4	Microcystine und Nodularine .....	28
2.6.5	PSP-Toxine .....	28
<b>3</b>	<b>Zielstellungen der Arbeit .....</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Quantifizierung von Microcystinen durch Einsatz der HPLC- Bedingungen der Norm ISO 20179.....</b>	<b>32</b>
4.1.1	Standardsubstanzen.....	32
4.1.2	Probenmaterial .....	32
4.1.3	Extraktion des Phytoplanktons .....	32
4.1.4	HPLC-UV-Bestimmung der Microcystine .....	33
4.1.4.1	HPLC-System.....	33
4.1.4.2	HPLC-Bedingungen.....	33

4.1.5	LC-MS-Bestimmung der Microcystine .....	33
4.1.5.1	LC-MS-System .....	33
4.1.5.2	HPLC-Bedingungen.....	34
4.1.5.3	MS-Bedingungen.....	34
4.1.6	Ergebnisse.....	35
4.1.6.1	Ergebnisse der HPLC-UV-Bestimmung.....	35
4.1.6.2	Ergebnisse der LC-MS-Bestimmung .....	35
4.1.7	Diskussion der Ergebnisse .....	39
<b>4.2</b>	<b>Optimierung einer LC-MS/MS basierten Methode zur Erfassung cyanobakterieller Toxine im SIM-Modus .....</b>	<b>40</b>
4.2.1	Standardsubstanzen.....	40
4.2.2	LC-MS-Bestimmung der cyanobakteriellen Toxine.....	40
4.2.2.1	LC-MS-System .....	40
4.2.2.2	HPLC-Bedingungen.....	40
4.2.2.3	MS-Bedingungen.....	41
4.2.3	Ergebnisse.....	42
4.2.4	Diskussion der Ergebnisse .....	45
<b>4.3</b>	<b>Optimierung der gemeinsamen Extraktion cyanobakterieller Toxine .....</b>	<b>47</b>
4.3.1	Probenmaterial .....	47
4.3.2	Extraktion des Phytoplanktons .....	47
4.3.3	LC-MS- und HPLC-FLD-Bestimmung der PSP-Toxine, MCs und NOD.....	48
4.3.3.1	HPLC-System.....	48
4.3.3.2	HPLC-Bedingungen.....	48
4.3.3.3	Detektionsbedingungen.....	49
4.3.4	Ergebnisse.....	50
4.3.4.1	Wahl des Extraktionsmittels.....	50
4.3.4.2	Anzahl der Extraktionsschritte .....	50
4.3.5	Diskussion der Ergebnisse .....	51

<b>4.4</b>	<b>Entwicklung und Anwendung einer LC-MS/MS basierten Methode zur Erfassung cyanobakterieller Toxine im Precursor-Ionen-Scan-Modus.....</b>	<b>52</b>
4.4.1	Standardsubstanzen.....	53
4.4.2	Probenmaterial .....	53
4.4.3	Extraktion des Phytoplanktons .....	53
4.4.4	LC-MS/MS-Bedingungen für die Bestimmung der cyanobakteriellen Toxine .....	53
4.4.4.1	HPLC-System.....	53
4.4.4.2	HPLC-Bedingungen.....	54
4.4.4.3	MS/MS-Bedingungen .....	55
4.4.5	Methodenentwicklung .....	56
4.4.5.1	Optimierung der chromatographischen Trennung .....	56
4.4.5.2	Optimierung der MS-Parameter.....	59
4.4.5.3	Nachweisgrenze / Bestimmungsgrenze .....	67
4.4.5.4	Diskussion der Ergebnisse .....	68
4.4.6	Anwendung der Methode.....	71
4.4.6.1	Detektion cyanobakterieller Toxine aus natürlich belasteten Phytoplanktonproben .....	71
4.4.6.2	Qualitative und quantitative Überprüfung .....	77
4.4.7	Diskussion .....	79
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>102</b>
7.1	Geräte .....	102
7.2	Standardsubstanzen .....	103
7.3	Phytoplankton-Biomassen.....	104
7.4	Chemikalien.....	104
7.5	Tabellen .....	105

---

Danksagung .....	113
Selbständigkeitserklärung .....	115
Ehrenwörtliche Erklärung .....	115
Lebenslauf .....	116

**I ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abb. 1:	Verbreitung cyanobakterieller Toxine a) Microcystine (2005) [1] b) PSP-Toxine (2006) [95].....	6
Abb. 2:	Chemische Strukturen von Anatoxin-a, Homoanatoxin-a und deren Abbauprodukten .....	10
Abb. 3:	Chemische Struktur von Anatoxin-a (s).....	11
Abb. 4:	Chemische Struktur der Cylindrospermopsine .....	12
Abb. 5:	Allgemeine chemische Struktur der Microcystine mit X und Y als variable Aminosäuren.....	13
Abb. 6:	Chemische Struktur der Nodularine .....	14
Abb. 7:	Chemische Struktur und Toxizitätsfaktoren der Paralytic Shellfish Poisoning - Toxine.....	16
Abb. 8:	LC-MS/MS-Fragmentierungsschema von Anatoxin-a und Homoanatoxin-a [171].....	20
Abb. 9:	Schematische Darstellung der protonierten Molekülonen von CYN und DoCYN nach Elektrosprayionisierung und deren Fragmentationen [174] .....	21
Abb. 10:	Struktur des Adda-Fragments mit m/z 135 (a) und des DMAdda-Fragments mit m/z 121 (b), gebildet von Microcystinen und Nodularinen .....	23
Abb. 11:	a) HPLC-UV-Chromatogramm eines Mischstandards (15 ng) mit MC-RR ( $t_R$ 16,82 min), MC-YR ( $t_R$ 21,56 min), MC-LR ( $t_R$ 22,50 min); b) HPLC-UV-Chromatogramm einer Wasserprobe des Senftenberger Sees mit MC-RR bei $t_R$ 16,85 min, MC-YR bei $t_R$ 21,50 und MC-LR bei $t_R$ 22,33 min (nach ISO 20179) .....	35
Abb. 12:	SIM-Chromatogramm einer Wasserprobe des Senftenberger Sees mit MC-RR bei $t_R$ 14,79 min, MC-YR bei $t_R$ 19,57 min und MC-LR bei $t_R$ 20,45 min (Chromatographie entsprechend ISO 20179).....	36
Abb. 13:	a) TIC einer Wasserprobe des Senftenberger Sees im Scan-Modus ( $m/z$ 500-600 amu und 900-1100 amu), b) MS-Scans ( $m/z$ 500-600 amu und 900-1100 amu) bei b) $t_R$ 13,55 min, c) $t_R$ 15,42 min und d) $t_R$ 21,77 min (Chromatographie entsprechend ISO 20179).....	36
Abb. 14:	SIM-Chromatogramm einer Wasserprobe des Senftenberger Sees mit dmMC-RR bei $t_R$ 5,57 min, MC-RR bei $t_R$ 5,44 min, dmdmMC-LR bei $t_R$ 10,15 min, dmMC-LR bei $t_R$ 12,14 min, MC-LR bei $t_R$ 11,83 min und MC-YR bei $t_R$ 11,53 min (modifiziert nach Hummert et al. [200]) .....	37

Abb. 15: a) TIC einer Wasserprobe des Senftenberger Sees im Scan-Modus ( $m/z$  500-600 amu); b) MS-Scan bei  $t_R$  7,20 min (modifiziert nach Hummert et al. [200])..... 38

Abb. 16: a) TIC einer Wasserprobe des Senftenberger Sees im Scan-Modus ( $m/z$  900-1100 amu); MS - Scans bei b)  $t_R$  11,58 min, c)  $t_R$  12,57 min und d)  $t_R$  14,48 min (modifiziert nach Hummert et al. [200])..... 38

Abb. 17: SIM-Chromatogramm eines Mischstandards mit STX ( $t_R$  2,02 min), NEO ( $t_R$  2,02 min), dcSTX ( $t_R$  2,04 min), ANA ( $t_R$  9,30 min), CYN ( $t_R$  12,64 min), MC-RR ( $t_R$  15,09 min), NOD ( $t_R$  16,76 min), MC-YR ( $t_R$  17,59 min), MC-LR ( $t_R$  17,66 min), MC-LA ( $t_R$  28,85 min), MC-LW ( $t_R$  39,87 min), MC-LF ( $t_R$  42,30 min) unter den Bedingungen von Methode 1 ..... 42

Abb. 18: SIM-Chromatogramm eines Mischstandards mit GTX2/3 ( $t_R$  5,03 min), STX ( $t_R$  5,95 min), CYN ( $t_R$  5,83 min), ANA ( $t_R$  11,55 min), MC-RR ( $t_R$  21,70 min), NOD ( $t_R$  22,55 min), MC-YR ( $t_R$  23,59 min), MC-LR ( $t_R$  23,87 min), MC-LA ( $t_R$  26,10 min), MC-LW ( $t_R$  27,88 min), MC-LF ( $t_R$  28,15 min) unter den Bedingungen von Methode 2 ..... 43

Abb. 19: SIM-Chromatogramm eines Mischstandards mit CYN ( $t_R$  6,32 min), STX ( $t_R$  6,99 min), NEO ( $t_R$  7,09 min), ANA ( $t_R$  12,73 min), MC-RR ( $t_R$  21,24 min), NOD ( $t_R$  22,03 min), MC-YR ( $t_R$  23,25 min), MC-LR ( $t_R$  23,51 min), MC-LA ( $t_R$  26,06 min), MC-LW ( $t_R$  27,90 min), MC-LF ( $t_R$  28,38 min) unter den Bedingungen von Methode 3 ..... 44

Abb. 20: Relative Extraktionsausbeute mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen einer Methanol/0,1 M Essigsäure-Lösung (1:3, 1:1, 3:1)..... 50

Abb. 21: Relative Extraktionsausbeute bei 1, 2 und 3 Extraktionsschritten mit Methanol/0,1 M Essigsäure (1:1) als Extraktionsmittel..... 50

Abb. 22: MRM-Chromatogramm eines Mischstandards mit STX (256 pg) und NEO (2885 pg); a) TIC, b) STX bei  $t_R$  1,38 min, c) NEO bei  $t_R$  1,41 min; d) Gradientenprofil mit Anteil Eluent A (%) unter den MS-Bedingungen von Abschnitt 4.4.4.3 (Tab. 21) ..... 56

Abb. 23: MRM-Chromatogramme eines Mischstandards mit ANA (25 pg; 1. Peak) und CYN (25 pg; 2. Peak) mit verschiedenen Gradientenprofilen (Tab. 21) unter den MS-Bedingungen von Abschnitt 4.4.4.3..... 57

Abb. 24: MRM-Chromatogramme von NOD (25 pg) mit verschiedenen Gradientenprofilen (Tab. 21) unter den MS-Bedingungen von Abschnitt 4.4.4.3..... 58

Abb. 25: MRM-Chromatogramm eines MC-Standards (je 25 pg) mit MC-RR ( $t_R$  12,27 min), MC-YR ( $t_R$  14,85 min), MC-LR ( $t_R$  15,59 min), MC-LA ( $t_R$  20,08 min), MC-LW ( $t_R$  21,65 min) und MC-LF ( $t_R$  22,70 min) mit Gradientenprofil (Tab. 21) unter den MS-Bedingungen von Abschnitt 4.4.4.3. .... 59

Abb. 26:	Produkt-Ionen-Spektren von GTX1/4 (0,48 ng GTX1 / 1,44 ng GTX4) mit DP 60 V, CE 40 eV (a); DP 50 V, CE 35 eV (b); DP 50 V, CE 30 eV (c); DP 45 V, CE 30 eV (d); DP 40 V, CE 30 eV (e).....	60
Abb. 27:	MRM-Chromatogramm eines PSP-Mischstandards: a) TIC, b) STX (0,13 ng) bei $t_R$ 1,38 min, c) NEO (1,44 ng) bei $t_R$ 1,46 min, d) B1 (0,05 ng) bei $t_R$ 1,53 min, e) dcSTX (0,15 ng) bei $t_R$ 1,37 min, f) GTX2/3 (0,15 / 0,30 ng) bei $t_R$ 1,60 min, g) GTX2/3 (0,15 / 0,30 ng) bei $t_R$ 1,69 min, h) GTX1/4 (0,95/2,84 ng) bei $t_R$ 1,68 min, i) GTX1/4 (0,95 / 2,84 ng) bei $t_R$ 1,74 min.....	61
Abb. 28:	Precursor-Ionen-Chromatogramm von Periode 2 (a); Experiment 1 für ANAs mit Precursor-Ion $m/z$ 91,0: b) ANA-Standard (2 ng) bei $t_R$ 5,16 min; Experiment 2 für CYNs mit Precursor-Ion $m/z$ 194,0: c) CYN-Standard (2 ng) bei $t_R$ 5,48 min; Precursor-Ionen-Scan von ANA (d) und CYN (e).....	62
Abb. 29:	MRM-Chromatogramm eines Extraktes von <i>Anabaena lemmermannii</i> mit ANAS bei $t_R$ 2,41 min.....	63
Abb. 30:	Precursor-Ionen-Chromatogramm von Periode 3: a) Experiment 1 mit MC-YR (100 pg) bei $t_R$ 14,59 min, MC-LR (100 pg) bei $t_R$ 15,51 min, MC-LW (100 pg) bei $t_R$ 21,15; b) Experiment 2 mit MC-RR (100 pg) bei $t_R$ 12,33 min, MC-YR bei $t_R$ 14,50 min und MC-LR bei $t_R$ 15,53 min; c) Experiment 3 mit MC-LA (100 pg) bei $t_R$ 19,75 min und MC-LF (100 pg) bei $t_R$ 22,11 min; d) Experiment 4 mit NOD (100 pg) bei $t_R$ 14,67 min.....	64
Abb. 31:	Precursor-Ionen-Scans von MC-RR (a), MC-YR (b), MC-LR (c), MC-LW (d), MC-LA (e), MC-LF (f).....	65
Abb. 32:	Signalintensitäten (cps) von MC-LW ( $m/z$ 513,3 > 135,0) für verschiedene MS-Parameter im Optimierungsprozess.....	65
Abb. 33:	Signalintensitäten (cps) von NOD ( $m/z$ 825,5 > 135,0) für verschiedene MS-Parameter im Optimierungsprozess.....	66
Abb. 34:	Precursor-Ionen-Scan von NOD, Scan-Bereich $m/z$ 800-850 amu.....	66
Abb. 35:	MRM-Chromatogramme eines Extraktes von <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (a-e) und von <i>Aphanizomenon gracile</i> (f-j): a) TIC, b) STX bei $t_R$ 1,26 min, c) NEO bei $t_R$ 1,59 min, d) B1 bei $t_R$ 1,62 min, e) dcSTX bei $t_R$ 1,23 min, f) TIC, h) STX bei $t_R$ 1,25 min, i) NEO bei $t_R$ 1,54 min, j) kein B1, e) dcSTX bei $t_R$ 1,27 min.....	72
Abb. 36:	Precursor-Ionen-Scan-Chromatogramme (Periode 2, Exp. 1) mit Precursor-Ion $m/z$ 91: a) Extrakt von <i>Anabaena flos-aquae</i> mit Peak bei $t_R$ 5,25 min; b) Extrakt von <i>Aphanizomenon issatschenkoi</i> mit Peaks bei $t_R$ 5,26 min; $t_R$ 5,38 min; $t_R$ 5,51 min und $t_R$ 6,01 min; c) Extrakt von <i>Oscillatoria</i> sp. mit Peaks bei $t_R$ 5,12 min; $t_R$ 5,25 min, $t_R$ 5,77 min und $t_R$ 7,42 min.....	72

Abb. 37: Precursor-Ionen-Scans eines *Aphanizomenon issatschenkoii*-Extraktes mit Precursor-Ion  $m/z$  91, Scan-Bereich  $m/z$  100-300 amu: a) ANA bei  $t_R$  5,38 min; b) Peak bei  $t_R$  5,51 min; c) Peak bei  $t_R$  6,01 min..... 73

Abb. 38: Precursor-Ionen-Scans eines *Anabaena flos-aquae*-Extraktes mit Precursor-Ion  $m/z$  91, Scan-Bereich  $m/z$  100-300 amu; Peak bei  $t_R$  5,16 min..... 73

Abb. 39: Precursor-Ionen-Scans eines *Oscillatoria* sp.-Extraktes mit Precursor-Ion  $m/z$  91, Scan-Bereich  $m/z$  100-300 amu: a) Dihydro-ANA bei  $t_R$  5,12 min; b) Dihydro-HANA bei  $t_R$  5,25 min; c) HANA bei  $t_R$  5,77 min und d) Peak bei  $t_R$  7,42 min ..... 74

Abb. 40: a) Precursor-Ionen-Chromatogramm (Periode 2, Exp. 2) mit Precursor-Ion  $m/z$  194 eines *Lyngbya wollei* – Extraktes mit CYN bei  $t_R$  5,47 min und DoCYN bei  $t_R$  5,63 min; b) Precursor-Ionen-Scan von CYN, c) Precursor-Ionen-Scan von DoCYN; Scan-Bereich  $m/z$  300-500 amu ..... 74

Abb. 41: Precursor-Ionen-Chromatogramm (Periode 3, mit Precursor-Ion  $m/z$  135 eines *Microcystis aeruginosa* - Extraktes: a) Exp. 1 mit Ko-Elution von MC-YR und dmMC-YR bei  $t_R$  14,98 min, MC-LR bei  $t_R$  15,60 min und dmMC-LR bei  $t_R$  5,63 min; b) Exp. 2 mit dmdmMC-RR bei  $t_R$  11,84 min und dmMC-RR bei  $t_R$  12,22 min ..... 75

Abb. 42: Precursor-Ionen-Scans eines *Microcystis aeruginosa*-Extraktes mit Precursor-Ion  $m/z$  135, Scan-Bereich  $m/z$  450-575 amu: a) dmMC-YR und MC-YR bei  $t_R$  14,98 min; b) MC-LR bei  $t_R$  15,60 min; c) dmMC-LR bei  $t_R$  15,85 min, d) dmdmMC-RR bei  $t_R$  11,84 min und e) dmMC-RR bei  $t_R$  12,22 min ..... 75

Abb. 43: a) Precursor-Ionen-Chromatogramm (Periode 3, Exp. 4) mit Precursor-Ion  $m/z$  135 eines *Nodularia spumigena* – Extraktes mit dmNOD bei  $t_R$  13,80 min, NOD bei  $t_R$  14,47 min und einer NOD-Variante bei  $t_R$  15,09 min; b) Precursor-Ionen-Scan von dmNOD, c) Precursor-Ionen-Scan von NOD, d) Precursor-Ionen-Scan der NOD-Variante; Scan-Bereich  $m/z$  800-850 amu ..... 76

Abb. 44: Peakflächen (FE) von STX, NEO, B1 und dcSTX in Verdünnungsreihen (unverdünnt, 1:10, 1:100) der Extrakte von *Aphanizomenon flos-aquae* und *Aphanizomenon gracile* ..... 77

Abb. 45: Vergleich der relativen Toxingehalte, bestimmt im Precursor-Ionen-Scan-Modus und im MRM-Modus ..... 79

**II TABELLENVERZEICHNIS**

Tab. 1:	Übersicht über Produzenten cyanobakterieller Toxine und deren letale Dosis (i. p., Maus).....	4
Tab. 2:	Ausgewählte MC- und NOD-Fragmente [41, 81, 104, 177].....	23
Tab. 3:	LC-MS/MS-Fragmentationen der PSP-Toxine [174, 190] .....	26
Tab. 4:	Gradientenprogramm für HPLC-UV-Bestimmung von Microcystinen gemäß Norm ISO 20179 .....	33
Tab. 5:	Gradientenprogramm für die LC-MS-Bestimmung von Microcystinen modifiziert nach Hummert et al. [200].....	34
Tab. 6:	MS-Parameter für MC-Bestimmung nach ISO 20179 und einer Methode modifiziert nach Hummert et al. [200].....	34
Tab. 7:	Chromatographische Bedingungen für Methode 1, 2 und 3 zur Trennung von PSP-Toxinen, ANA, CYN, MCs und NOD.....	41
Tab. 8:	MS-Parameter zur Detektion von PSP-Toxinen, ANA, CYN, MCs und NOD in Methode 1 (modifiziert nach Oehrle et al. [204]).....	41
Tab. 9:	Retentionszeiten $t_R$ (min) der Toxine unter den drei getesteten Bedingungen .....	44
Tab. 10:	Nachweisgrenze (LOD, S/N = 3, ng pro Injektion) und Bestimmungsgrenze (LOQ, S/N = 5, ng pro Injektion) der Toxine in Methode 1 und 3 .....	44
Tab. 11:	Gradientenprogramm für HPLC-FLD-Bestimmung von PSP-Toxinen nach Diener et al. [186] .....	49
Tab. 12:	MS-Parameter zur Erfassung von ANAs, CYNs, MCs and NODs im MRM-Modus .....	49
Tab. 13:	MS-Parameter und MRM-Übergänge der Toxine während der Optimierung der chromatographischen Trennung.....	55
Tab. 14:	Maximal-Intensitäten (cps) von ANA (25pg) und CYN (25 pg) unter den Gradientenprofilen 1-10 (Tab. 21).....	58
Tab. 15:	Gradientenprofil für die Screening-Methode .....	59
Tab. 16:	MS-Parameter innerhalb der unterschiedlichen Experimente in den Perioden 1-3 zur Detektion der cyanobakteriellen Toxine im Precursor-Ionen-Scan-Modus .....	60
Tab. 17:	Differenzierung der vier Analysenexperimente für MCs und NODs nach Scanbereichen, Protonierungsgrad und Anzahl der Arg-Reste im Molekül .....	66
Tab. 18:	Nachweisgrenze (LOD, pg) und Bestimmungsgrenze (LOQ, pg) für jedes Standardtoxin.....	67

---

Tab. 19:	Peakflächen der Toxine bei Extraktion mit unterschiedlichen Methanol / 0,1 M Essigsäure – Verhältnissen: 1:3, 1:1, 3:1 .....	105
Tab. 20:	Peakflächen der Toxine bei einamilger, zweiter und dritter Extraktion mit Methanol / 0,1 M Essigsäure (1:1).....	106
Tab. 21:	Gradientenprofile für Trennung der cyanobakteriellen Toxine im Abschnitt 4.4.5.1.....	107
Tab. 22:	Konzentrationen, Peakflächen, Peakhöhen, Regressionsgerade und Regressionskoeffizient für PSP-Toxine im Abschnitt 4.4.5.3 .....	108
Tab. 23:	Konzentrationen, Peakflächen, Peakhöhen, Regressionsgerade und Regressionskoeffizient für CYN, ANA und NOD im Abschnitt 4.4.5.3.....	110
Tab. 24:	Konzentrationen, Peakflächen, Peakhöhen, Regressionsgerade und Regressionskoeffizient für MCs im Abschnitt 4.4.5.3 .....	111

### III ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	D-Alanin in Microcystin-Nomenklatur
Adda	3-Amino-9-Methoxy-2,6,8-Trimethyl-10-Phenyldeca-4,6-Diensäure
ADMAdda	9-O-Acetyl-O-Desmethyl-Adda
AFA-Alge	Nahrungsergänzungsmittel auf <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> -Basis
Ala	Alanin
An.	<i>Anabaena</i>
ANA	Anatoxin-a
ANAS	Anatoxin-a(s)
ANAs	Anatoxine
AOAC	Vereinigung der offiziellen analytischen Chemiker, Association of Official Analytical Chemists
<i>Aph.</i>	<i>Aphanizomenon</i>
API	Atmosphärendruck-Iononisierung, atmospheric-pressure ionisation
Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C.	<i>Cylindrospermopsis</i>
CAD	Kollisions-assoziiertes Dissoziationsgas, Collision-associated dissociation gas
CarboxylANA	11-Carboxylanatoxin
CE	Kollisionsenergie, collision energy
CID	Kollisionsinduzierter Abbau, collision induced decomposition
CUR	Schutzgas, curtain gas
CYN	<i>Cylindrospermopsin</i>
CYNs	<i>Cylindrospermopsine</i>
Da	Dalton
DA	Dioden Array
dcGTX	Decarbamoylgonyautoxin
dcNEO	Decarbamoylneosaxitoxin
dcSTX	Decarbamoylsaxitoxin
Dha	2-Dehydroalanin
Dhb	2-Amino-2-Butensäure, 2-Dehydrobutyrine
DihydroANA	2,3-Dihydroanatoxin
DihydroHANA	2,3-Dihydrohomoanatoxin
DihydromethoxyHANA	2,3-Dihydro-methoxyhomoanatoxin
DMAdda	9-O-Desmethyl-Adda

dmdmMC	Didesmethyl - Microcystin
dmMC	Desmethyl - Microcystin
dmNOD	Desmethyl - Nodularin
DoCYN	7-Deoxycylindropsermopsin
doSTX	Deoxydecarbamoylsaxitoxin
DP	Declustering Potential
ECD	Elektroneneinfang-Detektor, electron capture detector
EP	Eintrittspotenzial, entrance potential
EpiCYN	7-Epi-Cylindrospermopsin
EpoxyANA	2,3-Epoxyanatoxin
EpoxyHANA	2,3-Epoxyhomoanatoxin
ESI	Elektrosprayionisierung, electro spray ionisation
evtl.	eventuell
F	Phenylalanin in Microcystin-Nomenklatur
FAB	schneller Atombeschuss, Fast atom bombardment
FE	Flächeneinheiten
FLD	Fluoreszenzdetektion
FP	Fokussierpotenzial, focussing potential
GC	<i>Gymnodinium catenatum</i> - Toxin
Glu	Glutaminsäure
GSH	Glutathion
GTX	Gonyautoxin
HANA	Homoanatoxin-a
Harg	Homoarginin
HFBA	Heptafluorbuttersäure, heptafluorobutyric acid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, high performance liquid chromatography
HydroxyHANA	4-Hydroxyhomoanatoxin
i. A.	im Allgemeinen
i.p.	intraperitoneal
IS	Ionenspray-Spannung, ion spray voltage
KetoHANA	4-Ketohomoanatoxin
L	L-Leucin in Microcystin-Nomenklatur
<i>L.</i>	<i>Lyngbya</i>
LD <sub>50</sub>	Letale Dosis, bei der 50% der Versuchstiere sterben
Leu	Leucin
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LOD	Nachweisgrenze, limit of detection
LOQ	Bestimmungsgrenze, limit of quantification
LWTX	<i>Lyngbya wollei</i> - Toxin
<i>M.</i>	<i>Microcystis</i>

MCs	Microcystine
Mdha	2-Methylamino-2-Dehydroalanin
Mdhb	2-Methylamino-2-Butensäure, 2-Methyl-Dehydrobutyrine
MeAsp	D- <i>erythro</i> - $\beta$ -Methylasparaginsäure
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie, mass spectrometry
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NEB	Verneblungsgas, nebulizer gas
NEO	Neosaxitoxin
<i>Nod.</i>	<i>Nodularia</i>
NODs	Nodularine
<i>Nos.</i>	<i>Nostoc</i>
<i>Osc.</i>	<i>Oscillatoria</i>
Phe	Phenylalanin
PP	Proteinphosphatasen
PSP	Paralytic Shellfish Poisoning
Q1	Quadrupol 1, Massenanalysator
Q2	Quadrupol 2, Kollisionszelle
Q3	Quadrupol 3, Massenanalysator
Q-TOF	Quadrupol-time-of-flight
R	L-Arginin in Microcystin-Nomenklatur
<i>Raph.</i>	<i>Raphidiopsis</i>
SIM	Selected Ion Monitoring
S/N	Signal-zu-Rausch - Verhältnis, signal to noise
sog.	so genannt
sp.	Spezies, specie
spp.	mehrere Spezies, species pluralis
STX	Saxitoxin
T	Tyrosin in Microcystin-Nomenklatur
TDI	tolerierbare Tagesdosis, tolerable daily intake
Temp	Temperatur
TFA	Trifluoressigsäure, trifluoroacetic acid
TIC	Totalionenchromatogramm, total ion chromatogram
Trp	Tryptophan
UV	Ultraviolett
v. a.	vor allem
Val	Valin
VIS	sichtbares Licht, visible
v/v	Volumenanteile im Eluenten
W	Methionin in Microcystin-Nomenklatur
WHO	Weltgesundheitsorganisation, world health organisation

## EINLEITUNG

Die weltweite Verbreitung von Cyanobakterien (Blaualgen) vorwiegend in Binnen- und Brackgewässern ist seit langem bekannt. Insbesondere bei erhöhten Wassertemperaturen und hohen Nährstoffgehalten kann es zur massiven Vermehrung des Phytoplanktons mit Bildung von Algent Teppichen kommen [1]. Eine solche Algenblüte ist verbunden mit einer Verfärbung der Wasseroberfläche und der Bildung von „off-flavor“-Gerüchen, welche durch Abbauprodukte des Fettsäure- und Aminosäurestoffwechsels hervorgerufen werden. Bereits geringe Mengen von flüchtigen Sekundärmetaboliten wie Aldehyden oder Terpenoiden können allergische Reaktionen auslösen [2]. Allerdings stellen vor allem Substanzen mit stark toxischen Wirkungen ein großes Problem für den Menschen und dessen Umwelt dar. Vergiftungsfälle dieser Art wurden zahlreich beschrieben [3-10]. Eine Gefährdung der Gesundheit durch Toxine cyanobakteriellen Ursprungs muss somit weitgehend verhindert werden.

Oberflächenwasser stellt die hauptsächliche Expositionsquelle für cyanobakterielle Toxine dar. Es dient zur Trinkwassergewinnung, als Lebensraum für aquatische Organismen, die mit Toxinen kontaminiert sein und in die menschliche Nahrungskette gelangen können sowie als Wasserressource für Industrie und Landwirtschaft. Allerdings können die Blaualgengifte auch über Nahrungsergänzungsmittel auf der Basis von Mikroalgen oder durch toxinbelastete Badegewässer aufgenommen werden.

Insbesondere vor dem Hintergrund der globalen Erwärmung, die zu einer weiteren Ausbreitung bisher vorwiegend tropischer und subtropischer Blaualgenspezies in die gemäßigten Breiten führt, muss unbedingt eine effektive Kontrolle von Gewässern und Lebensmitteln des aquatischen Bereiches, in denen cyanobakterielle Toxine akkumuliert vorkommen können, erfolgen.

Für Trinkwasser, Muscheln und Fischereierzeugnisse, Nahrungsergänzungsmittel und Badegewässer existieren hinsichtlich der Kontamination mit ausgewählten cyanobakteriellen Toxinen Grenz- bzw. Richtwerte, deren Einhaltung überprüft werden muss.

Dabei setzt die Kontrolle von Lebensmitteln und Badegewässern hinsichtlich des Vorhandenseins von cyanobakteriellen Toxinen die schnelle, empfindliche und eindeutige Bestimmung dieser Substanzen mit Hilfe moderner leistungsfähiger Analysemethoden voraus.

# THEORETISCHER HINTERGRUND ZU CYANOBAKTERIELLEN TOXINEN

## 2.1 Einteilung der cyanobakteriellen Toxine

Cyanobakterien (Blaualgen, blue-greens), sind prokaryotische Organismen, die Chlorophyll-a für die Umwandlung von anorganischem Kohlenstoff zu organischen Verbindungen ausnutzen. Das entsprechende Pigment ist das nur in Blaualgen vorkommende Phycocyanin. Im Süßwasser wird das Phytoplankton im Allgemeinen durch Cyanobakterien dominiert. Die cyanobakteriellen Toxine werden entsprechend ihrer toxischen Mechanismen eingeteilt. Microcystine (MCs) und Nodularine (NODs) stellen Vertreter der Hepatotoxine dar, die Paralytic Shellfish Poisoning-Toxine (PSP-Toxine), die Anatoxine (ANAs) sowie Anatoxin-a(s) wirken neurotoxisch, während die Cylindrospermopsine (CYNs) hepato- und cytotoxisch wirksam sind.

## 2.2 Produzenten cyanobakterieller Toxine

Die cyanobakteriellen Toxine werden von einer Reihe unterschiedlicher Spezies wie *Anabaena* spp., *Aphanizomenon* spp., *Arthrospira* spp., *Cylindrospermopsis* spp., *Cylindrospermum* spp., *Lyngbya* spp., *Microcystis* spp., *Nodularia* spp., *Nostoc* spp., *Oscillatoria* spp., *Phormium* spp., *Raphidiopsis* spp. und *Umezakia* spp. gebildet (Tab. 1).

## 2.3 Verbreitung cyanobakterieller Toxine

Massive Vorkommen von Blaualgen wurden weltweit in Amerika, Europa, Australien und Asien beschrieben (Abb. 1a, b), wobei diese nicht immer toxisch sein müssen.

Tab. 1: Übersicht über Produzenten cyanobakterieller Toxine und deren letale Dosis (i. p., Maus)

Toxin	Produzent	LD <sub>50</sub> (µg / kg; i. p., Maus)
<b>Anatoxine</b>		
ANA	<i>Aph. flos-aquae</i> [11], <i>Oscillatoria</i> sp. [12], <i>Aphanizomenon</i> spp. [13], <i>Cylindrospermum</i> sp. [14], <i>An. flos-aquae</i> [15], <i>An. circinalis</i> [16], <i>An. lemmermannii</i> [16], <i>An. spiroides</i> [16], <i>M. aeruginosa</i> [17], <i>Raph. mediterranea</i> [18], <i>Arthrospira fusiformis</i> [19], <i>Phormium favosum</i> [16], <i>Aph. Issatschenkoii</i> [20]	200-250 [21] [22] [23]
HANA	<i>Osc. formosa</i> [24], <i>Raph. mediterranea</i> [18]	200-250 [24]
CarboxylANA	<i>Aph. Issatschenkoii</i> [20]	ohne Angabe
ANAS	<i>Raph. mediterranea</i> [18], <i>An. flos-aquae</i> [25, 26], <i>An. lemmermannii</i> [27], [28]	20 [29]
<b>Cylindrospermopsine</b>		
CYN	<i>C. raciborskii</i> [30, 31], <i>Aph. ovalisporum</i> [32], <i>Aph. flos-aquae</i> [33], <i>Umezakia natans</i> [32], <i>An. bergii</i> [34-36], <i>Raph. curvata</i> [37], <i>L. wollei</i> [38], <i>An. lapponica</i> [39]	2100 [40]
DoCYN	<i>L. wollei</i> [38], <i>Raph. curvata</i> [37], <i>C. raciborskii</i> [31, 38]	ohne Angabe
EpiCYN	<i>Aph. ovalisporum</i> [35]	ohne Angabe
<b>Microcystine</b>		
[D-Asp <sup>3</sup> ]-MC-LA	<i>M. aeruginosa</i> [41]	ohne Angabe
MC-LA	<i>M. aeruginosa</i> [42], <i>M. viridis</i> [43]	50 [44]
MC-LAib	<i>M. aeruginosa</i> [45]	ohne Angabe
[D-Asp <sup>3</sup> ]-MC-LL	<i>M. aeruginosa</i> [41]	ohne Angabe
MC-LL	<i>M. aeruginosa</i> [46]	+ [44]
MC-AR	<i>Microcystis</i> spp. [47]	250 [44]
MC-YA	<i>M. aeruginosa</i> [42]	ohne Angabe
[D-Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> ]-MC-LR	<i>M. aeruginosa</i> [48], <i>Anabaena</i> sp. [49]	+ [44]
[D-Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> ]-MC-GluMeGlu	<i>Anabaena</i> sp. [50]	+ [44]
MC-VF	<i>M. aeruginosa</i> [51]	ohne Angabe
[D-Asp <sup>3</sup> ]-MC-LR	<i>Aph. flos-aquae</i> [52], <i>M. aeruginosa</i> [53], <i>M. viridis</i> [54], <i>Osc. agardii</i> [55], <i>Anabaena</i> sp. [56]	160-300 [44]
[Dha <sup>7</sup> ]-MC-LR	<i>M. aeruginosa</i> [48], <i>Anabaena</i> sp. [49], <i>Osc. agardii</i> [55]	250 [44]
[DMAdda <sup>5</sup> ]-MC-LR	<i>Microcystis</i> spp. [47], <i>Nostoc</i> spp. [57], <i>M. aeruginosa</i>	90-100 [44]
[D-Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> ]-MC-MeGluMeGlu	<i>Anabaena</i> sp. [50]	+ [44]
[Dha <sup>7</sup> ]-MC-GluMeGlu	<i>Anabaena</i> sp. [50]	+ [44]
MC-LF	<i>M. aeruginosa</i> [58]	+ [44]
[(6Z)Adda <sup>5</sup> ]-MC-LR	<i>M. viridis</i> [54], <i>M. aeruginosa</i> [59]	> 1200 [44]
[D-Asp <sup>3</sup> , MeGlu <sup>6</sup> ]-MC-LR	<i>Aph. flos-aquae</i> [60]	ohne Angabe
[D-Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]-MC-HiIR	<i>Osc. rubescence</i> [61]	ohne Angabe
MC-LR	<i>M. aeruginosa</i> [42, 62], <i>Aph. flos-aquae</i> [52, 56], <i>M. viridis</i> [63]	50 [44]
[Dha <sup>7</sup> ]-MC-MeGluMeGlu	<i>Anabaena</i> sp. [50]	+ [44]
[Ser <sup>7</sup> ]-MC-LR	<i>Anabaena</i> sp. [64]	+ [44]
[Asp <sup>3</sup> , Ser <sup>7</sup> ]-MC-MeGluMeGlu	<i>Anabaena</i> sp. [50]	+ [44]
[Ser <sup>7</sup> ]-MC-GluMeGlu	<i>Anabaena</i> sp. [50]	+ [44]
MC-LY	<i>M. aeruginosa</i> [65]	90 [44]
[D-Asp <sup>3</sup> , ADMAdda <sup>5</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]-MC-LR	<i>Nostoc</i> sp. [66]	+ [44]
[D-Asp <sup>3</sup> , ADMAdda <sup>5</sup> ]-MC-LR	<i>Nostoc</i> sp. [67]	+ [44]
[MeGlu <sup>6</sup> ]-MC-LR	<i>Aph. flos-aquae</i> [60], <i>Microcystis</i> sp. [51, 68]	> 1000 [44]
MC-HiIR	<i>Microcystis</i> spp. [47]	100 [44]
[D-Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> ]-MC-RR	<i>Osc. agardii</i> [69], <i>Anabaena</i> sp. [49], <i>M. aeruginosa</i> [70]	+ [44]
[L-MeSer <sup>7</sup> ]-MC-LR	<i>Microcystis</i> spp. [47]	150 [44]
[Dha <sup>7</sup> ]-MC-FR	<i>Microcystis</i> spp. [70]	ohne Angabe
[Ser <sup>7</sup> ]-MC-MeGluMeGlu	<i>Anabaena</i> sp. [50]	+ [44]
[ADMAdda <sup>5</sup> ]-MC-LR	<i>Nostoc</i> sp. [67]	60 [44]
[D-Asp <sup>3</sup> , ADMAdda <sup>5</sup> ]-MC-LHar	<i>Nostoc</i> sp. [57]	+ [44]
[D-Asp <sup>3</sup> ]-MC-RR	<i>Osc. agardii</i> [69], <i>Anabaena</i> sp. [49], <i>M. aeruginosa</i> [70], <i>Aph. flos-aquae</i> [60]	250 [44]
[Dha <sup>7</sup> ]-MC-RR	<i>M. aeruginosa</i> [71], <i>Anabaena</i> sp. [49], <i>Osc. agardii</i> [55]	180 [44]
[D-Asp <sup>3</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]-MC-RR	<i>Osc. rubescence</i> [72]	250 [72]
MC-LW	<i>M. aeruginosa</i> [51]	ohne Angabe

Fortsetzung Tab. 1:

Toxin	Produzent	LD <sub>50</sub> (µg / kg; i. p., Maus)
MC-FR	<i>Anabaena</i> sp. , <i>Microcystis</i> spp. [47]	250 [44]
[D-Asp <sup>3</sup> ]-MC-YR	<i>Microcystis</i> spp. [64]	+ [44]
[Dha <sup>7</sup> ]-MC-YR	<i>M. aeruginosa</i> [60]	+ [44]
MC-YMetO	<i>M. aeruginosa</i> [42]	56 [44]
[ADMAAdda <sup>5</sup> ]-MC-LHar	<i>Nostoc</i> sp. [67, 73]	60 [44]
[(6Z)Adda <sup>5</sup> ]-MC-RR	<i>M. viridis</i> [54]	> 1200 [44]
MC-RR	<i>M. aeruginosa</i> [74], <i>M. viridis</i> [63], <i>Anabaena</i> sp. [49], <i>Aph. flos-aquae</i> [60]	600 [44]
[D-Ser <sup>1</sup> , ADMAAdda <sup>5</sup> ]-MC-LR	<i>Nostoc</i> sp. [57]	+ [44]
[ADMAAdda <sup>5</sup> , MeSer <sup>7</sup> ]-MC-LR	<i>Nostoc</i> sp. [57]	+ [44]
[D-Asp <sup>3</sup> , MeSer <sup>7</sup> ]-MC-RR	<i>Osc. agardii</i> [55]	+ [44]
[L-Ser <sup>7</sup> ]-MC-RR	<i>M. aeruginosa</i> [70], <i>Anabaena</i> sp. [64]	+ [44]
[D-Asp <sup>3</sup> ]-MC-HtyR	<i>Aph. flos-aquae</i> [75]	160-300 [44]
[Dha <sup>7</sup> ]-MC-HtyR	<i>Anabaena</i> sp. [76]	+ [44]
MC-YR	<i>M. aeruginosa</i> [42], <i>M. viridis</i> [63]	70 [44]
[D-Asp <sup>3</sup> , ADMAAdda <sup>5</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]-MC-RR	<i>Nostoc</i> sp. [66]	+ [44]
[Glu-OC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> (CH <sub>3</sub> )OH <sup>6</sup> ]-MC-LR	<i>Microcystis</i> spp. [47]	> 1000 [44]
MC-HtyR	<i>Aph. flos-aquae</i> [75]	80-100 [44]
[L-Ser <sup>7</sup> ]-MC-HtyR	<i>Anabaena</i> sp. [76]	+ [44]
MC-HarHar	<i>Microcystis</i> spp. [77]	ohne Angabe
MC-(H <sub>4</sub> )YR = MC-ThTyrR	<i>Microcystis</i> spp. [47]	ohne Angabe
MC-WR	<i>Microcystis</i> spp. [47]	150-200 [44]
[D-Asp <sup>3</sup> , ADMAAdda <sup>5</sup> , Dhb <sup>7</sup> ]-MC-HtyR	<i>Nostoc</i> sp. [66]	+ [44]
[L-MeLan <sup>7</sup> ]-MC-LR	<i>Microcystis</i> spp. [47]	1000 [44]
<b>Nodularine</b>		
NOD	<i>Nod. spumigena</i> [14, 62, 78]	50-70 [62, 78-80]
[D-Asp <sup>1</sup> ]-NOD	<i>Nod. spumigena</i> [81]	75 [82]
[DMAAdda <sup>3</sup> ]-NOD	<i>Nod. spumigena</i> [81]	150 [82]
[Dhb <sup>5</sup> ]-NOD	<i>Nod. spumigena</i> [81]	ohne Angabe
[Glu <sup>4</sup> (OMe)]-NOD	<i>Nod. spumigena</i> [81]	ohne Angabe
[MeAdda <sup>3</sup> ]-NOD	<i>Nod. spumigena</i> [81]	> 1200 [68]
[L-Val <sup>2</sup> ]-NOD	<i>Theonella swinhoei</i> (Schwamm) [83]	ohne Angabe
[L-Har <sup>2</sup> ]-NOD	<i>Nod. spumigena</i> [84, 85]	70 [82]
<b>PSP-Toxine</b>		
STX	<i>L. wollei</i> [86, 87], <i>Aph. flos-aquae</i> [88], <i>C. raciborskii</i> [89], <i>An. circinalis</i> [90, 91], <i>Aph. gracile</i> [92]	10 [88]
NEO	<i>Aph. flos-aquae</i> [88], <i>C. raciborskii</i> [89], <i>Aph. gracile</i> [92]	65 [88]
dcSTX	<i>An. circinalis</i> [90, 91], <i>L. wollei</i> [87], <i>Aph. flos-aquae</i> [88]	ohne Angabe
GTX 1	<i>Aph. flos-aquae</i> [93], <i>C. raciborskii</i> [89]	ohne Angabe
GTX 2	<i>An. circinalis</i> [90, 91]	ohne Angabe
GTX 3	<i>An. circinalis</i> [90, 91]	ohne Angabe
GTX 4	<i>L. wollei</i> [87], <i>Aphanizomenon</i> sp. [94]	ohne Angabe
B 1	<i>An. circinalis</i> [90, 91], <i>Aph. flos-aquae</i> [88]	ohne Angabe
B 2	<i>L. wollei</i> [87]	ohne Angabe
dcGTX 2	<i>An. circinalis</i> [90, 91], <i>Aph. flos-aquae</i> , [88] <i>L. wollei</i> [87]	ohne Angabe
dcGTX 3	<i>An. circinalis</i> [90, 91], <i>Aph. flos-aquae</i> , [88] <i>L. wollei</i> [87]	ohne Angabe
C 1	<i>An. circinalis</i> [90, 91]	ohne Angabe
C 2	<i>An. circinalis</i> [90, 91]	ohne Angabe
LWTX-1	<i>L. wollei</i> [87]	ohne Angabe
LWTX-2	<i>L. wollei</i> [87]	ohne Angabe
LWTX-3	<i>L. wollei</i> [87]	ohne Angabe
LWTX-4	<i>L. wollei</i> [87]	ohne Angabe
LWTX-5	<i>L. wollei</i> [87]	ohne Angabe
LWTX-6	<i>L. wollei</i> [87]	ohne Angabe

*An.* = *Anabaena*; *Aph.* = *Aphanizomenon*; *C.* = *Cylindrospermopsis*; *L.* = *Lyngbya*;  
*M.* = *Microcystis*; *Nod.* = *Nodularia*; *Nos.* = *Nostoc*; *Osc.* = *Oscillatoria*

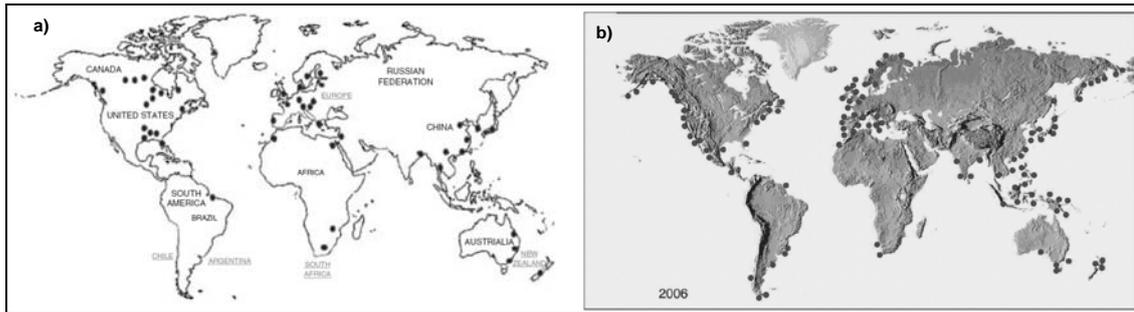


Abb. 1: Verbreitung cyanobakterieller Toxine a) Microcystine (2005) [1] b) PSP-Toxine (2006) [95]

### 2.3.1 Vergiftungsfälle

Die erste Beschreibung einer Vergiftung durch Cyanobakterien stammt aus dem Jahr 1878. Damals kam es in Australien durch eine Blüte von *Nodularia spumigena* zum Sterben von Warmblütern, darunter vor allem Weidevieh [4].

Auch über schwerwiegende Intoxikationen des Menschen durch cyanobakterielle Toxine wurde mehrfach berichtet [3, 6, 9, 10, 96].

1988 kam es in Brasilien zum Ausbruch einer gastroenteritischen Epidemie. Über 2000 Fälle mit gastroenteritischen Beschwerden wurden bekannt, wobei 88 Personen starben. Untersuchungen von Trinkwasser, Blut und Faeces der Patienten wiesen auf Blaualgen (*Anabaena sp.* und *Microcystis sp.*) in der Talsperre als Ursache hin [9]. 1979 trat an der Küste Queenlands in Australien eine massive *Cylindrospermopsis raciborskii*-Blüte auf, und diese war für eine Hepatoenteritis, auch Palm Island Mystery-Krankheit genannt, verantwortlich, an der 150 Personen erkrankten. Die Ursache konnte auf eine Trinkwasserversorgungsstelle zurückgeführt werden, die mit kontaminiertem Wasser gespeist wurde [3]. 1996 kam es in einem brasilianischen Hämodialysezentrum zu einem schweren Unfall. 117 von 136 Patienten erkrankten nach einer normalen Hämodialysebehandlung. 50 Patienten verstarben am sog. Caruaru-Syndrom, was mit Leberschäden einherging. Phytoplanktonuntersuchungen des Trinkwassers zeigten sehr hohe Konzentrationen an *Microcystis sp.*, *Anabaena sp.* und *Cylindrospermopsis sp.*. Auch im Patientenblut und im Lebergewebe konnten MC-Konzentrationen nachgewiesen werden [6, 96].

In Deutschland sind noch keine Vergiftungsfälle des Menschen durch kontaminiertes Trinkwasser oder kontaminierte Muscheln, Krebse oder Fische aufgetreten. Allerdings wurde mehrfach über Vergiftungen von Tieren infolge

massiver Blaualgenblüten in der Ostsee berichtet. So verendeten im Juli 1963 in einer Wassergeflügelfarm auf Rügen 400 Enten, was auf eine *Nodularia spumigena*-Blüte zurückgeführt werden konnte [8]. Eine weitere *Nodularia*-Blüte wurde im August 1974 in der Ostsee beobachtet, deren Toxizität durch den Maustest bestätigt werden konnte [7]. Im Vergleich zum Jahr 1963 zeichnete sich diese *Nod. spumigena*-Blüte 1974 jedoch durch eine anders geprägte Begleitflora aus. Im August 1985 erfolgte erneut ein *Nodularia*-Massenwachstum bei Stralsund, verbunden mit Todesfällen in einer Rinderherde [5].

### **2.3.2 Belastung von Gewässern mit cyanobakteriellen Toxinen**

Auch in den deutschen Binnenseen wurde in den letzten Jahren vermehrt das Auftreten toxischer Cyanobakterien beobachtet. Im Rahmen eines Monitoringprogramms in den Jahren 1992/1993 wurde in 9 von 12 untersuchten Gewässern die Anwesenheit von MCs festgestellt [97]. Daraufhin wurde zwischen 1995 und 1997 ein weitreichendes Screening unter der Leitung des Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) durchgeführt, in dem über 120 Binnengewässer auf das Vorkommen cyanobakterieller Toxine, insbesondere von MCs, ANA und PSP-Toxine, hin untersucht wurden [11, 98]. Im Phytoplankton dominierten während des gesamten Untersuchungszeitraums die Cyanobakterien *Oscillatoria* spp., *Microcystis* spp., *Anabaena* spp. und *Aphanizomenon* spp., welche potentielle Toxinproduzenten darstellen. Microcystine wurden in 52 %, Anatoxin-a und PSP-Toxine in 26 % oder 34 % aller analysierten Gewässer detektiert. 1995 wurde das Vorkommen von *Cylindrospermopsis raciborskii*, einer Wärme liebenden Blaualge tropischer Regionen, auch im Gebiet Spree-Dahme bestätigt [99]. Daraufhin wurden 22 Seen im Raum Mecklenburg-Vorpommern und Brandenburg hinsichtlich der von dieser Blaualge gebildeten CYNs untersucht, wobei dieses Toxin erstmalig in Europa detektiert werden konnte. Ein zweiter Nachweis von CYN im Gebiet Brandenburg und Mecklenburg-Vorpommern erfolgte in den Jahren 1999 und 2000, wobei lediglich *C. raciborskii* als Toxinproduzent identifiziert wurde [100].

Allerdings können cyanobakterielle Toxine nicht nur über das Trinkwasser, sondern auch über Akkumulation in Süßwassermuscheln oder -fischen in die

menschliche Nahrungskette gelangen. Solche Toxin-Anreicherungen wurden u. a. für Muscheln mit PSP-Toxinen [91] und CYNs [101], für den Kugelfisch mit PSP-Toxinen [102], für den Rotscherenkrebs *Cherax quadricarinatus* mit CYNs [103] oder für Miesmuscheln und Flundern mit NODs [104, 105] beschrieben.

### **2.3.3 Belastung von Badegewässern**

Oberflächenwasser ist nicht nur die Grundlage für Trinkwasser, sondern es stellt auch als Brauchwasser in der Industrie sowie der Landwirtschaft und insbesondere als Badegewässer eine Expositionsquelle für den Menschen dar, aus dem die Toxine oral oder cutan aufgenommen werden können. Besonders während der Badesaison ist zu beachten, dass nicht nur das Schlucken sondern auch die Inhalation und der direkte Hautkontakt zu Symptomen wie Haut- und Schleimhautreizungen, Bindehautentzündungen, Ohrenschmerzen aber auch zu Gastroenteriden, Atemwegserkrankungen, allergischen Reaktionen und Leberveränderungen führen können [106, 107]. Deshalb warnt das Umweltministerium speziell in den Sommermonaten vor Blaualgenblüten in bestimmten Gewässern.

### **2.3.4 Belastung von Nahrungsergänzungsmitteln**

Eine andere Expositionsquelle für cyanobakterielle Toxine in der menschlichen Ernährung stellen Nahrungsergänzungsmittel auf der Basis von Mikroalgen, insbesondere von *Spirulina*, *Chorella* oder *Aphanizomenon flos-aquae* dar. Diesen Algenprodukten werden positive Wirkungen auf den Stoffwechsel, besonders entzündungshemmende, antioxidative, antivirale, antimikrobielle, anticancerogene, cholesterinsenkende, immunmodulierende sowie die Darmflora stärkende Effekte zugeschrieben [108]. Bei Untersuchungen unterschiedlicher Algenprodukte wurden in Tabletten, Kapseln und Pulvern wiederholt MCs mit Konzentrationen bis zu 35 µg / g Trockenmasse nachgewiesen [109-113]. Besonders MC-belastet können Nahrungsergänzungsmittel mit *Aph. flos-aquae* als Hauptbestandteil (AFA-Algen) sein, da die Biomasse von einem stehenden Gewässer, dem See Klamath in Oregon (USA), abgefischt wird, dessen Phytoplankton auch andere toxinbildende Cyanobakterienspezies enthalten kann [113].

### **2.3.5 Lebensmittelrechtliche und dem Schutz der Gesundheit dienende Regelungen**

#### 2.3.5.1 Muscheln und Fischereierzeugnisse

In der Verordnung über die hygienischen Anforderungen an Fischereierzeugnisse und lebende Muscheln (Fischhygiene-Verordnung) vom 8. Juni 2000 werden Grenzwerte für lebende Muscheln oder daraus hergestellte Fischereierzeugnisse hinsichtlich einer Kontamination mit PSP-Toxinen in Höhe von 800 Mikrogramm 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. In der Verordnung (EG) Nr. 2074/2005 wird der Maustest als Referenzmethode für die Einhaltung der Verordnungen (EG) Nr. 853/2004 und 854/2004 vorgeschrieben.

#### 2.3.5.2 Trinkwasser

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) legte 1998 einen Richtwert von 1,0 Mikrogramm MC-LR je Liter Trinkwasser fest [114]. Dieser Microcystin-Richtwert kann gemäß der Norm ISO 20179 durch Festphasenextraktion und chromatographischer Trennung mit anschließender ultravioletter (UV) Detektion überprüft werden.

#### 2.3.5.3 Badegewässer

Das Umweltbundesamt gab 2003 eine Empfehlung zum Schutz von Badenden vor Cyanobakterien-Toxinen, wonach die MC-Konzentration unter 100 Mikrogramm je Liter Wasser liegen sollte, um damit Sicherheit vor der Gefahr einer akuten Vergiftung beim Baden zu gewährleisten. Allerdings sollten bereits bei Gehalten von 10-100 Mikrogramm MCs je Liter Wasser Warnhinweise an die Bevölkerung gegeben und evtl. Badeverbote ausgesprochen werden [115].

### 2.3.5.4 Nahrungsergänzungsmittel

Zur Risikobewertung von Nahrungsergänzungsmitteln hinsichtlich einer Belastung mit cyanobakteriellen Toxinen gilt eine tolerierbare tägliche Zufuhr von 20 Mikrogramm MC-LR als sicher (Tolerable daily intake, TDI). Basierend auf diesem Wert und einer Tablettengröße von 2 g schlugen Schaeffer et al. einen Sicherheitswert von 10 Mikrogramm MC-LR pro Gramm AFA-Algenprodukt vor [116]. Für alle Nahrungsergänzungsmittel cyanobakteriellen Ursprungs, die in Oregon, USA, verkauft werden, legte die Oregon Health Division eine Höchstmenge von 1 Mikrogramm MC je Gramm Trockenmasse fest [110].

## 2.4 Struktur und Toxikologie

### 2.4.1 Anatoxine

Anatoxin-a (ANA), und dessen Strukturanalogon Homoanatoxin-a (HANA) und das Derivat Carboxylanatoxin-a (CarboxylANA) [20] stellen sekundäre Amine mit Alkaloidstruktur dar. Beim Abbau von ANA und HANA unter alkalischen Bedingungen, Sonnenlichtexposition, sowie bakterieller Aktivität werden die untoxischen Toxinderivate Dihydro- (DihydroANA, DihydroHANA, DihydromethoxyHANA), Epoxy- (EpoxyANA, EpoxyHANA), Hydroxy- (HydroxyHANA) und Ketoderivate (KetoHANA) gebildet (Abb. 2) [117].

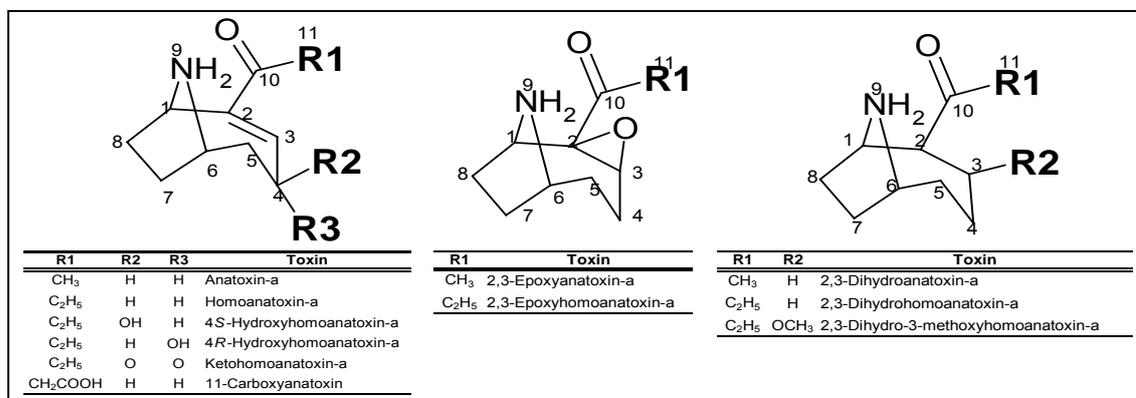


Abb. 2: Chemische Strukturen von Anatoxin-a, Homoanatoxin-a und deren Abbauprodukten

ANA und HANA verfügen aufgrund der Struktur analogie zu Kokain und dem Neurotransmitter Acetylcholin über eine neurotoxische Wirksamkeit, indem sie

an den nikotinischen Acetylcholinrezeptor der Natriumkanäle an der postsynaptischen Neurotransmitterplatte binden. Dort bewirken sie eine Öffnung der Natriumkanäle, die eine Kontraktion der Muskelzellen induzieren. ANA und HANA können im Gegensatz zu Acetylcholin nicht durch die Acetylcholinesterase deaktiviert werden, so dass die Ionenkanäle geöffnet und die Muskelkontraktionen erhalten bleiben. Der intraperitoneale (i. p.) LD<sub>50</sub>-Wert im Maustest liegt für ANA zwischen 50 und 250 µg pro kg Körpergewicht [21-23], für HANA bei 250 µg pro kg Körpergewicht [24].

ANA agiert zusätzlich als nikotinischer Cholinagonist im kardiovaskulärem System, einhergehend mit erhöhtem Blutdruck und einem Anstieg der Herzfrequenz [118].

#### 2.4.2 *Anatoxin-a(s)*

Anatoxin-a(s) stellt als einziger natürlich vorkommender Phosphatester von N-Hydroxyguanidin, ein Analogon von Organophosphorpestiziden wie Parathion und Malathion dar (Abb. 3). Im basischen Milieu kommt es zur Abspaltung der Monomethyl-Phosphatgruppe. Die unterschiedliche chemische Struktur von ANAS im Vergleich zu ANA geht einher mit einer anderen Wirkungsweise durch direkte Hemmung der Acetylcholinesterase, so dass Acetylcholin nach Ausschüttung nicht in Essigsäure und Cholin gespalten werden kann, was ebenfalls zu einer Überstimulierung der Muskulatur führt [26]. Die letale Dosis (i. p.) im Maustest liegt bei 20 µg pro kg Körpergewicht [29]. Bei diesem Mechanismus ist der postsynaptische Natriumkanal permanent geöffnet und ein zu hohes Aktionspotenzial wird gebildet, wodurch die Muskulatur überstimuliert wird. Wenn die Lungenmuskulatur betroffen ist, kann die Sauerstoffversorgung stark eingeschränkt sein.

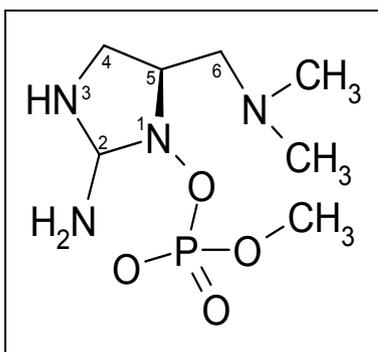


Abb. 3: Chemische Struktur von Anatoxin-a (s)

### 2.4.3 *Cylindrospermopsine*

Cylindrospermopsin (CYN), ein Alkaloid mit tricyclischem Guanidinring verbunden mit einer Hydroxymethyluracil-Einheit, wurde als Hauptvertreter der CYNs erstmalig im Jahr 1992 beschrieben [40]. Später konnten ein CYN-Tautomer 7-Deoxycylindrospermopsin (DoCYN) [119] und ein Epimer 7-Epicylindrospermopsin (EpiCYN) [35] charakterisiert werden (Abb. 4).

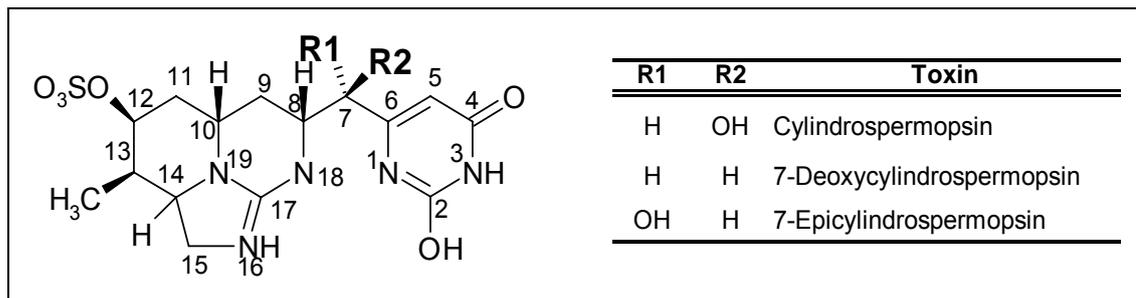


Abb. 4: Chemische Struktur der Cylindrospermopsine

Hinsichtlich der Toxizität ist die Stellung der Hydroxylgruppe am C7 von untergeordneter Bedeutung, da die Epimere CYN und EpiCYN eine ähnlich hohe toxische Wirkung mit einem LD<sub>50</sub>-Wert von 2100 mg / kg für CYN besitzen [40]. Die Uracileinheit dagegen hat einen entscheidenden Einfluss auf die toxische Aktivität, da DoCYN zehnmal weniger toxisch ist. Diese Tatsache wird auf das Vorhandensein der Hydroxylgruppe in der Uracilgruppe und auf den Keto-Enol-Status des Uracils zurückgeführt [119, 120].

Obwohl CYN wasserlöslich ist, wird es neben einer Diffusion auch über die Gallensäuretransporter in die Leber aufgenommen. CYN hemmt die Proteinbiosynthese stark und irreversibel, induziert Apoptose und Veränderungen an Leberzellen. Das Toxin kann durch kovalente Bindung an die DNA [121] einen Einfluss auf deren Struktur in Form von Strangbrüchen ausüben [122]. Außerdem hemmt CYN die Glutathionsynthese [123]. Eine Oxidation von CYN durch das Cytochrom P450 - Enzymsystem kann mit Bildung stärker wirkender Verbindungen eine Bioaktivierung, einhergehend mit schnellerem Absterben von Hepatocyten bewirken [121].

CYN hat neben einer Lebertoxizität auch Einfluss auf die Nierenfunktion, wobei renale Effekte durch eine verringerte Proteinausscheidung, erhöhtes Gewebewachstum und tubuläre Läsionen sichtbar werden [124].

### 2.4.4 Microcystine und Nodularine

Microcystine und Nodularine sind strukturell und funktionell verwandte Hepatotoxingruppen. MCs sind kleine Peptide, aufgebaut aus sieben Aminosäuren (AS), mit einem Molekulargewicht zwischen 895 und 1114 Da und einer allgemeinen Aminosäuresequenz von D-Alanin (Ala, A) - X - D-erythro- $\beta$ -Methylasparaginsäure (MeAsp) - Y - 3-Amino-9-Methoxy-2,6,8-Trimethyl-10-Phenyldeca-4,6-Diensäure (Adda) - D-Glutaminsäure (Glu) - 2-Methylamino-2-Dehydroalanin (Mdha) (Abb. 5). Dabei stellen X und Y variable AS dar, die entsprechend des 1-Buchstabencodes für die Nomenklatur der Microcystine verantwortlich sind [125]. Das am besten untersuchte MC ist MC-LR mit L-Leucin (Leu, L) an Position 2 und L-Arginin (Arg, R) an Position 4. Allerdings sind an allen Positionen Strukturvarianten vorhanden, so dass bisher über 70 MC-Analoga (Tab. 1) beschrieben sind. Diese Veränderungen beinhalten Desmethylierungen an den Positionen 3 und / oder 7, Veränderungen im Adda-Rest mit 9-O-Acetyl-O-Desmethyl-Adda (ADMAdda) oder 9-O-Desmethyl-Adda (DMAdda), Veresterung des Glutaminsäurerests und Substitutionen an Position 7 durch N-Methylserin, Serin, Dehydroalanin (Dha) oder 2-Amino-2-Butensäure (Dehydrobutyrine, Dhb). Für derartige Veränderungen ist eine Schreibweise wie z. B. [D-Asp<sup>3</sup>]-MC-LR bei Desmethylierung an Position 3 im MC-LR-Molekül üblich [125].

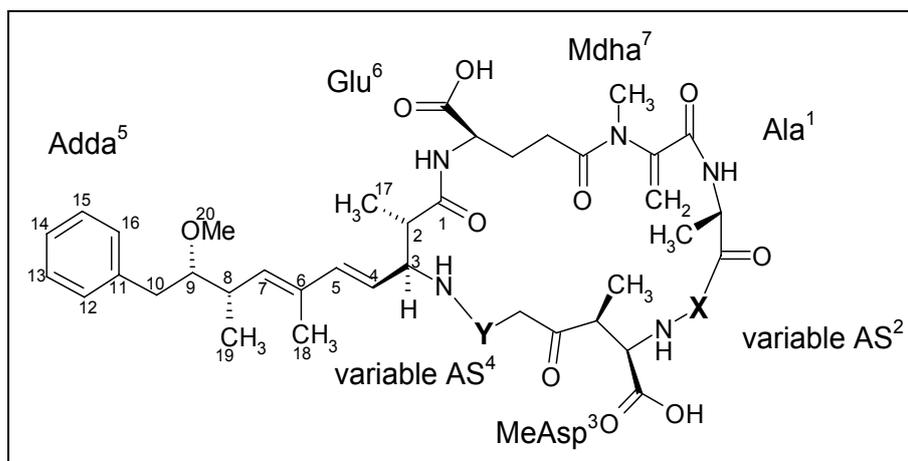


Abb. 5: Allgemeine chemische Struktur der Microcystine mit X und Y als variable Aminosäuren

Die Aminosäuresequenz des Pentapeptides NOD lautet MeAsp, L-Arginin (Arg), Adda, Glu und 2-Methylamino-2-Butensäure (2-Methyl-Dehydrobutyrine, Mdhb), erstmalig von Rinehart et al. beschrieben [62]. Derzeit sind neben einem NOD-Isomer fünf Nodularinvarianten durch Methylierung oder Desmethylierung [81], zwei Aminosäuresubstitutionen mit L-Homoarginin (Har) [84, 85] oder L-Valin (Val) [83] anstatt Arg an Position 3 bekannt (Abb. 6).

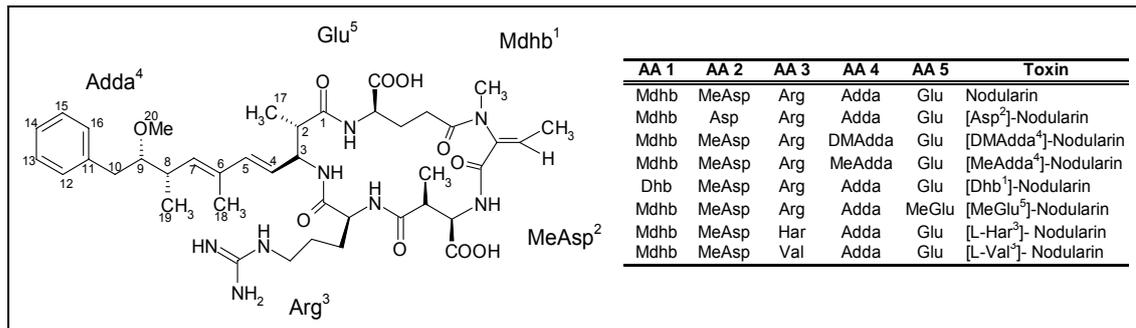


Abb. 6: Chemische Struktur der Nodularine

MCs werden nach Aufnahme über den Magen-Darm-Trakt oder über Gallensäuretransporter [126] im Blut verteilt und binden spezifisch im Lebergewebe. Dort blockieren sie das katalytische Zentrum von Proteinphosphatasen (PP) durch Interaktion der Glutamylposition 6 und der Adda-Seitenkette an Position 5 [127]. Eine kovalente Bindung der MCs erfolgt durch den Mdha-Rest an Position 7 mit einem Cysteinrest der Enzyme [128]. Strukturelle Veränderungen im Adda- und Glutamylrest beeinflussen die Microcystintoxizität, so dass 6(Z)-Adda-Peptide ebenso wie Toxine mit einer Veresterung von Glu biologisch inaktiv sind [68, 129-131]. NODs binden im Gegensatz zu den MCs nicht kovalent an PP [132], hemmen diese aber genauso in ihrer Tätigkeit. Bevorzugte PP sind PP1 und PP2A, wobei deren Hemmung die Phosphorylierung von zellulären Proteinen erhöht, so dass eine Hyperphosphorylierung von Zellfilamenten zu einer Veränderung des Zellskeletts führt [133, 134]. Im Lebergewebe wird der Kontakt zu Nachbarzellen gestört, einhergehend mit einer Instabilität der Sinuskapillaren, die in intraperitonealer Hämorrhagie und Leberfunktionsstörungen endet [135]. Die Toxizität der über 70 beschriebenen MCs variiert sehr stark mit den LD<sub>50</sub> Werten (i. p.) von 50 µg kg<sup>-1</sup> für MC-LA, MC-LR, [Asp<sup>3</sup>]-MC-LR bis zu > 1000 µg kg<sup>-1</sup> für [GluMe<sup>6</sup>]-MC-LR und [Glu-OC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)OH<sup>6</sup>]-MC-LR (Tab. 1). Durch das Ersetzen von L-Leu in der zweiten Position durch eine andere

hydrophobe Aminosäure wie Ala, Phe oder Trp bleibt die Toxizität überwiegend unverändert, jedoch kann diese durch Substitution mit hydrophilen Aminosäuren wie Arg erheblich reduziert werden [136]. Veränderungen in feststehenden Aminosäureresten haben lediglich einen geringen Einfluss auf die toxische Wirksamkeit. Die meisten NODs weisen einen intraperitonealen LD<sub>50</sub>-Wert zwischen 50 und 150 µg / kg auf (Tab. 1).

Im Rahmen einer Tumorpromotion durch MCs und NODs können Tumorsuppressorgenprodukte wie p53 inaktiviert werden [137], wodurch Krebszellen in Leber und Colon stimuliert werden [129, 138]. Dabei erzielt NOD eine stärkere Wirkung [139]. In Lebergewebe [140] und Hautgewebe [141] konnten durch MC-LR und NOD Tumore induziert werden. Die Genotoxizität von Microcystinen konnte mittels Ames-Test, Kometentest und Mikrosatellitentest nachgewiesen werden [142, 143].

Durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies können MCs oxidativen Stress auslösen, der zu Lipidoxidationen und Membranschäden führt [144-148].

Der Entgiftungsmechanismus von Microcystinen und Nodularinen setzt mit einer Konjugation an Glutathion (GSH) ein [149]. Da die Bindung an der AS 1 im Peptidring stattfindet, liegt der gegenüberliegende Adda-Rest frei und kann weiterhin an die PP binden. Die Biotransformation ist am besten für MC-LR untersucht. Dipeptidasen greifen am Konjugat an, die Glutaryl- und Glycyleinheit wird abgespalten und es entsteht ein MC-LR-Cystein-Konjugat [149]. Die MC-Metaboliten und nicht-metabolisierten MCs werden von der Leber über die Blutbahn oder über Gallensäuren in den Darm transportiert [150]. Aus dem Blut können die MCs auch von anderen Organen wie der Muskulatur, der Niere oder dem Gehirn aufgenommen werden [151, 152].

#### **2.4.5 PSP-Toxine**

Die PSP-Toxine stellen eine Alkaloid-Familie mit bisher 30 beschriebenen Derivaten dar (Abb. 7), bestehend aus einem Tetrahydropurin-Grundgerüst mit zwei Guanidinogruppen. Saxitoxin (STX) und sein 1-Hydroxy-Derivat Neosaxitoxin (NEO) gelten als die Elternsubstanzen, von denen die anderen Derivate durch Substitution an verschiedenen Positionen gebildet werden [153]. Natürliche Derivate von STX haben Substitutionen an R1-R5.

Die PSP-Toxine werden entsprechend ihrer Seitenketten eingeteilt [154]:

- Carbamoyltoxine (STX, NEO, Gonyautoxin 1-4 = GTX1-4)
- N-Sulfocarbamoyltoxine (Gonyautoxin 5-6 = GTX5-6 = B1-2, C1-4)
- Decarbamoyltoxine (Decarbamoylsaxitoxin = dcSTX, Decarbamoyl-neosaxitoxin = dcNEO, Decarbamoylgonyautoxin 1-4 = dcGTX1-4)
- Deoxydecarbamoyltoxine (Deoxydecarbamoylsaxitoxin = doSTX, Deoxydecarbamoylgonyautoxin 2-3 = doGTX2-3).

Die zwei Guanidinogruppen im Molekül verfügen über eine positive Ladung. C11-Hydroxysulfongruppen an R2/R3 und C21-Sulfongruppen an R4 reduzieren die Nettoladung um eine Einheit. Befindet sich an R4 zusätzlich ein Sulfocarbamoylrest, beträgt die Nettoladung des Toxins null. Die Molekülladung beeinflusst sowohl die chromatographische Trennung wie auch die Toxikologie der PSP-Toxine [155].

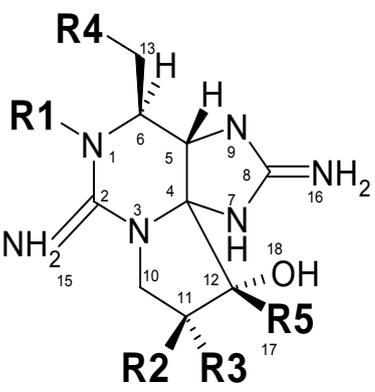
	Chemische Struktur					Toxin	Toxizitätsfaktor [156]	[M+H] <sup>+</sup>
	R1	R2	R3	R4	R5			
	H	H	H	OCO-NH <sub>2</sub>	OH	<b>STX</b>	1,00	300
	OH	H	H	OCO-NH <sub>2</sub>	OH	<b>NEO</b>	0,92	316
	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OCO-NH <sub>2</sub>	OH	<b>GTX1</b>	0,99	412
	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OCO-NH <sub>2</sub>	OH	<b>GTX2</b>	0,36	396
	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	OCO-NH <sub>2</sub>	OH	<b>GTX3</b>	0,64	396
	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	OCO-NH <sub>2</sub>	OH	<b>GTX4</b>	0,73	412
	H	H	H	OCO-NH-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH	<b>GTX5 / B1</b>	0,06	380
	OH	H	H	OCO-NH-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH	<b>GTX6 / B2</b>	0,07	396
	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OCO-NH-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH	<b>C1</b>	0,01	476
	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	OCO-NH-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH	<b>C2</b>	0,10	476
	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OCO-NH-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH	<b>C3</b>	0,01	492
	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	OCO-NH-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH	<b>C4</b>	0,06	492
	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH	OH	<b>dcGTX1</b>	keine Angaben	369
	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH	OH	<b>dcGTX2</b>	0,65	353
	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	OH	OH	<b>dcGTX3</b>	0,75	353
	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	OH	OH	<b>dcGTX4</b>	keine Angaben	369
	H	H	H	OH	OH	<b>dcSTX</b>	0,51	257
	OH	H	H	OH	OH	<b>dcNEO</b>	keine Angaben	273
	H	H	H	H	OH	<b>doSTX</b>	keine Angaben	241
	OH	H	H	H	OH	<b>doNEO</b>	keine Angaben	257
	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	OH	<b>doGTX1</b>	keine Angaben	353
	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OCO-CH <sub>3</sub>	H	<b>LWTX-1</b>	keine Angaben	379
	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OCO-CH <sub>3</sub>	OH	<b>LWTX-2</b>	keine Angaben	395
	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	OCO-CH <sub>3</sub>	OH	<b>LWTX-3</b>	keine Angaben	395
	H	H	H	OCO-CH <sub>3</sub>	OH	<b>LWTX-4</b>	keine Angaben	241
	H	H	H	OCO-CH <sub>3</sub>	OH	<b>LWTX-5</b>	keine Angaben	299
	H	H	H	OCO-CH <sub>3</sub>	H	<b>LWTX-6</b>	keine Angaben	283
	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OCO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	OH	<b>GC-1</b>	keine Angaben	441
	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	OCO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	OH	<b>GC-2</b>	keine Angaben	441
	H	H	H	OCO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH	OH	<b>GC-3</b>	keine Angaben	346

Abb. 7: Chemische Struktur und Toxizitätsfaktoren der Paralytic Shellfish Poisoning - Toxine

Diese Blaualgentoxine können durch Akkumulation in Muscheln in die menschliche Nahrungskette geraten, so dass diese das entsprechende Toxinprofil widerspiegeln. Allerdings kann das PSP-Toxinmuster der Muscheln

vom Pattern der Blaualgen abweichen, da die PSP-Toxine einer Biotransformation unterliegen.

PSP-Toxine mit einer 11-Hydroxysulfonsäure unterliegen einer Epimerisierung aufgrund einer Keto-Enol-Tautomerie zu ihren  $\beta$ -Epimeren [156]. Somit wird ein Gleichgewicht zwischen den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Epimerformen mit einem Verhältnis von ca. 1:3 eingestellt [157]. 11-O-Sulfattoxine unterliegen im sauren pH-Bereich einem Abbau durch Abspaltung der Sulfoniumgruppe. N1-Hydroxyverbindungen wie NEO sind meist säure- und hitzelabiler als STX [158]. Im Muschelgewebe finden ähnliche Umwandlungen der O-Sulfo- und N-Hydroxyderivate zu STX statt [159]. Eine weitere enzymatische Umwandlung kann in Muscheln stattfinden, indem eine Oxidase GTX2 und GTX3 in GTX1 und GTX4 und eine N-Sulfotransferase die Carbamoyltoxine in die entsprechenden C-Toxine umwandelt. Andererseits werden C-Toxine im neutralem pH-Bereich zu ihren Decarbamoylderivaten hydrolysiert [157]. Die Carbamoyltoxine können enzymatisch einer Abspaltung der Carbamoyl-Gruppe unterliegen, wodurch die entsprechenden Decarbamoyltoxine entstehen [160].

PSP-Toxine werden durch die Darmmukosa aufgenommen, binden an Natriumkanäle in Nervenzellen und hemmen dadurch die neuronale Signalübertragung, was zu Muskelparalyse und Atemstillstand führen kann [161].

Die Substituenten im Molekül haben einen erheblichen Einfluss auf die individuelle toxische Wirksamkeit von PSP-Toxinen durch Veränderung der spezifischen Bindung an die Natriumkanäle [162, 163]. Die nicht-sulfatierten Carbamoyltoxine STX und NEO haben die höchste Toxizität und sind 10-100 mal toxischer als ihre N-Sulfocarbamoylderivate [153]. Am geringsten toxisch sind die zweifach sulfatierten C-Toxine. Mit Hilfe von Toxizitätsfaktoren, die auf den Einzeltoxizitäten (Abb. 7) der PSP-Toxine beruhen, kann die Gesamtoxizität eines Gemisches von PSP-Toxinen bestimmt werden [157].

## 2.5 Chromatographische Erfassung

### 2.5.1 *Detektion nach chromatographischer Trennung*

#### 2.5.1.1 Ultraviolett-Detektion

Bei der Ultraviolett-Detektion (UV-Detektion) wird die spektrale Absorption von Substanzen im UV- und im sichtbaren (visible, VIS) Bereich zu ihrem selektiven Nachweis genutzt. Die Absorption bei gegebener Wellenlänge folgt dabei dem Lambert-Beer'schen Gesetz und liefert ein konzentrationsabhängiges Signal. Variable Wellenlängendetektoren ermöglichen die stufenlose Wahl der Detektionswellenlänge. Der Dioden-Array (DA) - Detektor stellt eine Sonderform des UV-Detektors dar. Er ermöglicht die Aufnahme von UV-Spektren innerhalb von Millisekunden während der Entwicklung eines Chromatogramms und liefert dadurch zusätzliche Informationen.

#### 2.5.1.2 Fluoreszenzdetektion (FLD)

Durch Absorption von UV-Licht lassen sich Substanzen mit konjugierten und gleichzeitig delokalisierten Doppelbindungen zur Lichtemission anregen, so dass sie danach längerwelligeres Licht emittieren. Die spektrale Verteilung des emittierten Lichtes ist von der Wellenlänge des anregenden Lichtes abhängig. Manche Verbindungen zeigen eine natürliche Fluoreszenz, andere können durch Derivatisierung in eine fluoreszierende Substanz umgewandelt werden.

#### 2.5.1.3 Massenspektrometrie (MS)

Massenspektrometer, als Detektoren nach einer HPLC-Trennung eingesetzt, bestehen aus drei Teilen: dem Interface, in dem das Eluat eintritt und die Ionen erzeugt werden; dem Massenanalysator, in dem die Ionen selektiert werden und dem Detektor, welcher die Intensität des Ionenstrahls misst. Bei der Elektrosprayionisierung (ESI) werden Ionen durch „Coulomb-Explosion“ von geladenen Tröpfchen erzeugt. Dabei können einfach und mehrfach geladene Ionen, sog. Pseudomolekularionen, zusammen mit einer Reihe von Clusterionen entstehen. Als Massenanalysatoren werden vor allem Quadrupole eingesetzt, in denen Ionen mit einem bestimmten Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

( $m/z$ ) stabile Bahnen auf ihrem Weg durch das elektrische Feld beschreiben bevor sie den Detektor erreichen. Als Detektor dient ein Sekundärelektronenvervielfacher. Beim Selected-Ion-Monitoring-Modus (SIM-Modus) werden einzelne spezifische Massen selektiert, während im Scan-Modus die einzelnen Massen eines definierten Massenbereiches aufgezeichnet werden.

#### 2.5.1.4 Tandem-Massenspektrometrie

Bei der LC-MS/MS-Kopplung wird ein dreistufiges Massenspektrometer (Triple Quadrupol) eingesetzt. Nach Ionisation wird im ersten Quadrupol (Q1) spezifisch das Pseudomolekularion der interessierenden Substanz herausgefiltert. Dieses Ion wird dann im zweiten Quadrupol (Q2), der Kollisionszelle, durch Elektronenstoß angeregt und gezielt zu Fragmenten gespalten. Im dritten Quadrupol (Q3) werden dann die für die Substanz spezifischen Fragmente abgetrennt. Zur Detektion werden der Multiple-Reaction-Monitoring-Modus (MRM-Modus), der Precursor-Ionen-Scan- und der Produkt-Ionen-Scan-Modus eingesetzt. Beim MRM-Modus wird Q1 auf eine bestimmte Elternmasse fixiert, und im Q3 nur einzelne diagnostische Fragmentationen registriert. Beim Precursor-Ionen-Scan-Modus wird im Q1 ein gesamter Massenbereich registriert, während Q3 auf eine konstante Masse eingestellt ist. Dies ermöglicht die Identifizierung identischer Strukturen oder Fragmente von verschiedenen Ausgangsmassen. Bei Anwendung des Produkt-Ionen-Scan-Modus wird Q1 auf eine bestimmte Elternmasse fixiert und im Q3 wird ein gewählter Massenbereich, der den Bereich aller Fragmentationen abdeckt, gemessen. Das auf diese Weise aufgezeichnete Fragmentierungsmuster ist charakteristisch für die jeweilige Substanz.

### 2.5.2 *Anatoxine*

ANAs können sowohl mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC) als auch gaschromatographisch getrennt werden, wobei die Detektion nach GC-Trennung mit einem Elektroneneinfang-Detektor (electron capture detector, ECD) [164] oder dem Massenspektrometer [165] erfolgen kann.

Harada führte 1989 eine Methode zur Bestimmung von ANA durch UV-Detektion nach HPLC-Trennung ein [166]. Die Möglichkeit der Messung der UV-Absorption bei 227 nm ist durch die ungesättigte Ketonstruktur bedingt, so dass ANAs-Abbauprodukte keine UV-Aktivität aufweisen. Eine sensitive fluorimetrische Methode auf Basis einer Derivatisierung mit 4-Fluor-7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol (NBD-F) wurde für die simultane Bestimmung von ANA, HANA und ihren Abbauprodukten entwickelt [167]. Außerdem wurde eine Reihe massenspektrometrischer Verfahren publiziert [11, 168-170], mit denen der Fragmentierungsmechanismus der ANAs durch LC-MS/MS-Experimente aufgeklärt werden konnte [117, 171].

Die Produkt-Ionen-Spektren von ANA und HANA weisen neben einem sehr starken Signal bei  $m/z$  91 überwiegend Fragmentationen auf, die sich in 14 Masseinheiten entsprechend ihrer Seitenkette unterscheiden. Die Bildung des Hauptfragments  $m/z$  91  $[C_7H_7]^+$  wurde als Abspaltung von Ammoniak, gefolgt von einer Abspaltung der Seitenkette beschrieben (Abb. 8). Das gleiche Fragment ist auch in den Massenspektren der Epoxy- und Dihydroderivate vertreten [117, 171]. Problematisch bei der massenspektrometrischen Bestimmung der ANAs ist, dass Phenylalanin, eine essentielle Aminosäure, die im Phytoplankton weit verbreitet ist, das gleiche  $[M+H]^+$  mit  $m/z$  166 und ein sehr ähnliches Fragmentierungsschema mit  $m/z$  91 als Tochterfragment aufweist [172], so dass falsch-positive Ergebnisse möglich sind und überprüft werden müssen.

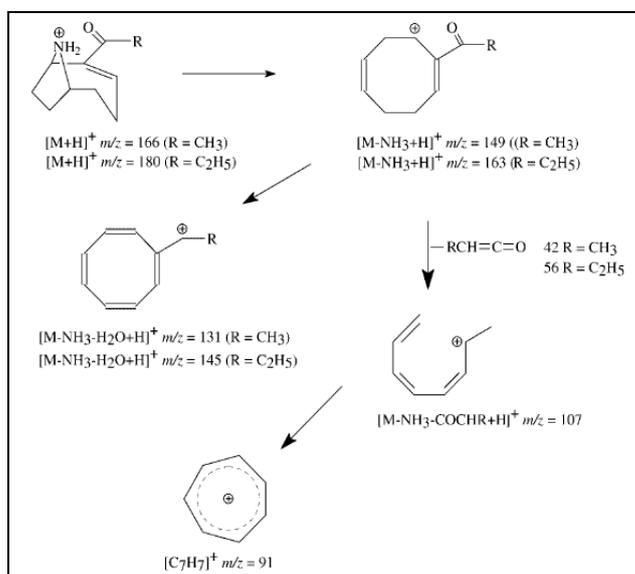


Abb. 8: LC-MS/MS-Fragmentierungsschema von Anatoxin-a und Homoanatoxin-a [171]

### 2.5.3 Anatoxin-a(s)

ANAS weist eine UV-Absorption im Bereich von 220 nm bis 230 nm auf [27, 28] jedoch wurden bisher keine massenspektrometrischen Daten und Fragmentierungsmuster für ANAS veröffentlicht.

### 2.5.4 Cylindrospermopsine

Die CYNs weisen eine UV-Absorption im Bereich zwischen 200 und 300 nm auf. Das Absorptionsmaximum bei 262 nm wurde von Ohtani 1992 zur Strukturaufklärung von CYN genutzt [40]. Darauf aufbauend wurden Analysemethoden mit UV-Detektion nach HPLC-Trennung unter Verwendung einer C18-Säule [32] sowie einer Amidphase [34] entwickelt. Die aufwendige Probenaufarbeitung konnte durch den Einsatz der LC-MS/MS-Kopplung mit Elektrosprayionisierung (ESI) vereinfacht werden [173]. Außerdem wurde der Fragmentierungsmechanismus aufgeklärt. Die Massenspektren der einfach protonierten CYN-Ionen von CYN und DoCYN sind sehr ähnlich. Eine Abspaltung der  $\text{SO}_3$ -Gruppe sowie von Wasser ergibt eine Massendifferenz von 16 zwischen beiden Substanzen, die auf die unterschiedlichen Substituenten am C7 zurückzuführen ist (Abb. 9). In beiden Produkt-Ionen-Spektren ist als Hauptfragment das Ion  $m/z$  194 vorhanden, das sich nach Abspaltung der Uracilgruppe an der C7-C8-Bindung und nach Abspaltung der  $\text{SO}_3$ -Gruppe bildet (Abb. 9) [174]. Dadurch ist die Bildung dieses Schlüsselfragments unabhängig vom Rest am C7-Atom, und deshalb kann CYN neben DoCYN und EpiCYN über das Ion  $m/z$  194 bestimmt werden. Hinsichtlich der MS/MS-Fragmentierung von EpiCYN wurden bisher keine Daten veröffentlicht.

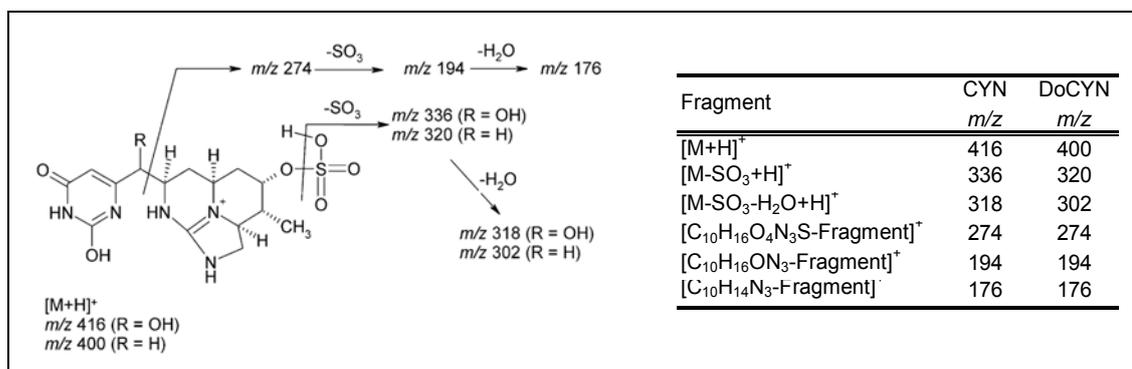


Abb. 9: Schematische Darstellung der protonierten Molekülionen von CYN und DoCYN nach Elektrosprayionisierung und deren Fragmentionen [174]

### 2.5.5 *Microcystine und Nodularine*

Da Blaualgenblüten ein weites Spektrum an Microcystinen aufweisen können, ist eine vollständige chromatographische Trennung und eine eindeutige Detektion für die Identifizierung der MC-Analoga notwendig. Weit verbreitet ist der Einsatz der HPLC mit Gradientenelution.

Die Effizienz der chromatographischen Trennung von Peptiden kann durch Zugabe von Perfluoralkylcarbonsäuren wie Trifluoressigsäure (trifluoroacetic acid, TFA) erhöht werden. TFA senkt den pH-Wert als Voraussetzung für eine vollständige Protonierung der Carboxylgruppen in den Peptiden und agiert zusätzlich als Ionenpaarreagenz. Eluenten, zusammengesetzt aus Acetonitril und Wasser mit TFA, sind zudem vollständig verdampfbar.

Das konjugierte Doppelbindungssystem im Adda-Rest absorbiert bei 238 nm und gilt als Hauptchromophor der MCs. Tryptophan (Trp) in MCs verschiebt das Absorptionsmaximum in Richtung 220 nm [175] und 6(Z)-Adda-Stereoisomere zu 242 nm [54].

Zur Kontrolle des Richtwertes von 1,0 µg MC-LR je Liter Trinkwasser (WHO), wurde 2003 die internationale Norm ISO 20179 in Kraft gesetzt. Diese Norm beschreibt die Bestimmung der MCs MC-LR, MC-RR und MC-YR in Rohwasser nach Probenaufreinigung und Konzentrierung der MCs durch Festphasenextraktion an C18-Kartuschen sowie Elution mittels eines Methanol-Wasser-Gemisches (9:1) mit 0,1 % TFA. Die aufkonzentrierten Toxine werden nach der Festphasenextraktion durch Einsatz einer HPLC-Apparatur mit einem UV- oder DA-Detektor erfasst. Eine Bestimmung weiterer MCs oder NODs kann erfolgen, jedoch wurde die Methode lediglich für MC-LR, MC-RR und MC-YR validiert.

Massenspektrometrische Fragmentierungsexperimente von MCs [176-179] zeigten, dass für die Ionisation des Moleküls die Anzahl der Arg-Reste im Peptid entscheidend ist. Die Guanidingruppe im Arg stellt die bevorzugte Protonierungsstelle dar, so dass bei MCs mit zwei Arg-Gruppen überwiegend doppelt geladene Ionen gebildet werden. In Microcystinen ohne Arg ist der Adda-Rest die dominante Protonierungsstelle, so dass diese MCs einfach ionisiert werden [177]. Daher weisen die Massenspektren von MCs mit Arg an

Position 2 und 4 doppelt geladene  $[M+2H]^{2+}$ -Ionen als Basispeak auf, während Microcystine mit nur einem Arg-Rest überwiegend  $[M+H]^+$ -Ionen neben schwächeren  $[M+2H]^{2+}$ -Signalen bilden. Microcystine ohne Arg bilden ausschließlich einfach geladene Ionen.

Innerhalb der MC-Tochterfragmente unterscheidet man die Ionen, die auf Abspaltungen von  $H_2O$ ,  $NH_3$ ,  $CH_3OH$  und dem Adda-Fragment [41, 177] zurückzuführen sind und Tochterionen, die Aminosäuresequenzen darstellen [177] (Tab. 2). Die sequenzabhängigen Fragmente können zur Identifizierung unbekannter Toxine oder zur Aufklärung von Desmethylstrukturen herangezogen werden, jedoch ist die Sequenzbestimmung durch die Ringstruktur der Peptide erschwert, da Spaltungen an jeder Peptidbindung möglich sind und die Aminosäuren-Fragmente weiter fragmentieren können. Das Adda-Fragment  $[C_9H_{10}O]^+$  mit  $m/z$  135, das charakteristische Tochterfragment, wird von allen MCs und NODs mit unverändertem Adda-Rest im Ring durch Spaltung an der Methoxy-Gruppe in der Adda-Seitenkette gebildet [81, 180, 181]. In Desmethyl-Adda (DMAdda)-MCs wird entsprechend der Spaltung der C8-C9-Bindung bei der Methoxy-Gruppe das Fragment  $m/z$  121  $[C_8H_8O]^+$  gebildet, jedoch ist für 9-Acetoxy-Derivate nicht das Fragment  $m/z$  163  $[C_{10}H_{10}O_2]^+$  sondern das Fragment  $m/z$  135 beschrieben worden [180] (Abb. 10).

Tab. 2: Ausgewählte MC- und NOD-Fragmente [41, 81, 104, 177]

Abspaltungsfragmente			Aminosäuresequenzfragmente			
Fragmente	$[M+H]^+$	$[M+2H]^{2+}$	methylierte MCs / NODs		desmethylierte MCs / NODs	
Adda-Fragment	135	135	Fragment	$m/z$	Fragment	$m/z$
Abspaltung von $H_2O$	$[M+H-H_2O]^+$		$[Glu-Mdha+H]^+$	213	$[Glu-Dha+H]^+$	199
Abspaltung von $NH_3$	$[M+H-NH_3]^+$	$[M+2H-135-NH_3]^{2+}$ $[M+2H-NH_3]^{2+}$	$[Glu-Mdha+H]^+$	227	$[Glu-Dha+H]^+$	213
Abspaltung von $CH_3OH$	$[M+H-CH_3OH]^+$	$[M+2H-CH_3OH]^{2+}$	$[Glu-Mdha-Ala+H]^+$	284	$[Glu-Dha-Ala+H]^+$	270
Abspaltung des Adda-Fragments	$[M+H-135]^+$ $[M+H-135-NH_3]^+$ $[M+H-135-H_2O]^+$	$[M+2H-135]^+$ $[M+2H-134]^{2+}$	$[Mdha-Ala+H]^+$	155	$[Dha-Ala+H]^+$	141
			$[MeAsp-Arg+H]^+$	286	$[Asp-Arg+H]^+$	272
			$[C_{11}H_{15}O-Glu-Mdha+H]^+$	375	$[C_{11}H_{15}O-Glu-Dha+H]^+$	361
			$[C_{11}H_{15}O-Glu-Mdha+H]^+$	389	$[C_{11}H_{15}O-Glu-Dha+H]^+$	375

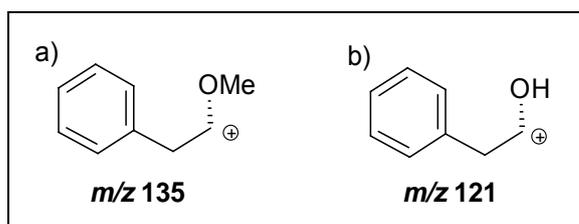


Abb. 10: Struktur des Adda-Fragments mit  $m/z$  135 (a) und des DMAdda-Fragments mit  $m/z$  121 (b), gebildet von Microcystinen und Nodularinen

Untersuchungen zur Fragmentierung der NODs ergaben entsprechende Tochterionen nach Abspaltung funktioneller Gruppen und Spaltung der Peptidbindungen, resultierend in Aminosäuresequenz-Ionen [81, 104]. Die Intensitäten der Fragmente sind sehr stark abhängig von der eingesetzten Kollisionsenergie (CE) [81]. Desmethylierte NODs können anhand weniger Fragmente identifiziert werden. [Asp<sup>2</sup>]-NOD bildet, wie auch NOD, die Fragmente  $m/z$  135, 227 und 389. Im Gegensatz dazu bildet [Dhb<sup>1</sup>]-NOD die Fragmente  $m/z$  213 und 375. Eine Desmethylierung der Adda-Gruppe in [DMAdda<sup>4</sup>]-NOD führt zur Bildung von  $m/z$  121 an Stelle  $m/z$  135 während eine Methylierung des Adda-Restes wie z. B. bei [MeAdda<sup>4</sup>]-NOD nur zur Bildung des üblichen Adda-Fragments mit  $m/z$  135, anstatt des methylierten Adda-Fragmentes mit  $m/z$  149 führt. Eine Methylierung im Glutamylrest in [MeGlu<sup>5</sup>]-NOD führt zur Bildung von  $m/z$  241 [MeGlu-Mdhb + H]<sup>+</sup> und  $m/z$  403 [C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>O-MeGlu-Mdhb + H]<sup>+</sup>.

#### 2.5.6 PSP-Toxine

PSP-Toxine weisen weder UV- noch Fluoreszenz-Aktivität auf, so dass diese Toxine derivatisiert werden müssen, um die Reaktionsprodukte mittels HPLC und Fluoreszenzdetektor analysieren zu können. 1975 wurde neben dem Maustest eine fluorimetrische Bestimmungsmethode für PSP-Toxine eingeführt [182]. Dabei wird STX mittels Wasserstoffperoxid zu 8-Amino-6-Hydroxymethyl-2-Aminopurin-3-Propionsäure oxidiert, die im sauren Milieu zu dem fluoreszierenden Pyrimidopurin weiterreagiert, das anschließend fluorimetrisch bestimmt werden kann. Die Tatsache, dass STX mehrere Oxidationsprodukte bildet, wirkt sich bei dieser Reaktion nachteilig aus [183]. Grundsätzlich kann diese Oxidation als Vorsäulen- oder Nachsäulenderivatisierung durchgeführt werden. Überwiegend wird die Nachsäulenderivatisierung beschrieben, die den Vorteil hat, dass die chromatographische Trennung bereits abgeschlossen ist und dadurch auch mehrere Oxidationsprodukte eines PSP-Toxins einen einzigen Peak im FLD-Chromatogramm ergeben. Entscheidend für die chromatographische Trennung der einzelnen PSP-Toxine war jedoch der Einsatz von Ionenpaarbildnern in der mobilen Phase, und hierzu nutzten Sullivan et al. erstmals die Alkylsulfonsäuren Hexan- und Heptansulfonsäuren für eine Trennung der Toxine aus [184]. Die Oxidation der chromatographisch

getrennten PSP-Strukturen wurde mit Periodsäure durchgeführt, jedoch erwies sich eine Ermittlung der PSP-Gesamttoxizität aufgrund einer Ko-Elution der unterschiedlich toxischen PSP-Toxine STX und dcSTX als schwierig. Deshalb modifizierten Thielert et al. den Eluenten mit Oktansulfonsäure, und mit einer 2-Stufen-Elution wurde die Trennung der Carbamoyl-, Decarbamoyl- und N-Sulfocarbamoyltoxine bei Ko-Elution von GTX1/4 erreicht [185]. Kürzlich gelang Diener et al. durch Einsatz von Heptan- neben Oktansulfonsäure im Eluenten die Ionenpaarchromatographische Trennung aller PSP-Toxine [186].

Die offizielle Analysenmethode für PSP-Toxine 2005.06 der Association of Official Analytical Chemists (AOAC) sieht eine Vorsäulenoxidation mit anschließender Fluoreszenzdetektion basierend auf Publikationen von Lawrence et al. [187] zur Kontrolle von Lebensmitteln hinsichtlich einer Kontamination mit PSP-Toxinen vor. Es findet eine parallele Oxidation mit Wasserstoffperoxid und Periodsäure statt, wobei im Gegensatz zu den N1-hydroxylierten PSP-Toxinen diejenigen, die nicht am N1 hydroxyliert sind, lediglich von Periodsäure derivatisiert werden können. Allerdings ist die HPLC-Trennung mit einer Reihe von Ko-Elutionen (GTX1/4, GTX2/3, C1/2 und C3/4) verbunden [188].

Um eine massenspektrometrische Bestimmung der PSP-Toxine zu ermöglichen, ist ein geeigneter Ionenpaarbildner zur Trennung erforderlich, denn Alkylsulfonsäuren sind schwer flüchtig, und die C-Toxine müssten aufgrund ihrer doppelt negativen Ladung in einem zusätzlichen chromatographischen Lauf analysiert werden [190]. Deshalb verwendeten Jaime et al. HPLC-Säulen auf der Basis von Ionenaustauschern [189], jedoch verursachten hohe Konzentrationen an Ammoniumazetat starkes Rauschen und eine verringerte Ionisierung. Eine Lösung dieser Probleme wurde durch Einsatz der Hydrophilen Interaktions-Flüssigkeitschromatographie (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC) mit einer mobilen Phase bestehend aus einem Wasser-Acetonitril-System mit geringen Konzentrationen an Ameisensäure/Formiat-Puffer erreicht [174]. Die MS/MS-Fragmentierungen der PSP-Toxine wurden von Sleno et al. und Dell'Aversano et al. untersucht [174, 190-192]. Die PSP-Toxine bilden bei Einsatz der ESI überwiegend



## 2.6 Extraktion der Toxine

Unabhängig von der Detektionsmethode müssen die cyanobakteriellen Toxine möglichst quantitativ aus dem Probenmaterial extrahiert werden. Für gefriergetrocknetes Material sind eine Reihe verschiedener Lösungsmittel zum Herauslösen der Toxine beschrieben. Am weitesten verbreitet sind dabei 5 %-ige Essigsäure, Methanol, TFA in Methanol, wässrige Methanol-Lösungen und Butanol/Methanol/Wasser (1:4:15) [193], wobei die Effizienz der Extraktionsmittel stark vom Probenmaterial und der Polarität der enthaltenen Toxine abhängt.

### 2.6.1 Anatoxine

Zur Extraktion der ANAs wurde eine Vielzahl an Extraktionsmitteln eingesetzt. Eine Freisetzung von ANA und HANA wurde durch rein wässrige, nur organische oder durch Gemische lipophiler und hydrophiler Lösungsmittel erreicht. Dabei gelangten 0,05 M Essigsäure [194], ein Methanol-Wasser-Gemisch (4:1) [18, 195], eine Methanol-Salzsäure-Lösung (99:1) [117], ein Acetonitril-Kaliumhydrogenphosphat-Salzsäure-Gemisch (1:9:1) [196] und 100 % Methanol zum Einsatz [168].

### 2.6.2 Anatoxin-a(s)

Die Extraktion von ANAs aus *Anabaena lemmermannii* wurde mit 0,5 M Essigsäure-Lösung [27], aus *Anabaena flos-aquae* mit einem 0,05 M Methanol-Ethanol-Gemisch [25] durchgeführt.

### 2.6.3 Cylindrospermopsine

Zur effizienten Extraktion von CYNs aus Phytoplankton wurden unterschiedlichste Extraktionsmittel von 100 % Wasser [197], über 5 % wässrige Essigsäure-Lösung [198], 0,9 %-ige Natriumchlorid-Lösung [40] und Methanol/Wasser (7:3) [34] bis zu 100 % Methanol [32] eingesetzt. Eine Untersuchung zur Extraktionsausbeute wurde von Welker et al. durchgeführt, wobei 100 % Methanol, eine 5 %-ige Essigsäure-Lösung, ein Methanol/5 %-ige Essigsäure-Gemisch (1:3) und 100 % Wasser getestet wurden. Die höchste Effizienz hatte dabei 100 % Wasser [199]. Törökne et al. verwendeten für ihre

Untersuchungen 100 % Wasser in ein und zwei Extraktionsschritten, 100 % Wasser mit 5 % Ameisensäure-Lösung in zwei Extraktionsschritten, 0,9 %-ige Natriumchlorid-Lösung und 100 % Methanol in drei Extraktionsschritten. Die höchste Ausbeute erreichten sie mit dem Ameisensäure-haltigen Extraktionsmittel [197].

#### **2.6.4 *Microcystine und Nodularine***

Zur Extraktion der hepatotoxischen Peptide aus lyophilisierter Algenbiomasse wurden sehr unterschiedliche Lösungsmittel eingesetzt. Für MCs wurden Essigsäure-Wasser-Gemische, Alkohol-Wasser-Systeme oder reine Alkohol-Lösungen eingesetzt: 5 %-ige Essigsäure-Lösung [176], Methanol-Wasser-Gemische (1:3 und 1:1) [51, 200] sowie 100 % Methanol [136]. NODs wurden mit Methanol-Wasser-Extraktionssystemen, wie Methanol-Wasser-Gemischen (90/10 und 70/30) [84, 105] oder Methanol/0,1 %-ige wässrige TFA (7:3) [85], herausgelöst. Zur gemeinsamen Extraktion der Hepatotoxine wurde eine Methanol-Wasser-Lösung (3:1) eingesetzt [179, 201]. Barco et al. [202] führten Extraktionsversuche zur Bestimmung von MCs und NOD mit einer Reihe unterschiedlicher Extraktionsmittel durch: 100 % Wasser; 100 % Methanol; ein Butanol-Methanol-Wasser-Gemisch (1:4:15); 5 %-ige Essigsäure-Lösung; 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung; 0,1 %-ige TFA in Methanol sowie Gemische aus Methanol/Wasser (10-90 %). Dabei wiesen Methanol/Wasser-Gemische eine höhere Effizienz als reines Wasser oder reines Methanol auf und zeigten im Vergleich zu den anderen Extraktionsmitteln die besten Ergebnisse. Es wurde festgestellt, dass die MC-Löslichkeit von der Protonierung der Carboxylgruppe abhängig ist. Für hydrophile MCs ist ein Wasseranteil von 60-70 %, für hydrophobe MCs von 80-90 % optimal, so dass die höchste Effizienz für alle MCs mit Methanol/Wasser (80/20) erzielt wurde.

#### **2.6.5 *PSP-Toxine***

Die AOAC-Methode 959.08 sieht eine Extraktion der PSP-Toxine mit 0,1 M Salzsäure und Erhitzen auf 100°C für 5 min vor [203]. Dieser Extrakt wird sowohl für den Maustest als auch für chromatographische Bestimmungen eingesetzt, obwohl er das natürliche Toxinprofil wegen der Umwandlung der N-Sulfocarbamoyltoxine in ihre entsprechenden Carbamoyltoxine nicht

widerspiegelt. Daher wurde 2005 in einer neuen AOAC-Methode 2005.06 eine Extraktion mit 1 %-iger Essigsäure und Erhitzen für 5 min bei 100 °C vorgeschlagen [188]. Die amtliche Untersuchungsmethode 12.03/04 zur Bestimmung von PSP-Toxinen in Muscheltieren und Muschelerzeugnissen mittels HPLC entsprechend dem § 64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) schreibt eine Extraktion mit 0,2 M Essigsäure ohne Erhitzen vor, um auch die N-Sulfocarbamoyl-Toxine bestimmen können. In der deutschen Norm DIN N 0196 zum Nachweis von PSP-Toxinen basierend auf der Methode nach Lawrence et al. [188], die sich an der AOAC-Methode 2005.06 orientiert, wird eine Vereinigung zweier Extrakte beschrieben. Die erste Extraktion wird mit 0,1 %-iger Essigsäure unter Erhitzen auf 100 °C für 5 min vorgenommen, die zweite Extraktion mit 1 %-iger Essigsäure ohne Erhitzen.

### 3 Zielstellungen der Arbeit

Die eindeutige Identifizierung und quantitative Bestimmung cyanobakterieller Toxine im Trink-, Brauch- und Badewasser sowie aus dem darin enthaltenen Phytoplankton ist hinsichtlich der Einhaltung von Grenz- und Richtwerten zum Schutz der Gesundheit des Menschen von großer Bedeutung. Insbesondere die globale Erwärmung, die das Auftreten massiver Algenblüten auch in den gemäßigten Breiten zur Folge hat, macht eine verstärkte Kontrolle des Vorkommens relevanter cyanobakterieller Toxine im Zusammenhang mit Algenblüten dringend erforderlich.

Vor diesem Hintergrund sollten ausgehend von der Norm ISO 20179 zur Bestimmung von Microcystinen in Wasser und unter Einbeziehung der von Oehrle et al. [204] sowie Dahlmann et al. [205] beschriebenen Methoden zur simultanen Bestimmung verschiedener Gruppen cyanobakterieller Toxine mit Hilfe der Kopplung LC-MS im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Ziele erreicht werden:

1. Überprüfung der Anwendbarkeit der Norm ISO 20179 zur eindeutigen Bestimmung der rechtlich relevanten Microcystine MC-LR, MC-RR, MC-YR neben anderen Microcystinen (insbesondere der desmethylierten Strukturvarianten) aus Proben von Phytoplankton und Wasserproben

Insbesondere sollten das jeweilige Microcystin-Profil und die MC-Gehalte von Wasserproben bestimmt nach der Norm ISO 20179, d.h. mit einer HPLC-UV-Methode, hinsichtlich falsch-positiver und falsch-negativer Werte mit den nach einem LC-MS-Verfahren erhaltenen Ergebnissen verglichen werden.

2. Optimierung einer LC-MS-Methode zur simultanen Bestimmung cyanobakterieller Toxine

Aufbauend auf den Methoden nach Oehrle et al. und Dahlmann et al. sollte eine LC-MS-Methode zur gemeinsamen Erfassung von PSP-Toxinen,

ANAs, CYNs, MCs und NODs aus Wasser und Phytoplankton optimiert sowie deren Vorteile und Grenzen aufgezeigt werden.

3. Optimierung der gemeinsamen Extraktion cyanobakterieller Toxine aus lyophilisiertem Phytoplankton

Im Hinblick auf die Entwicklung und den routinemäßigen Einsatz einer Multikomponenten-Analysen-Methode zur simultanen Erfassung cyanobakterieller Toxine ist eine effektive gemeinsame Extraktion der Toxine während der Probenaufarbeitung unbedingt erforderlich. Hierzu sollten Extraktionsversuche zur Ermittlung des Einflusses des Extraktionsmittels und hinsichtlich der optimalen Anzahl von Extraktionsschritten zur Erhöhung der Extraktionsausbeute durchgeführt werden.

4. Entwicklung und Anwendung einer LC-MS/MS-Methode zur simultanen Bestimmung cyanobakterieller Toxine nach nur einem chromatographischen Lauf

Eine Screening-Methode zur Detektion einer Vielzahl cyanobakterieller Toxine unter Berücksichtigung aller Toxingruppen war zu entwickeln. Hierbei sollte auf die Erfassung selten auftretender und noch nicht beschriebener Strukturvarianten fokussiert und die Anwendbarkeit der Methode auch auf komplexe Matrices, wie z. B. natürlich kontaminiertes Phytoplankton, nachgewiesen werden.

## 4 Experimenteller Teil

### 4.1 Quantifizierung von Microcystinen durch Einsatz der HPLC-Bedingungen der Norm ISO 20179

Die Norm ISO 20179 zur Überprüfung des WHO-Richtwertes von 1,0 Mikrogramm MC-LR je Liter Trinkwasser schreibt eine Detektion der MCs mit einem UV- oder DA-Detektor nach Probenaufreinigung und -konzentrierung über eine Festphasenextraktion sowie anschließender chromatographischer Trennung vor.

#### 4.1.1 Standardsubstanzen

Zur MC-Identifikation wurden die MC-Standards von MC-LR, MC-RR und MC-YR eingesetzt.

#### 4.1.2 Probenmaterial

Im September 2005 wurde aus dem Senftenberger See in Sachsen von Mitarbeitern der Fachhochschule Lausitz während einer massiver Algenblüte eine Wasserprobe entnommen und an die FSU Jena zur Toxinanalyse gesandt. Mikroskopisch konnte die Dominanz von *Microcystis aeruginosa* in der Biomasse nachgewiesen werden.

#### 4.1.3 Extraktion des Phytoplanktons

Die Wasserprobe konnte aufgrund der hohen Konzentration an Biomasse nicht filtriert und anschließend einer Festphasenextraktion gemäß ISO 20179 unterzogen werden, so dass sie gefriergetrocknet werden musste. Danach wurden  $50 \text{ mg} \pm 0,01 \text{ mg}$  des Lyophilisats mit 1 mL eines Methanol-Wasser-Gemisches (1:1) in mehreren Schritten in einem Eppendorf-Tube extrahiert. Um die zellgebundenen Toxine herauszulösen, erfolgte eine 15-minütige Behandlung im Ultraschallbad (Bandelin) und anschließend eine weitere 1-minütige Homogenisierung und Zerstörung der Zellen mittels eines Ultraschallstabes (Sonoplus GM 70, Bandelin). Nach Zentrifugation mittels Ultrazentrifuge Z233M (Hermle) bei 16000 g für 15 min wurde der Überstand

durch 0,2 µm-Nylon-Spritzenfilter (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in Autosampler-Vials filtriert und bis zur Analyse gekühlt.

#### 4.1.4 HPLC-UV-Bestimmung der Microcystine

##### 4.1.4.1 HPLC-System

Für die Bestimmung der Microcystine gemäß der Norm ISO 20179 wurde eine HPLC-Anlage der Firma Abimed Gilson, ausgestattet mit einem UV-Detektor SPD-7A der Firma Shimadzu, eingesetzt. Die UV-Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 238 nm.

##### 4.1.4.2 HPLC-Bedingungen

Die chromatographische Trennung der Microcystine wurde durch Einsatz der Trennsäule Aqua 5u C18 125A (250 mm x 4,6 mm) erreicht. Die mobile Phase setzte sich aus den Eluenten A (Wasser mit 0,05 % TFA) und B (Acetonitril mit 0,05 % TFA) zusammen. Die Gradientenbedingungen mit einem Fluss von 700 µL min<sup>-1</sup> sind in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Gradientenprogramm für HPLC-UV-Bestimmung von Microcystinen gemäß Norm ISO 20179

Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
	Wasser + 0,05 % TFA	Acetonitril + 0,05 % TFA
0	30	70
10	35	65
40	70	30
42	100	0
44	100	0
46	30	70
55	30	70

#### 4.1.5 LC-MS-Bestimmung der Microcystine

##### 4.1.5.1 LC-MS-System

Zur Absicherung der Ergebnisse nach UV-Detektion wurden massenspektrometrische Experimente an dem Massenspektrometer API 165 (AB Sciex), verbunden mit einer HPLC-Anlage der Firma Perkin Elmer, durchgeführt.

#### 4.1.5.2 HPLC-Bedingungen

Zur Trennung der Microcystine wurden zwei unterschiedliche Chromatographie-Systeme eingesetzt. Zum besseren Vergleich der Ergebnisse erfolgte zuerst die chromatographische Trennung der Toxine unter den Norm-Bedingungen, d. h. über eine HPLC-Trennung mit anschließender UV-Detektion (4.1.4.2). Später wurde ein modifiziertes LC-MS-Verfahren nach Hummert et al. [200] mit der Säule Luna 5u C18(2) (250 mm x 4,6 mm) und einer binären mobilen Phase mit Gradientenelution (Tab. 5) bei einem Fluss von  $300 \mu\text{L min}^{-1}$  angewendet. Hier enthielten beide Eluenten 53 mM Ameisensäure und 5 mM Ammoniumformiat, wobei Eluent A aus 90 % Wasser und 10 % Acetonitril, Eluent B aus 10 % Wasser und 90 % Acetonitril bestand.

Tab. 5: Gradientenprogramm für die LC-MS-Bestimmung von Microcystinen modifiziert nach Hummert et al. [200]

Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
	90 % Wasser / 10 % Acetonitril + 53 mM Ameisensäure + 5 mM Ammoniumformiat	10 % Wasser / 90 % Acetonitril + 53 mM Ameisensäure + 5 mM Ammoniumformiat
0	80	20
5	70	30
8	80	20
25	80	20

#### 4.1.5.3 MS-Bedingungen

Die massenspektrometrische Detektion erfolgte nach positiver Ionisierung im SIM-Modus und zusätzlich im Scan-Modus in den Bereichen 500-600 amu und 900-1100 amu. Die MS-Bedingungen sind in Tab. 6 gegeben.

Tab. 6: MS-Parameter für MC-Bestimmung nach ISO 20179 und einer Methode modifiziert nach Hummert et al. [200]

MS-Parameter	nach ISO 20179		nach Hummert et al.	
NEB ( $\text{L h}^{-1}$ )	8		10	
CUR ( $\text{L h}^{-1}$ )	11		9	
IS (V)	3500		3500	
Temp ( $^{\circ}\text{C}$ )	250		300	
DP (V)	20		20	
FP (V)	125		150	
EP (V)	10		6	
SIM Massen, Dwell time 150 ms	<i>m/z</i> (amu)	MC	<i>m/z</i> (amu)	MC
	519,5	$[\text{MC-RR} + 2\text{H}]^{2+}$	512,5	$[\text{dmMC-RR} + 2\text{H}]^{2+}$
	995,5	$[\text{MC-LR} + \text{H}]^{+}$	519,5	$[\text{MC-RR} + 2\text{H}]^{2+}$
	1045,5	$[\text{dmMC-YR} + \text{H}]^{+}$	967,5	$[\text{dmDMC-LR} + \text{H}]^{+}$
			981,5	$[\text{dmMC-LR} + \text{H}]^{+}$
			995,5	$[\text{MC-LR} + \text{H}]^{+}$
		1045,5	$[\text{dmMC-YR} + \text{H}]^{+}$	
Scan-Bereich, Scan time 500 ms	500 - 600 amu		500 - 600 amu	
	900 - 1100 amu		900 - 1100 amu	

#### 4.1.6 Ergebnisse

##### 4.1.6.1 Ergebnisse der HPLC-UV-Bestimmung

Zur Quantifizierung wurde eine Dreipunktkalibration von MC-RR, MC-YR und MC-LR durchgeführt. Die Nachweisgrenze (limit of detection, LOD) und die Bestimmungsgrenze (limit of quantification, LOQ) lagen bei 2 ng und 3 ng pro Injektion. Die HPLC-UV-Chromatogramme eines Mischstandards mit den drei MCs und von der Senftenberger See-Wasserprobe sind in Abb. 11 a) und b) dargestellt. Die errechneten MC-Gehalte ergaben 1408 ng MC-RR, 56 ng MC-YR und 1290 ng MC-LR je mg Lyophilisat.

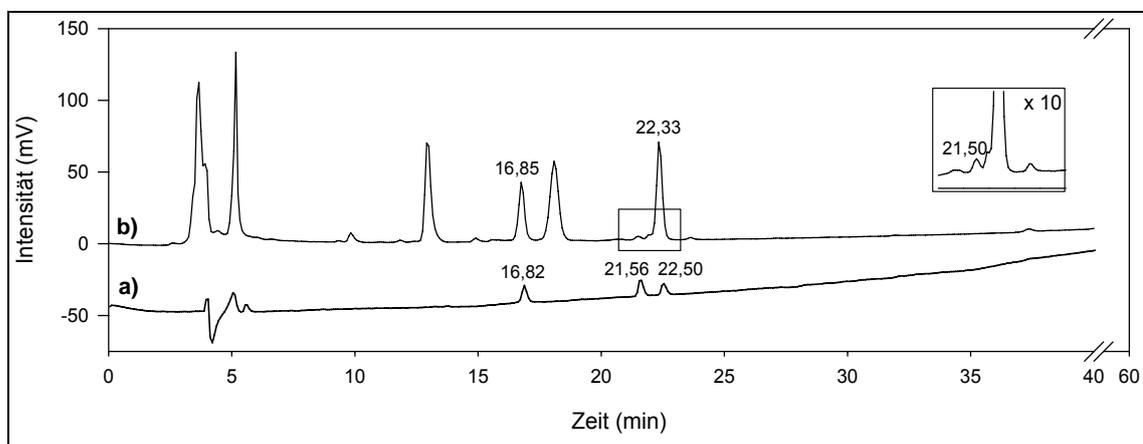


Abb. 11: a) HPLC-UV-Chromatogramm eines Mischstandards (15 ng) mit MC-RR ( $t_R$  16,82 min), MC-YR ( $t_R$  21,56 min), MC-LR ( $t_R$  22,50 min); b) HPLC-UV-Chromatogramm einer Wasserprobe des Senftenberger Sees mit MC-RR bei  $t_R$  16,85 min, MC-YR bei  $t_R$  21,50 und MC-LR bei  $t_R$  22,33 min (nach ISO 20179)

##### 4.1.6.2 Ergebnisse der LC-MS-Bestimmung

Die MC-Konzentrationen der Wasserprobe wurden unter den chromatographischen Trennbedingungen der ISO-Norm 20179 jedoch mit anschließender MS-Detektion im SIM-Modus anhand einer Dreipunktkalibration von MC-LR, MC-RR und MC-YR ermittelt. Ein TIC der Wasserprobe ist in Abb. 12 dargestellt, mit den MCs MC-YR bei 19,57 min, MC-LR bei 20,45 min und einer Spur MC-RR bei 14,79 min. Es ergaben sich MC-Gehalte von 9 ng MC-RR, 13 ng MC-YR und 220 ng MC-LR je mg Lyophilisat. Da die mit beiden Detektionsmethoden ermittelten MC-Gehalte schlecht korrelierten, wurde die Wasserprobe anschließend im Scan-Modus im Bereich  $m/z$  500-600 amu und

$m/z$  900-1100 amu erneut analysiert (Abb. 13). Im TIC des Massenscans wurden drei Peaks bei den Retentionszeiten  $t_R$  13,55 min,  $t_R$  15,42 min und  $t_R$  21,77 min detektiert. Deren Scans wurden von den Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen  $m/z$  967,7; 998,6; 981,7 und 995,7 dominiert, die einer zweifach desmethylierten MC-LR-Variante ( $[M + H]^+$ ,  $m/z$  967,5);  $[Asp^3]$ -MC-MeGluMeGlu ( $[M + H]^+$ ,  $m/z$  998,5); einer einfach desmethylierten MC-LR-Variante ( $[M + H]^+$ ,  $m/z$  981,5) und MC-LR ( $[M + H]^+$ ,  $m/z$  995,5) zugeordnet werden konnten.

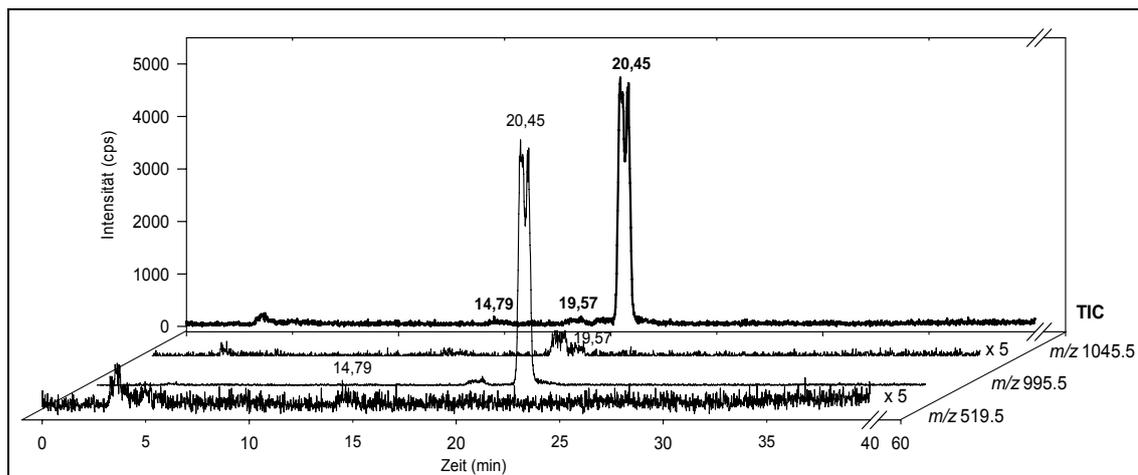


Abb. 12: SIM-Chromatogramm einer Wasserprobe des Senftenberger Sees mit MC-RR bei  $t_R$  14,79 min, MC-YR bei  $t_R$  19,57 min und MC-LR bei  $t_R$  20,45 min (Chromatographie entsprechend ISO 20179)

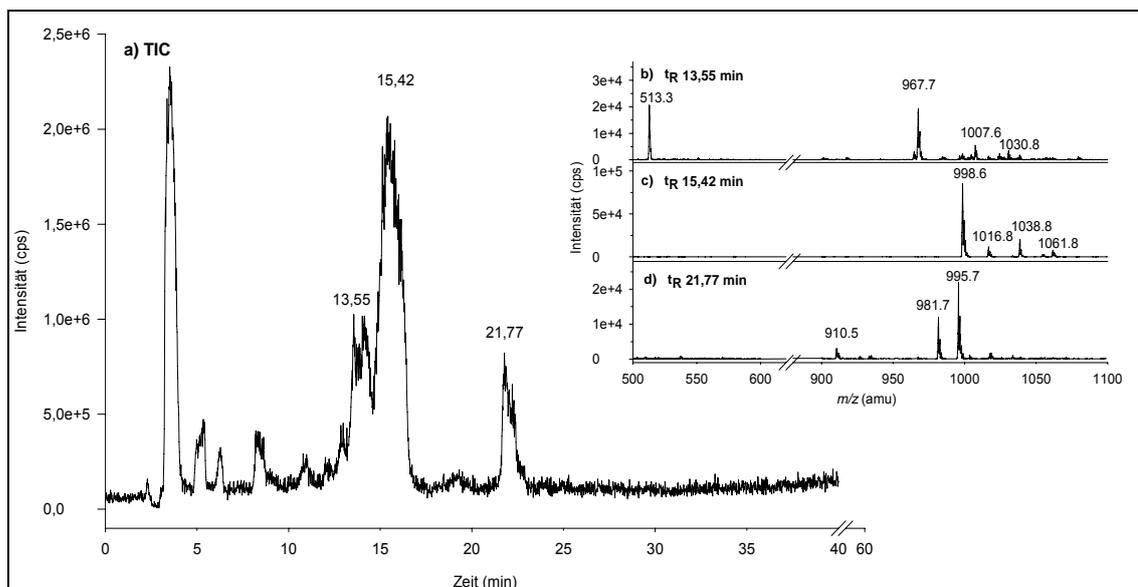


Abb. 13: a) TIC einer Wasserprobe des Senftenberger Sees im Scan-Modus ( $m/z$  500-600 amu und 900-1100 amu), b) MS-Scans ( $m/z$  500-600 amu und 900-1100 amu) bei b)  $t_R$  13,55 min, c)  $t_R$  15,42 min und d)  $t_R$  21,77 min (Chromatographie entsprechend ISO 20179)

Daraufhin wurden weitere MS-Experimente unter Anwendung einer Methode nach Hummert et al. [200] durchgeführt, wobei die Anzahl der SIM-Massen um die Desmethylvarianten von MC-LR, MC-RR und MC-YR erweitert wurde (Abb. 14). Dabei dominierten im TIC (SIM-Modus) eine einfach desmethylierte MC-RR-Variante ( $t_R$  5,57 min), eine doppelt desmethylierte MC-LR-Variante ( $t_R$  10,15 min), MC-LR ( $t_R$  11,83 min) und eine dmMC-LR-Variante ( $t_R$  12,14 min). In den Scan-Chromatogrammen (Abb. 15, 16) erschienen insgesamt vier Peaks bei den Retentionszeiten  $t_R$  7,20 min,  $t_R$  11,58 min,  $t_R$  12,57 min und  $t_R$  14,48 min, die anhand ihrer im Scan vorkommenden Massen dmMC-RR ( $t_R$  7,20 min,  $[M+2H]^{2+}$ ,  $m/z$  513,0), dmdmMC-LR ( $t_R$  11,58 min,  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  967,5), dmMC-MeGluMeGlu ( $t_R$  12,57 min,  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  998,5) und MC-LR ( $t_R$  14,48 min,  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  995,7) zugeordnet werden konnten.

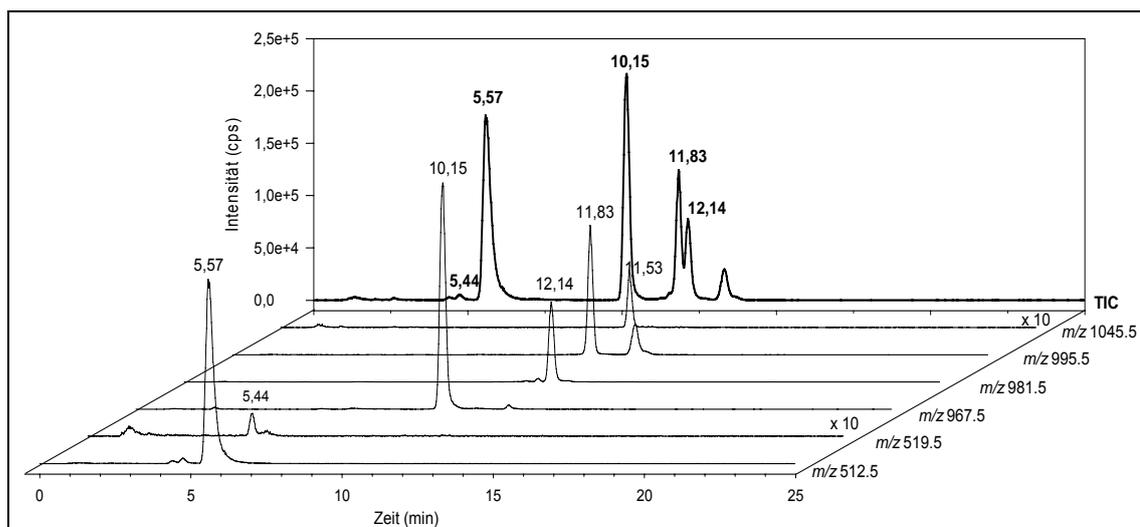


Abb. 14: SIM-Chromatogramm einer Wasserprobe des Senftenberger Sees mit dmMC-RR bei  $t_R$  5,57 min, MC-RR bei  $t_R$  5,44 min, dmdmMC-LR bei  $t_R$  10,15 min, dmMC-LR bei  $t_R$  12,14 min, MC-LR bei  $t_R$  11,83 min und MC-YR bei  $t_R$  11,53 min (modifiziert nach Hummert et al. [200])

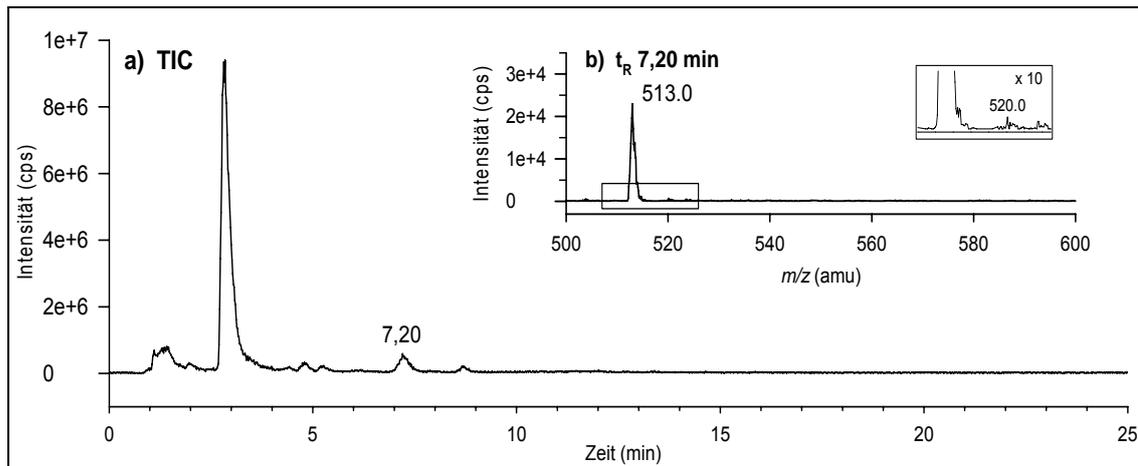


Abb. 15: a) TIC einer Wasserprobe des Senftenberger Sees im Scan-Modus ( $m/z$  500-600 amu); b) MS-Scan bei  $t_R$  7,20 min (modifiziert nach Hummert et al. [200])

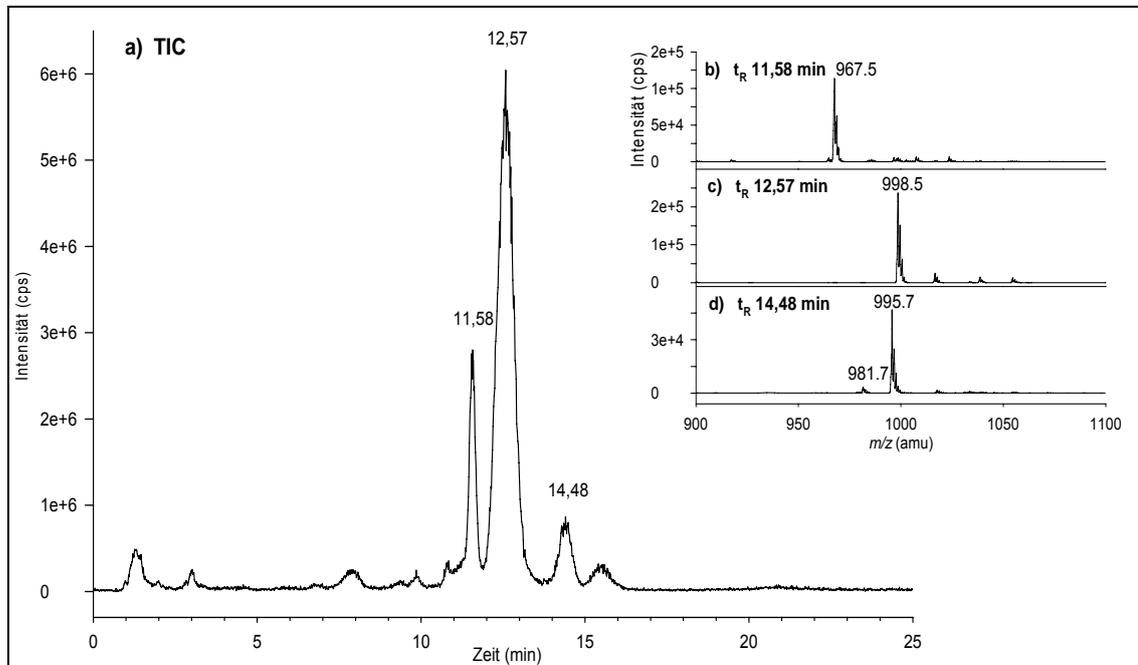


Abb. 16: a) TIC einer Wasserprobe des Senftenberger Sees im Scan-Modus ( $m/z$  900-1100 amu); MS - Scans bei b)  $t_R$  11,58 min, c)  $t_R$  12,57 min und d)  $t_R$  14,48 min (modifiziert nach Hummert et al. [200])

#### **4.1.7 Diskussion der Ergebnisse**

In den HPLC-UV-Chromatogrammen der Proben aus dem Senftenberger See wurden neben den Peaks von MC-LR, MC-RR und MC-YR, die anhand der Retentionszeiten eines Mischstandards zugeordnet werden konnten, weitere Peaks erhalten.

Allerdings konnten unabhängig davon die mit der UV-Detektion ermittelten Gehalte für die identifizierten MCs nicht durch LC-MS-Messungen im SIM-Modus bestätigt werden. Außerdem waren bei diesen Proben im Totalionenscan im Bereich  $m/z$  500-600 amu und 900-1100 amu, in dem die Molekülmassen der zu quantifizierenden MCs erscheinen, andere Toxine, überwiegend desmethylierte Strukturvarianten dieser MCs, dominant.

Da sich die mobile Phase entsprechend der Norm ISO 20179 als ungünstig für eine nachfolgende MS-Detektion erwies, wurde mit einer besser geeigneten LC-MS-Methode [200] erneut analysiert. Die danach erhaltenen TIC-Chromatogramme zeichneten sich durch eine ruhigere Basislinie sowie besser getrennte und aufgelöste Peaks aus, wobei die Ergebnisse der ersten MS-Messungen bestätigt werden konnten.

Damit wurde gleichzeitig die Vermutung, dass es unter den Bedingungen der ISO-Norm zur Ko-Elution von MC-RR und dessen Desmethylvariante, sowie von MC-LR und dessen Desmethylvariante kommt, bestätigt.

Da sich die Toxizitäten der methylierten und desmethylierten MC-Varianten unterscheiden, kann es im Fall der MC-LR-Strukturen durch einen höheren  $LD_{50}$ -Wert (i. p., Maus) der dmMC-LR-Varianten gegenüber MC-LR zu falsch-positiven Ergebnissen, innerhalb der MC-RR-Toxine durch einen geringeren  $LD_{50}$ -Wert der dmMC-RR-Varianten zu falsch-negativen Ergebnissen kommen. Deshalb ist die Norm ISO 20179 zur Kontrolle des Richtwerts der WHO hinsichtlich der Belastung von Trinkwasser mit Microcystinen nicht uneingeschränkt einsetzbar. Positive Ergebnisse in Bezug auf MCs nach UV-Detektion sollten deshalb unbedingt mit Hilfe der Massenspektrometrie überprüft und ein ausschließliches Vorkommen von rechtlich relevanten MCs auf diese Weise abgesichert werden.

## **4.2 Optimierung einer LC-MS/MS basierten Methode zur Erfassung cyanobakterieller Toxine im SIM-Modus**

Es sollte eine Multikomponenten-Methode zur gemeinsamen Erfassung von cyanobakteriellen Toxinen, und zwar von den PSP-Toxinen, Anatoxinen, Cylindrospermopsinen, Microcystinen und Nodularinen basierend auf dem Einsatz einer LC-MS-Kopplung entwickelt werden.

### **4.2.1 Standardsubstanzen**

Zur Methodenentwicklung wurden die Standardsubstanzen STX, NEO, dcSTX, GTX2/3, ANA, CYN, NOD, MC-LA, MC-LF, MC-LR, MC-LW, MC-RR und MC-YR eingesetzt.

### **4.2.2 LC-MS-Bestimmung der cyanobakteriellen Toxine**

#### 4.2.2.1 LC-MS-System

Die massenspektrometrischen Experimente wurden mit einem LC-MS-System (API 165, AB Sciex gekoppelt mit einer Perkin-Elmer-HPLC-Anlage) durchgeführt.

#### 4.2.2.2 HPLC-Bedingungen

Zunächst wurden die chromatographischen Bedingungen nach Oehrle et al. [204] und Dahlmann et al. [205] überprüft und danach im Hinblick auf die o. a. Zielstellung modifiziert. Insgesamt kamen hierbei drei unterschiedliche Chromatographiesysteme zum Einsatz (Tab. 7), die bzgl. der stationären Phasen, der Säulendimensionen und der Zusammensetzung der mobilen Phasen differierten. Bei Methode 1 wurde die von Oehrle et al. verwendete Säule YMC Pro C18 (150 mm x 2,1 mm), Waters (Milford, Massachusetts), durch eine Luna 5u C18 (250 mm x 3,0 mm) ersetzt. Die mobile Phase (Acetonitril/Wasser/1 %-ige Ameisensäure) und das Gradientenprogramm wurden jedoch beibehalten. Bei Methode 2 kamen die Bedingungen von Dahlmann et al. mit HFBA als Ionenpaarreagenz zum Einsatz, jedoch wurde TFA gegen Ameisensäure ausgetauscht. Bei Methode 3 wurden der Ameisensäure- und HFBA-Anteil auf 0,25 % und 0,025 % im Eluenten B erhöht.

Tab. 7: Chromatographische Bedingungen für Methode 1, 2 und 3 zur Trennung von PSP-Toxinen, ANA, CYN, MCs und NOD

	Methode 1				Methode 2				Methode 3		
Säule:	Luna 5u C18 (250 mm x 3,0 mm), Phenomenex (Torrance, USA)				Aqua 5u C18 (250 mm x 4,6 mm), Phenomenex (Torrance, USA)				Aqua 5u C18 (250 mm x 4,6 mm), Phenomenex (Torrance, USA)		
Eluenten:	A: Acetonitril B: Wasser C: 1 % Ameisensäure				A: Acetonitril B: Wasser C: 1 % Ameisensäure + 0,01 % HFBA				A: Acetonitril B: 0,25 % Ameisensäure + 0,025 % HFBA		
Gradient:	Zeit (min)	A (%)	B (%)	C (%)	Zeit (min)	A (%)	B (%)	C (%)	Zeit (min)	A (%)	B (%)
	0	2	88	10	0	5	75	20	0	5	95
	4	2	88	10	10	25	55	20	10	25	75
	5	25	65	10	15	40	40	20	15	40	60
	29	85	5	10	20	60	20	20	20	60	40
	34	85	5	10	25	60	20	20	25	60	40
	40	2	88	10	30	5	75	20	30	5	95
55	2	88	10	40	5	75	20	40	5	95	
Fluss:	400 $\mu\text{L min}^{-1}$ ; ohne Split				700 $\mu\text{L min}^{-1}$ ; mit Split				700 $\mu\text{L min}^{-1}$ ; mit Split		

#### 4.2.2.3 MS-Bedingungen

Die massenspektrometrische Detektion erfolgte nach positiver Ionisierung im SIM-Modus. Die MS-Bedingungen sind in Tab. 8 enthalten. Bei Methode 1 wurden die MS-Parameter optimal für jede Substanz innerhalb von Zeitperioden eingesetzt. Bei den Methoden 2 und 3 wurden die Quellenparameter auf folgende Werte eingestellt: NEB 10 L h<sup>-1</sup>, CUR 8 L h<sup>-1</sup>, IS 4000 V und Temp 350 °C. Die Substanzparameter wurden analog zu Methode 1 für jede Substanz individuell festgelegt (Tab. 8).

Tab. 8: MS-Parameter zur Detektion von PSP-Toxinen, ANA, CYN, MCs und NOD in Methode 1 (modifiziert nach Oehrle et al. [204])

Toxin	MS-Parameter							
	m/z (amu)	NEB (L h <sup>-1</sup> )	CUR (L h <sup>-1</sup> )	IS (V)	Temp (°C)	DP (V)	FP (V)	EP (V)
[ANA +H] <sup>+</sup>	166,0	12	10	4500	400	20	100	10
[CYN +H] <sup>+</sup>	416,0	10	8	3500	400	50	200	10
[MC-RR +2H] <sup>2+</sup>	519,5	12	10	3500	400	10	100	10
[NOD +H] <sup>+</sup>	825,5	12	10	3500	400	10	100	10
[MC-LA +H] <sup>+</sup>	910,5	12	9	3600	400	5	100	10
[MC-LF +H] <sup>+</sup>	986,5	10	10	3500	400	10	120	10
[MC-LR +H] <sup>+</sup>	995,5	12	10	3500	400	10	100	10
[MC-LW +H] <sup>+</sup>	1025,5	10	10	3500	400	10	120	10
[MC-YR +H] <sup>+</sup>	1045,5	12	10	3500	400	10	100	10
[STX +H] <sup>+</sup>	300,0	10	9	3500	400	75	200	10
[NEO +H] <sup>+</sup>	316,0	10	9	3500	400	75	200	10
[dcSTX +H] <sup>+</sup>	257,0	10	9	3500	400	75	200	10

### 4.2.3 Ergebnisse

Ein Mischstandard mit STX (2,8 ng), NEO (2,8 ng), dcSTX (1,6 ng), ANA (5 ng), CYN (5 ng), MC-RR (5 ng), NOD (5 ng), MC-YR (5 ng), MC-LR (5 ng), MC-LA (5 ng) und MC-LW (5 ng) wurde unter den chromatographischen Bedingungen der Methode 1 mit anschließender MS-Detektion im SIM-Modus unter Verwendung von Zeitperioden (1: 1-5 min; 2: 5-11 min; 3: 11-14 min; 4: 14-24 min; 5: 24-34 min, 6: 34-50 min) analysiert. Ein SIM-Chromatogramm mit den entsprechenden Peaks für STX ( $m/z$  300,0), NEO ( $m/z$  316,0), dcSTX ( $m/z$  257,0), ANA ( $m/z$  166,0), CYN ( $m/z$  416,0), MC-RR ( $m/z$  519,5), NOD ( $m/z$  825,5), MC-YR ( $m/z$  1045,5), MC-LR ( $m/z$  995,5), MC-LA ( $m/z$  910,5), MC-LW ( $m/z$  1025,5) und MC-LF ( $m/z$  986,5) ist in Abb. 17 dargestellt. Die Nachweisgrenze mit einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis (signal to noise, S/N) von 3 und die Bestimmungsgrenze mit S/N von 5 bewegen sich je nach Toxin zwischen 0,02 und 4,2 ng je Injektion (Tab. 10).

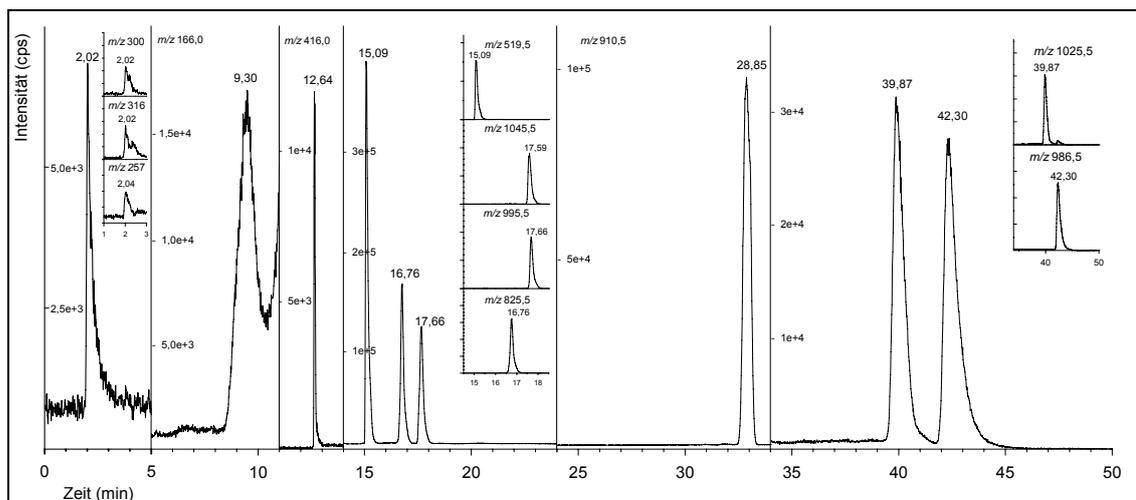


Abb. 17: SIM-Chromatogramm eines Mischstandards mit STX ( $t_R$  2,02 min), NEO ( $t_R$  2,02 min), dcSTX ( $t_R$  2,04 min), ANA ( $t_R$  9,30 min), CYN ( $t_R$  12,64 min), MC-RR ( $t_R$  15,09 min), NOD ( $t_R$  16,76 min), MC-YR ( $t_R$  17,59 min), MC-LR ( $t_R$  17,66 min), MC-LA ( $t_R$  28,85 min), MC-LW ( $t_R$  39,87 min), MC-LF ( $t_R$  42,30 min) unter den Bedingungen von Methode 1

Ein PSP-Toxinstandard mit GTX2/3 (12 ng/9 ng) und STX (2,8 ng) sowie ein Mischstandard mit ANA (5 ng), CYN (5 ng), MC-RR (5 ng), NOD (5 ng), MC-YR (5 ng), MC-LR (5 ng), MC-LA (5 ng) und MC-LW (5 ng) wurden unter den Bedingungen der Methode 2 mit HFBA als Ionenpaarreagenz im SIM-Modus analysiert. Ein LC-MS-Chromatogramm der einzelnen Massenspuren ist in Abb. 18 dargestellt. Im TIC sind Signale für

GTX2/3 ( $m/z$  396,0), STX ( $m/z$  300,0), ANA ( $m/z$  166,0), MC-RR ( $m/z$  519,5), NOD ( $m/z$  825,5), MC-LR ( $m/z$  995,5) und MC-LF ( $m/z$  986,5) erkennbar. Die Retentionszeiten der anderen Toxine CYN ( $m/z$  416,0), MC-LA ( $m/z$  910,5), MC-YR ( $m/z$  1045,5) und MC-LW ( $m/z$  1025,5) waren anhand der SIM-Spuren zu ermitteln und sind in Tab. 9 aufgeführt.

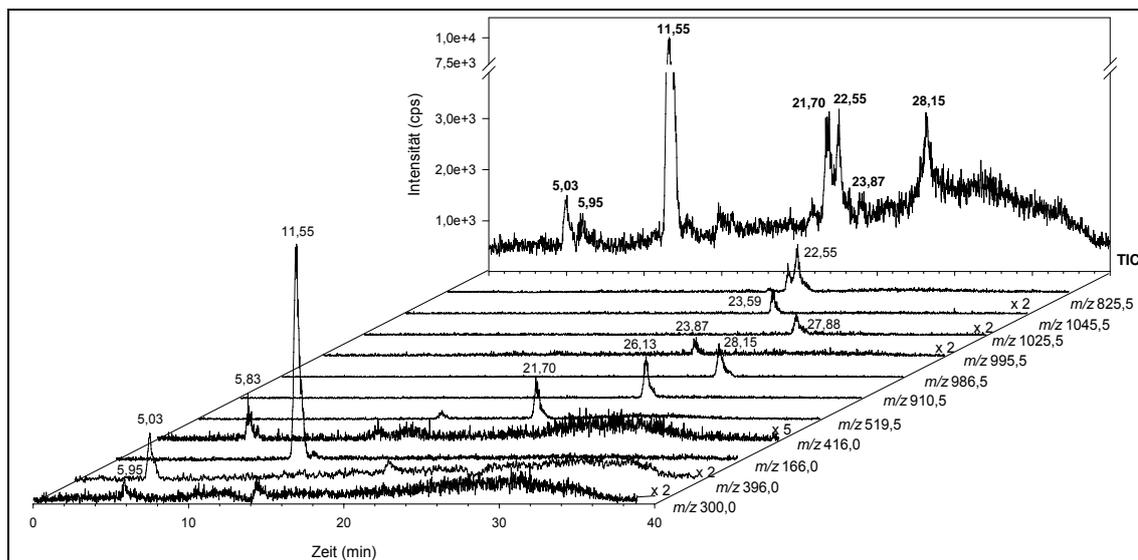


Abb. 18: SIM-Chromatogramm eines Mischstandards mit GTX2/3 ( $t_R$  5,03 min), STX ( $t_R$  5,95 min), CYN ( $t_R$  5,83 min), ANA ( $t_R$  11,55 min), MC-RR ( $t_R$  21,70 min), NOD ( $t_R$  22,55 min), MC-YR ( $t_R$  23,59 min), MC-LR ( $t_R$  23,87 min), MC-LA ( $t_R$  26,10 min), MC-LW ( $t_R$  27,88 min), MC-LF ( $t_R$  28,15 min) unter den Bedingungen von Methode 2

Ein PSP-Toxinstandard mit STX (2,8 ng) und NEO (2,8 ng) sowie ein Mischstandard mit ANA (5 ng), CYN (5 ng), MC-RR (5 ng), NOD (5 ng), MC-YR (5 ng), MC-LR (5 ng), MC-LA (5 ng) und MC-LW (5 ng) wurden unter den Bedingungen der Methode 3 mit stark erhöhtem HFBA-Anteil im SIM-Modus analysiert. Ein SIM-Chromatogramm des Standards ist in Abb. 18 dargestellt. Das TIC gibt Peaks für CYN ( $m/z$  416,0), ANA ( $m/z$  166,0), MC-RR ( $m/z$  519,5), NOD ( $m/z$  825,5), MC-YR ( $m/z$  1045,5), MC-LA ( $m/z$  910,5), MC-LF ( $m/z$  986,5) und eine Ko-Elution von STX ( $m/z$  300,0) und NEO ( $m/z$  316,0) wieder. Die anderen Toxine MC-LR und MC-LW können anhand ihrer Massenspuren identifiziert werden. Eine Übersicht über alle Retentionszeiten gibt Tab. 9. Die LODs und LOQs der Toxine sind in Tab. 10 aufgeführt.

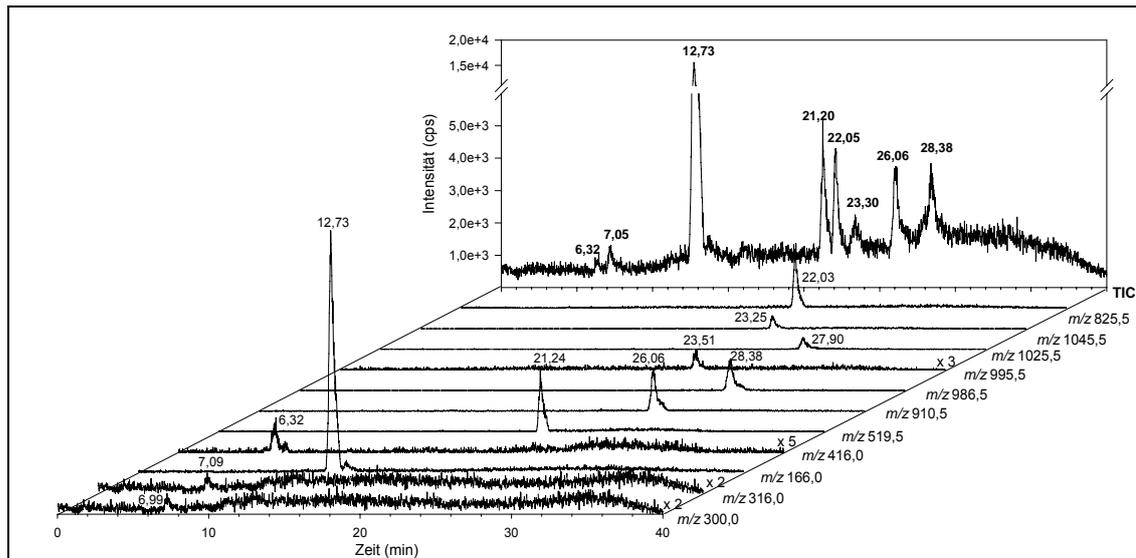


Abb. 19: SIM-Chromatogramm eines Mischstandards mit CYN ( $t_R$  6,32 min), STX ( $t_R$  6,99 min), NEO ( $t_R$  7,09 min), ANA ( $t_R$  12,73 min), MC-RR ( $t_R$  21,24 min), NOD ( $t_R$  22,03 min), MC-YR ( $t_R$  23,25 min), MC-LR ( $t_R$  23,51 min), MC-LA ( $t_R$  26,06 min), MC-LW ( $t_R$  27,90 min), MC-LF ( $t_R$  28,38 min) unter den Bedingungen von Methode 3

Tab. 9: Retentionszeiten  $t_R$  (min) der Toxine unter den drei getesteten Bedingungen

Toxin	Retentionszeit $t_R$ (min)		
	Methode 1	Methode 2	Methode 3
STX	2,02	5,95	6,99
NEO	2,02		7,09
dcSTX	2,04		
GTX2/3		5,03	
ANA	9,30	11,55	12,73
CYN	12,64	5,83	6,32
MC-RR	15,09	21,70	21,24
NOD	16,76	22,55	22,03
MC-YR	17,59	23,59	23,25
MC-LR	17,66	23,87	23,51
MC-LA	28,85	26,10	26,06
MC-LW	39,87	27,88	27,90
MC-LF	42,30	28,15	28,38

Tab. 10: Nachweisgrenze (LOD, S/N = 3, ng pro Injektion) und Bestimmungsgrenze (LOQ, S/N = 5, ng pro Injektion) der Toxine in Methode 1 und 3

Toxin	Methode 1		Methode 3	
	LOD (ng pro Injektion; S/N = 3)	LOQ (ng pro Injektion; S/N = 5)	LOD (ng pro Injektion; S/N = 3)	LOQ (ng pro Injektion; S/N = 3)
STX	1,5	2,5	2,8	4,7
NEO	2,5	4,2	2,8	4,7
GTX2/3	0,3 / 0,2	0,5 / 0,3		
ANA	1,5	2,5	0,5	0,8
CYN	0,2	0,3	4,5	7,5
MC-RR	0,02	0,03	1,8	3,0
NOD	0,6	1,0	1,5	2,5
MC-YR	0,3	0,4	4,0	6,7
MC-LR	0,1	0,2	10,0	15,0
MC-LA	0,6	1,0	2,0	3,4
MC-LW	0,3	0,5	1,5	2,5
MC-LF	0,4	0,7	1,0	1,7

#### 4.2.4 Diskussion der Ergebnisse

Unter den Bedingungen der Methode 1, d. h. nach Einsatz des von Oehrle et al. [204] beschriebenen Verfahrens, konnten weder Retention noch Trennung der PSP-Toxine STX, NEO und dcSTX erreicht werden (sie ko-eluierten bei  $t_R$  2,0 min), während alle anderen Toxine Retentionszeiten über 9 min aufwiesen. Ebenfalls als ungünstig erwies sich ein Fluss von  $400 \mu\text{L min}^{-1}$  bei einer 250 mm langen Säule, denn es resultierten sehr lange Retentionszeiten (z. B. für MC-LF über 40 min). Außerdem waren die Retentionszeiten bei wiederholten Injektionen instabil.

Um für alle Toxine eine gute Sensitivität zu erreichen, wurden während des analytischen Runs Zeitperioden für bestimmte Toxine eingerichtet, in denen unterschiedliche MS-Parameter angewendet wurden, jedoch stellen stabile Retentionszeiten die Grundvoraussetzung für das Arbeiten mit diesen Zeitfenstern dar, damit die entsprechende Substanz im Zeitfenster verbleibt. Allerdings kann bei der Analyse natürlich kontaminierter Proben nicht immer vorhergesagt werden, welche Substanzen enthalten sind (wodurch eine Planung von Zeitfenstern erschwert wird), so dass in solchen Fällen die Bildung von Zeitfenstern ungünstig ist.

Deshalb wurden bei Methode 2 (modifiziert nach Dahlmann et al. [205]) die Quellenparameter NEB, IS, und Temp für alle Toxine konstant gehalten, und nur die Substanzparameter DP, FP und EP für jedes Toxin optimal gestaltet (Tab. 8). Der Fluss betrug bei Methode 2  $700 \mu\text{L min}^{-1}$ , und als flüchtiges Ionenpaarreagenz wurde HFBA (0,002 %, v/v) eingesetzt.

Die von Dahlmann et al. im HPLC-Eluenten vorgeschlagene TFA wurde durch Ameisensäure (0,2 %, v/v) ersetzt, um die negativen Einflüsse von TFA auf die Ionisierung der Moleküle zu minimieren. Aufgrund des Zusatzes des flüchtigen Ionenpaarbildners HFBA konnte zwar eine Retention der PSP-Toxine GTX2/3 ( $t_R$  5,03 min) und STX ( $t_R$  5,95 min) erzielt werden, jedoch war die Trennung der PSP-Toxine unzureichend, obwohl bei Anwendung dieser Methode alle Toxine bereits nach 30 min eluiert waren.

Bei Methode 3 wurden die Anteile an Ameisensäure (0,1 % - 0,24 %) und HFBA (0,01 % - 0,024 %) deutlich erhöht, wodurch zwar eine stärkere Retention der PSP-Toxine (STX, NEO), aber keine Separation dieser Toxine erreicht wurde.

Außerdem führt der Zusatz von HFBA zum Eluenten bei MS-Verfahren zu einem Verlust an Sensitivität, wie aus den LODs und LOQs der Methode 3 im Vergleich zu Methode 1 (ohne Ionenpaarreagenz) hervorgeht (Tab. 10).

Es zeigte sich, dass ohne Ionenpaarreagenz (Methode 1) mit einer C18-Säule eine Trennung der PSP-Toxine nicht zu erreichen ist. Der Einsatz von HFBA (Methoden 2 und 3) hatte zwar eine stärkere Retention aber keine Trennung der PSP-Toxine zur Folge. Um PSP-Toxine dennoch mit Hilfe einer C18-Phase zu trennen, erwiesen sich Ionenpaarreagenzien wie Oktan- und / oder Heptansulfonsäure, die sich jedoch im Gegensatz zu HFBA nicht für MS-gängige Eluenten eignen, als unverzichtbar.

### 4.3 Optimierung der gemeinsamen Extraktion cyanobakterieller Toxine

Einen unverzichtbaren Bestandteil einer Multikomponenten-Analysenmethode stellt die gemeinsame Extraktion der Analyten dar. In der Literatur wurde für die unterschiedlichen Toxingruppen cyanobakteriellen Ursprungs eine Reihe von Extraktionsmitteln von rein wässrig über Wasser-Alkohol-Gemische bis hin zu 100% Alkohol beschrieben, wobei neuerdings die Extraktion mit einem Methanol-Essigsäure-Gemisch vor allem im Hinblick auf Routineuntersuchungen zur simultanen Bestimmung cyanobakterieller Toxine an Attraktivität gewinnt. Neben der Wahl des Extraktionsmittels wurde der Einfluss der Anzahl der Extraktionsschritte auf die Extraktionsausbeute untersucht.

#### 4.3.1 Probenmaterial

Um eine Vielzahl cyanobakterieller Toxine einer gemeinsamen Extraktion zu unterziehen, wurde lyophilisiertes Phytoplankton gemischt und gemörsert. Eingesetzt wurden die Blaualgenspezies *Aphanizomenon flos-aquae* mit den PSP-Toxinen STX, dcSTX, NEO und B1, *Aph. gracile* mit den PSP-Toxinen NEO und STX, *Microcystis aeruginosa* mit den MCs MC-LR, MC-RR, MC-YR und *Nodularia spumigena* mit NOD. Aufgrund von Materialmangel konnten keine ANAs- oder CYNs-haltigen Biomassen überprüft werden.

#### 4.3.2 Extraktion des Phytoplanktons

Drei Methanol-Essigsäure-Gemische unterschiedlicher Zusammensetzung: Methanol/0,1 M Essigsäure (1:3, 1:1, 3:1) wurden bei den Extraktionsversuchen eingesetzt. Es erfolgte eine Einwaage von 50 mg  $\pm$  0,01 mg der Biomasse in Eppendorf-Tubes. Die Proben wurden mit je 1 mL des Extraktionsmittels versetzt, 1 min geschüttelt und einer Ultraschallbehandlung (1 min) mit dem Ultraschallstab Sonoplus GM 70 (Bandelin) gefolgt von 15 min Behandlung im Ultraschallbad (Bandelin) unterzogen. Nach Zentrifugation mittels Ultrazentrifuge Z233M (Hermle) bei 16000 g für 15 min wurde der Überstand durch 0,2  $\mu$ m-Nylon-Spritzenfilter (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in

Autosampler-Vials filtriert und bis zur Analyse gekühlt. Um Aussagen über die Extraktionsausbeute bei den einzelnen Schritten zu treffen, wurde in einem zweiten Experiment der beschriebene Extraktionsprozess für den Extrakt mit der höchsten Toxinkonzentration zweimal wiederholt, und die Extrakte wurden dann einzeln vermessen. Alle Untersuchungen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

### **4.3.3 LC-MS- und HPLC-FLD-Bestimmung der PSP-Toxine, MCs und NOD**

#### 4.3.3.1 HPLC-System

##### A - Bestimmung der Microcystine und Nodularine im MRM-Modus

Die MC- und NOD-Bestimmungen erfolgten nach massenspektrometrischer Detektion mit einem API 365 der Firma Applied Biosystems, verbunden mit einer HPLC-Anlage der Firma Shimadzu.

##### B - Bestimmung der PSP-Toxine mit FLD

Die Bestimmung der PSP-Toxine wurde entsprechend der Methode von Diener et al. [186] mit einem HPLC-Verfahren mit Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion durchgeführt. Es kam eine JASCO-HPLC-Anlage (JASCO) mit einer CRX-Reaktionseinheit (Pickering Laboratories) zum Einsatz.

#### 4.3.3.2 HPLC-Bedingungen

##### A - Bestimmung der Microcystine und Nodularine im MRM-Modus

Die MC- und NOD-Bestimmung erfolgte nach einer modifizierten LC-MS-Methode nach Hummert et al. [200] unter Einhaltung der chromatographischen Bedingungen entsprechend Abschnitt 4.1.5.2.

##### B - Bestimmung der PSP-Toxine mit FLD

Die Trennung der PSP-Toxine erfolgte auf einer Luna-Säule C18 (2) 100 A (250 mm x 4,6 mm) unter Einsatz einer Gradientenelution mit einem binären Eluentengemisch und einem Fluss von  $1000 \mu\text{L min}^{-1}$ . Die pH-Werte der beiden Eluenten wurden mit Phosphorsäure auf pH 7,0 eingestellt. Die Zusammensetzung der Eluenten sowie das Gradientenprogramm sind in Tab. 11 gegeben.

Tab. 11: Gradientenprogramm für HPLC-FLD-Bestimmung von PSP-Toxinen nach Diener et al. [186]

Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
	6 mM Oktansulfonsäure + 6 mM Heptansulfonsäure + 0,75 % Tetrahydrofuran in Wasser (v/v)	7 mM Oktansulfonsäure + 7 mM Heptansulfonsäure + 48 mM Ammoniumphosphat + 1 % Tetrahydrofuran in 10 % Acetonitril / 90 % Wasser (v/v)
0	100	0
15	100	0
16	0	100
43	0	100
44	100	0
65	100	0

#### 4.3.3.3 Detektionsbedingungen

##### A - Bestimmung der Microcystine und Nodularine im MRM-Modus

Die massenspektrometrische Detektion der MCs und NODs erfolgte nach positiver Ionisierung im MRM-Modus. Die MS-Bedingungen sind in Tab. 12 gegeben.

Tab. 12: MS-Parameter zur Erfassung von ANAs, CYNs, MCs and NODs im MRM-Modus

MS-Parameter	ANAs	CYNs	MCs	NODs
NEB (L h <sup>-1</sup> )	10	10	10	10
CUR (L h <sup>-1</sup> )	15	15	15	15
IS (V)	5000	5000	5000	5000
Temp (°C)	400	400	400	400
CAD (L h <sup>-1</sup> )	5	5	5	5
DP (V)	30	80	20 (MC-RR) / 40	60
FP (V)	90	250	200 (MC-RR) / 100	150
EP (V)	5	10	9	9
CE (eV)	30	45	30 (MC-RR) / 35	80
MRM-Übergänge <i>m/z</i> (amu)	ANA 166 > 91 HANA 180 > 91	CYN 416 > 194 DoCYN 400 > 194	MC-RR 519,5 > 135 dmMC-RR 512,5 > 135 MC-LR 499,5 > 135 MC-YR 1045,5 > 135	NOD 825,5 > 135 dmNOD 811,5 > 135

##### B - Bestimmung der PSP-Toxine mit FLD

Die Fluoreszenzdetektion erfolgte nach Derivatisierung der PSP-Toxine mit einem Gemisch aus 10 mM Periodsäure und 550 mM Ammoniaklösung (300 µL min<sup>-1</sup>) bei 50 °C mit anschließender Zugabe von 0,75 M Salpetersäure-Lösung (400 µL min<sup>-1</sup>). Die Extinktionswellenlänge betrug 330 nm, die Emissionswellenlänge 395 nm.

### 4.3.4 Ergebnisse

#### 4.3.4.1 Wahl des Extraktionsmittels

Die Peakflächen für die einzelnen Toxine wurden aus Triplikaten ermittelt und zueinander in Relation gesetzt. Als Wert für das Extraktionsmittel Methanol/Essigsäure (1:3) wurde willkürlich 1,0 festgelegt, und die Effizienz der anderen Extraktionsmittel entsprechend ihrer Peakflächen berechnet. Die Ergebnisse sind in Abb. 20 und die Messwerte im Anhang in Tab. 19 dargestellt.

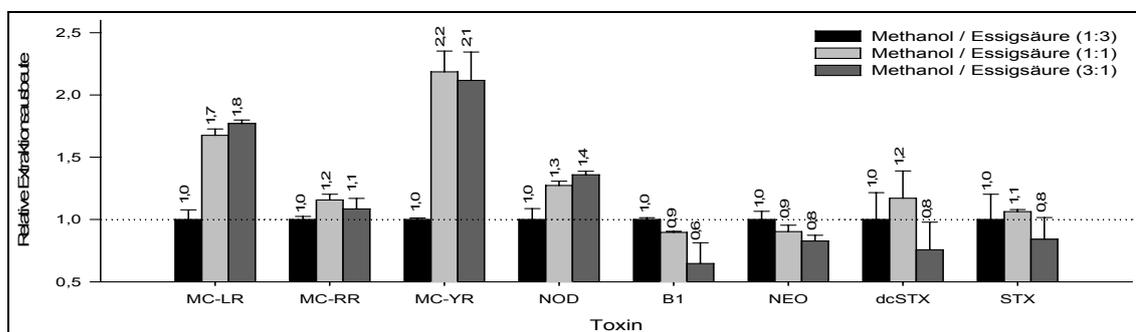


Abb. 20: Relative Extraktionsausbeute mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen einer Methanol/0,1 M Essigsäure-Lösung (1:3, 1:1, 3:1)

#### 4.3.4.2 Anzahl der Extraktionsschritte

Die Toxinextraktion mit Methanol/0,1 M Essigsäure (1:1) ergab die höchsten Extraktionsausbeuten, und dieses Gemisch wurde daher zum Austesten der Anzahl der Extraktionsschritte für eine optimale Ausbeute eingesetzt. Die Summe der Peakflächen der Toxingehalte aus den drei Extrakten wurde auf 100 % gesetzt und die Einzelgehälter dementsprechend relativiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 21 und die Messwerte im Anhang in Tab. 20 dargestellt.

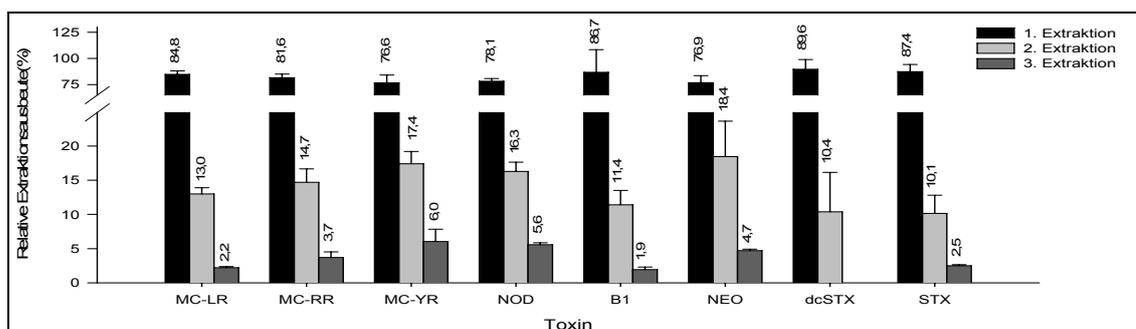


Abb. 21: Relative Extraktionsausbeute bei 1, 2 und 3 Extraktionsschritten mit Methanol/0,1 M Essigsäure (1:1) als Extraktionsmittel

#### **4.3.5 Diskussion der Ergebnisse**

Die Ergebnisse hinsichtlich der Auswahl des Extraktionsmittels zeigen, dass sich Methanol-Essigsäure-Mischungen mit Volumenverhältnissen von 1:1 und 3:1 zum Herauslösen der zyklischen Peptide MCs und NOD nur geringfügig unterscheiden. Allerdings ergab ein Methanolanteil von 25 % wesentlich geringere Extraktionsausbeuten.

Für PSP-Toxine konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden. Die höchsten Extraktionsausbeuten waren bei diesen Toxinen bei einem Mischungsverhältnis Methanol/Essigsäure (1:3 und 1:1) zu verzeichnen.

Bei 75 % Methanolanteil resultierten bei allen vier untersuchten Toxinen die geringsten Extraktionsausbeuten.

Mit einmaliger Extraktion konnten zwischen 77 % und 90 % der Toxine extrahiert werden. Nach einem zweiten Extraktionsschritt wurden 94 % - 100 % der Toxine aus der Matrix herausgelöst. Zwischen den verschiedenen Toxingruppen waren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Extrahierbarkeit mit einem für alle Toxine gleichen Extraktionsgemisch erkennbar.

#### **4.4 Entwicklung und Anwendung einer LC-MS/MS basierten Methode zur Erfassung cyanobakterieller Toxine im Precursor-Ionen-Scan-Modus**

Eine Multikomponentenmethode zur Erfassung cyanobakterieller Toxine muss die Detektion von über 100 bisher beschriebenen Toxinvarianten ermöglichen. Die meisten veröffentlichten Methoden basieren auf dem Einsatz einer LC-MS/MS-Kopplung, wobei wegen der hohen Selektivität und Sensitivität die Detektion im MRM-Modus erfolgt.

Allerdings setzt die Anwendung dieser Detektionsform Wissen über das jeweilige Cyanobakterium und somit über die von diesem evtl. produzierten Toxine voraus, da zur Detektion der Toxine nur bekannte Massenübergänge eingesetzt werden. Alle Veränderungen im Toxinmolekül, wie Substitutionen von Aminosäuren oder funktioneller Gruppen - die innerhalb der cyanobakteriellen Toxine sehr oft vorkommen und zu Strukturvarianten führen - können nicht erfasst werden, so dass im ungünstigsten Fall durchaus falsch-negative Ergebnisse zustande kommen können.

Hingegen werden beim Arbeiten im Precursor-Ionen-Scan-Modus spezifische Fragmente selektiert. Diese werden im Q3 herausgefiltert, nachdem im Q1 zusätzlich über einen  $m/z$ -Bereich, der die möglichen Molekülmassen  $[M+H]^+$  sowie  $[M+2H]^{2+}$  abdeckt, ein Scan gefahren wurde. Auf diese Weise wird die Detektion aller Strukturvarianten der verschiedenen Toxinklassen ermöglicht, d. h. es gelingt der Nachweis einer Reihe cyanobakterieller Toxine auch bei Phytoplanktonproben von nicht bekannter Zusammensetzung.

Da es ein Ziel der Arbeit war, eine Screening-Methode zu entwickeln, die sehr schnell die Erfassung aller toxischen Komponenten aus Biomassen, deren wesentlicher Bestandteil Cyanobakterien sind, ermöglicht, um dadurch zu gesicherten Daten im Hinblick auf eine toxikologische Bewertung zu gelangen, bot es sich an, dem Precursor-Ionen-Scan-Modus im Rahmen der LC-MS/MS-basierten Nachweismethode für cyanobakterielle Toxine besondere Aufmerksamkeit zu widmen.

#### **4.4.1 Standardsubstanzen**

Zur Methodenentwicklung und Quantifizierung wurden folgende Toxin-Standards eingesetzt: B1, dcSTX, GTX1-4, NEO, STX, MC-LA, MC-LF, MC-LR, MC-LW, MC-RR und MC-YR sowie ANA, NOD und CYN.

#### **4.4.2 Probenmaterial**

Für die Anwendung der Methodik mit toxinbelastetem Material wurden, um alle Toxingruppen und innerhalb dieser möglichst viele Vertreter detektieren zu können, gefriergetrocknete Biomassen der Spezies *Aphanizomenon gracile* (Isolat), *Aph. flos-aquae* (Isolat), *Aph. issatschenkoi* (Isolat), *Anabaena flos-aquae* (Isolat), *An. lemmermannii* (Isolat), *Oscillatoria sp.* (Algenblüte), *Lyngbya wollei* (Isolat), *Nodularia spumigena* (Algenblüte) and *Microcystis aeruginosa* (Algenblüte) eingesetzt.

#### **4.4.3 Extraktion des Phytoplanktons**

50 mg  $\pm$  0,01 mg der jeweiligen Biomasse wurden in Eppendorf-Tubes eingewogen, mit 1 mL des Extraktionsmittels Methanol / 0,1 M Essigsäure (1:1) versetzt, 1 min gevortext, 1 min mit dem Ultraschallstab (Bandelin), 15 min im Ultraschallbad (Bandelin) behandelt und 15 min bei 16000 g (Ultrazentrifuge Z233M, Hermle) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand filtriert (0,2  $\mu$ m-Nylon-Spritzenfilter, Roth).

#### **4.4.4 LC-MS/MS-Bedingungen für die Bestimmung der cyanobakteriellen Toxine**

##### 4.4.4.1 HPLC-System

##### A - Methodenentwicklung und Anwendung der Methode

##### B - Bestimmung der Response-Faktoren für die PSP-Toxin-Epimere im MRM-Modus

Die Methodenentwicklung und Bestimmung der cyanobakteriellen Toxine mit der neuen Methode sowie die PSP-Toxin-Analysen im MRM-Modus erfolgten an einer HPLC-Anlage, bestehend aus Komponenten der Serie 1100 (Agilent), gekoppelt an ein 4000 Q Trap-Massenspektrometer (Applied Biosystems).

### C - Bestimmung von Anatoxinen, Cylindrospermopsinen, Microcystinen und Nodularinen im MRM-Modus

Die Bestimmung der ANAs, CYNs, MCs und NODs im MRM-Modus erfolgte entsprechend Abschnitt 4.3.3.1.

### D - Bestimmung von PSP-Toxinen mit FLD

Die Quantifizierung der PSP-Toxine mit FLD wurde entsprechend Abschnitt 4.3.4.1 durchgeführt.

#### 4.4.4.2 HPLC-Bedingungen

##### A - Methodenentwicklung und Anwendung der Methode

Die Trennung der Toxine erfolgte mittels einer Luna-Säule (3u C18 (2) 100A). Es wurden zwei Eluenten mit 50 mM Ameisensäure und 2 mM Ammoniumformiat eingesetzt, wobei Eluent A aus 100 % Wasser, Eluent B aus Methanol/Wasser (95/5) bestand. Es erfolgte eine Gradientenelution mit einem Fluss von  $400 \mu\text{L min}^{-1}$ . Das Gradientenprofil wurde im Rahmen der Methodenentwicklung (4.4.5.1) erstellt.

##### B - Bestimmung der Responsefaktoren für die PSP-Toxin-Epimere im MRM-Modus

Die komplette Trennung der PSP-Toxine erfolgte mittels TSK gel Amide-80-Säule (25 mm x 2 mm x 5  $\mu\text{m}$ ) und einem isokratischem Eluentengemisch aus 35 % Eluent A: Wasser und 65 % Eluent B: Acetonitril/Wasser (95/5) mit jeweils 2 mM Ammoniumformiat und 3,6 mM Ameisensäure bei pH 3,5 mit einem Fluss von  $200 \mu\text{L min}^{-1}$  entsprechend der Methode von Dell'Aversano et al. [174].

##### C - Bestimmung von Anatoxinen, Cylindrospermopsinen, Microcystinen und Nodularinen im MRM-Modus

Die Bestimmung der ANAs, CYNs, MCs und NODs im MRM-Modus erfolgte unter modifizierten Bedingungen nach Hummert et al. [200] entsprechend Abschnitt 4.1.5.2.

##### D - Bestimmung von PSP-Toxinen mit FLD

Die fluorimetrische Quantifizierung der PSP-Toxine wurde entsprechend Diener et al. [186] unter den Bedingungen der Absätze 4.4.3.2 und 4.4.3.3 durchgeführt.

#### 4.4.4.3 MS/MS-Bedingungen

##### A - Methodenentwicklung und Anwendung der Methode

Während der Methodenentwicklung erfolgte die massenspektrometrische Detektion im MRM-, Precursor-Ionen-Scan- und Produkt-Ionen-Scan-Modus. Die MRM-Übergänge für die Toxine und die eingesetzten MS-Parameter sind in Tab. 13 dargestellt. Eine Optimierung der MS-Parameter für den Precursor-Ionen-Scan-Modus wird in Abschnitt 4.4.5.2 beschrieben.

Tab. 13: MS-Parameter und MRM-Übergänge der Toxine während der Optimierung der chromatographischen Trennung

MS-Parameter	PSP-Toxine		ANA / CYN		MCs		NOD	
CUR (L h <sup>-1</sup> )	25		25		25		25	
IS (V)	5000		5200		4900		5400	
Temp (°C)	600		600		600		600	
CAD-Level	High		High		High		High	
GS 1 (L h <sup>-1</sup> )	50		50		50		50	
GS 2 (L h <sup>-1</sup> )	70		70		70		70	
DP (V)	70		80		35		175	
EP (V)	10		10		10		10	
CE (eV)	40		50		20		80	
MRM-Übergänge m/z (amu)	dcSTX	257 > 239	ANA	166 > 91	MC-LR	499,5 > 135	NOD	825,5 > 135
	STX	300 > 282	CYN	416 > 194	MC-RR	519,5 > 135		
	NEO	316 > 298			MC-YR	524,5 > 135		
	GTX 5	380 > 300			MC-LA	910,5 > 135		
	GTX 2/3	396 > 298			MC-LF	986,5 > 135		
	GTX 2/3	396 > 316			MC-LW	1025,5 > 135		
	GTX 1/4	412 > 314						
	GTX 1/4	412 > 332						

##### B - Bestimmung der Response-Faktoren für die PSP-Toxin-Epimere im MRM-Modus

Die massenspektrometrischen Bedingungen zur Bestimmung der PSP-Toxin-Responsefaktoren wurden entsprechend Dell'Aversano et al. [174] gewählt.

##### C - Bestimmung von Anatoxinen, Cylindrospermopsinen, Microcystinen und Nodularinen im MRM-Modus

Die MRM-Messungen von ANAs, CYNs, MCs und NODs erfolgten unter den Bedingungen von Abschnitt 4.3.3.3.

#### 4.4.5 Methodenentwicklung

##### 4.4.5.1 Optimierung der chromatographischen Trennung

Das Ziel bei der Optimierung der chromatographischen Trennung war im Gegensatz zu den bisherigen Analysemethoden nicht die komplette Basislinien-Trennung der Einzeltoxine, sondern es sollten zunächst nur die jeweiligen Toxingruppen voneinander getrennt werden. Darauf aufbauend sollten während des chromatographischen Laufes Zeitfenster festgelegt werden, innerhalb derer optimale MS-Parameter für die jeweiligen Toxine einer Toxingruppe zu Anwendung gelangen konnten. Der gesamte Retentionsbereich der Einzelsubstanzen musste dabei abgedeckt werden, um das Risiko eines Informationsverlustes durch ein Herausfallen einer Toxinvariante aus einem Zeitfenster zu minimieren.

#### PSP-Toxine

Wie bereits in Abschnitt 4.2.3 gezeigt, kann mit den üblichen chromatographischen Bedingungen (eine C18-Säule als stationäre Phase und ein Eluentengemisch ohne Ionenpaarbildner als mobile Phase) weder eine Retention noch eine Trennung der PSP-Toxine erreicht werden. Daher ist für die Wahl des Eluenten eine erfolgreiche Trennung der PSP-Toxine untereinander im Vergleich zur erfolgreichen Abtrennung der PSP-Toxine von den anderen Toxingruppen relativ bedeutungslos. Ein MRM-Chromatogramm mit STX und NEO sowie das angewandte Gradientenprofil als prozentualer Anteil des Eluenten A über den Bereich 0-10 min sind in Abb. 22 dargestellt.

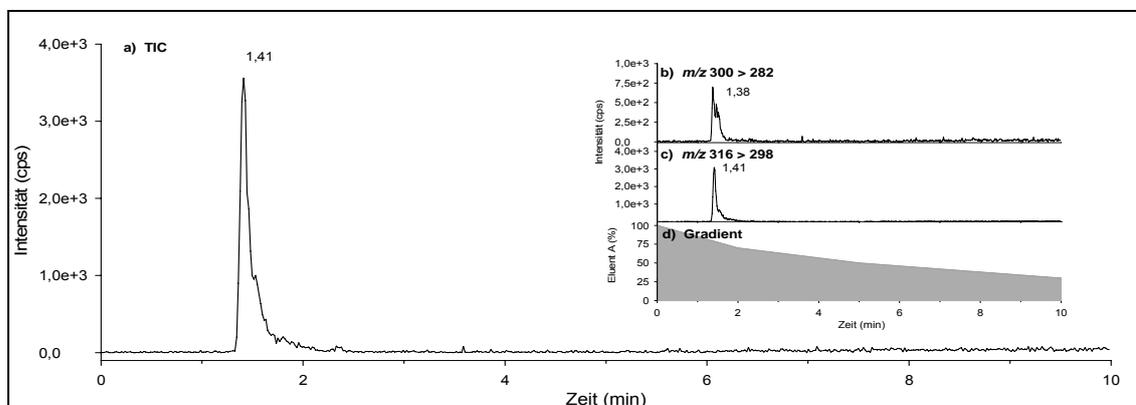


Abb. 22: MRM-Chromatogramm eines Mischstandards mit STX (256 pg) und NEO (2885 pg); a) TIC, b) STX bei t<sub>R</sub> 1,38 min, c) NEO bei t<sub>R</sub> 1,41 min; d) Gradientenprofil mit Anteil Eluent A (%) unter den MS-Bedingungen von Abschnitt 4.4.4.3 (Tab. 21)

## Anatoxine und Cylindrospermopsine

Für die Trennung von ANA und CYN wurden unterschiedliche Zusammensetzungen des Eluentengemisches im Bereich 0-15 min untersucht. Als Anfangsbedingung des Gradienten wurde 100 % des wässrigen Eluenten A gewählt, danach schrittweise der Anteil von Eluent B erhöht. Dabei wurde die Eluentenzusammensetzung derart geändert, dass eine Trennung der Toxine ANA und CYN erreicht wurde (Abb. 23). Die Gradientenprofile für die einzelnen Experimente sind im Anhang in Tab. 21 dargestellt. Je langsamer die Abnahme von Eluent A, d. h. je flacher das Gradientenprofil war, desto längere Retentionszeiten - verbunden mit einer erhöhten Trennleistung - wurden für die Toxine erreicht. ANA eluierte in allen Experimenten vor CYN. Unter Anwendung eines extrem flachen Gradienten (0-15 min Eluent B auf 8 %) konnte eine Maximaltrennung der beiden Toxine von 3,21 min erreicht werden (Abb. 23j). Allerdings hat eine geringe Eluentenänderung einen sehr negativen Effekt auf die Peakform und die Peakhöhe (Tab. 14). Es entstehen sehr breite und flache Peaks, die ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhalten aufweisen.

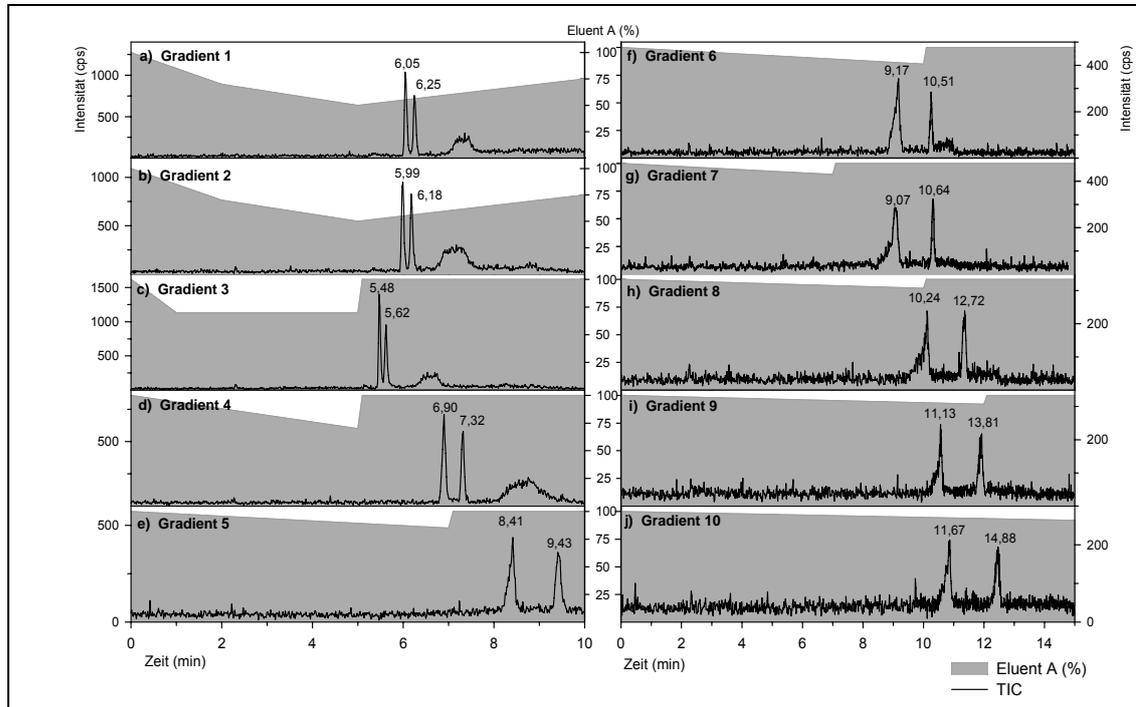


Abb. 23: MRM-Chromatogramme eines Mischstandards mit ANA (25 pg; 1. Peak) und CYN (25 pg; 2. Peak) mit verschiedenen Gradientenprofilen (Tab. 21) unter den MS-Bedingungen von Abschnitt 4.4.4.3

Tab. 14: Maximal-Intensitäten (cps) von ANA (25pg) und CYN (25 pg) unter den Gradientenprofilen 1-10 (Tab. 21)

Toxin	Maximale Intensität (cps)									
	Gradient 1	Gradient 2	Gradient 3	Gradient 4	Gradient 5	Gradient 6	Gradient 7	Gradient 8	Gradient 9	Gradient 10
ANA	1036	944	1400	710	436	342	286	238	246	208
CYN	702	768	860	548	416	250	274	200	162	144

### Microcystine / Nodularin

Die Retentionszeit von Nodularin wurde in Abhängigkeit der Gradientenprofile für die Trennung von ANA und CYN überprüft. Drei MRM-Chromatogramme von NOD sind in Abb. 24 gemeinsam mit den jeweiligen Gradientenprofilen (Tab. 21 im Anhang) dargestellt. Je nach Gradientenzusammensetzung im Retentionsbereich von ANA und CYN bis 15 min verschiebt sich die Retentionszeit von NOD mit Zunahme des wässrigen Anteils (Eluent A) von  $t_R$  14,82 min (Abb. 24a) nach  $t_R$  18,83 min (Abb. 24c).

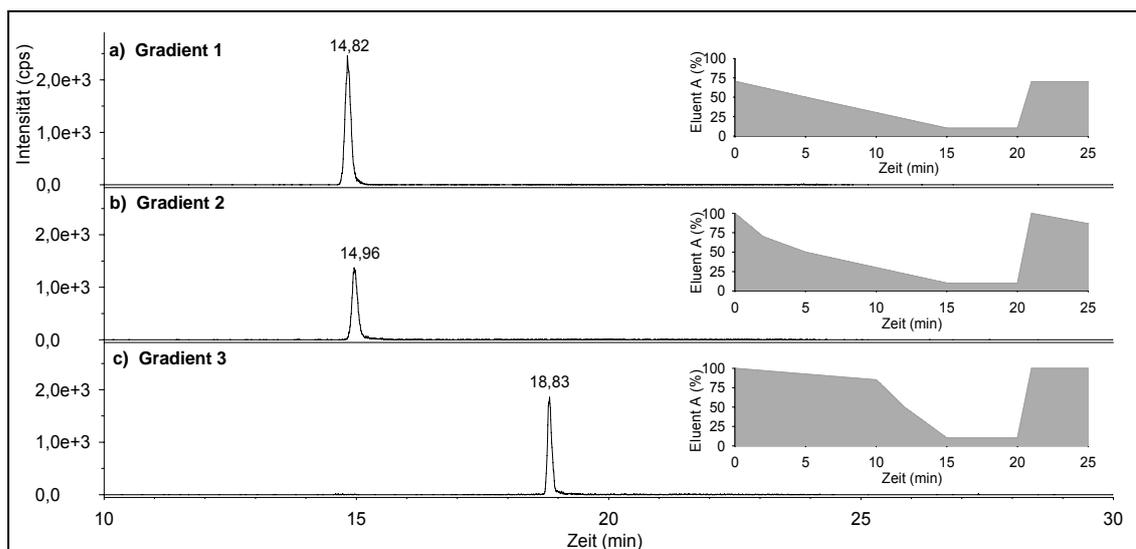


Abb. 24: MRM-Chromatogramme von NOD (25 pg) mit verschiedenen Gradientenprofilen (Tab. 21) unter den MS-Bedingungen von Abschnitt 4.4.4.3

Da NOD bereits eine ausreichende Abtrennung von ANA und CYN zeigte, wurde die MC-Trennung mit lediglich einem Gradientenprofil untersucht (Tab. 21 im Anhang). Dabei war es das Hauptziel, die Retentionszeiten vor allem im hinteren Bereich in einem engen Rahmen zu halten, um die gesamte Analysendauer zu verkürzen. Abb. 25 zeigt ein MRM-Chromatogramm für die Trennung von MC-LA, MC-LF, MC-LR, MC-LW, MC-RR und MC-YR, womit nicht nur die vollständige Trennung dieser MCs demonstriert wird, sondern es

ist daraus auch ersichtlich, dass die gesamte Rundauer unter diesen Bedingungen auf 30 min beschränkt werden kann.

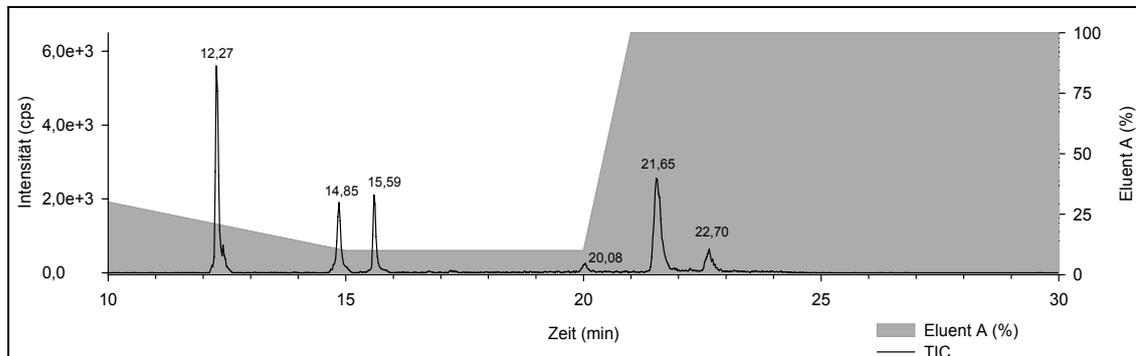


Abb. 25: MRM-Chromatogramm eines MC-Standards (je 25 pg) mit MC-RR ( $t_R$  12,27 min), MC-YR ( $t_R$  14,85 min), MC-LR ( $t_R$  15,59 min), MC-LA ( $t_R$  20,08 min), MC-LW ( $t_R$  21,65 min) und MC-LF ( $t_R$  22,70 min) mit Gradientenprofil (Tab. 21) unter den MS-Bedingungen von Abschnitt 4.4.4.3.

### Erstellung von Zeitperioden

Basierend auf den Retentionszeiten aller Standardsubstanzen wurde ein Gradientenprofil erstellt (Tab. 15) und im Zusammenhang damit wurden drei Zeitperioden eingerichtet: Periode 1: 0-3 min für die Elution der PSP-Toxine, Periode 2: 3-10 min für die Detektion von ANAs und CYNs und Periode 3: 10-30 min für MCs und NODs. Unter diesen Bedingungen werden die Toxingruppen deutlich voneinander getrennt (Abb. 26, 27, 29), jedoch lässt dabei jedes Zeitfenster Raum für weitere Toxinvarianten, die in der Probenmatrix vorhanden sein können.

Tab. 15: Gradientenprofil für die Screening-Methode

Zeit (min)	Fluss $\mu\text{L min}^{-1}$	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	400	100	0
1	400	50	50
5	400	50	50
15	400	10	90
20	400	10	90
21	400	100	0
30	400	100	0

#### 4.4.5.2 Optimierung der MS-Parameter

Beim Precursor-Ionen-Scan-Modus wird im Q3 ein charakteristisches Fragment für jede Toxingruppe selektiert. Da innerhalb der PSP-Toxine kein Fragment existiert, das von allen PSP-Toxinen gebildet wird, gelingt hier eine Erfassung lediglich im MRM-Modus.

Die anderen Toxingruppen verfügen über ein spezifisches Tochterion. Für die ANAs wird das Fragment  $m/z$  91,0, für die CYNs das Ion mit  $m/z$  194,0 und für MCs sowie NOD das Adda-Fragment mit  $m/z$  135,0 als Precursor-Ion eingesetzt. Die Optimierung der MS-Parameter wurde als Kompromiss zwischen den Bedingungen mit Maximalintensität im MRM-Modus und geeigneten Intensitätsverhältnissen der Fragmente im Produkt-Ionen-Spektrum durchgeführt. In den Produkt-Ionen-Spektren sollte neben den gebildeten Fragmentationen die Elternmasse  $[M+H]^+$  oder  $[M+2H]^{2+}$  als Signal vorhanden sein, um die Fragmentierungsenergien nach oben einzuschränken. Im MRM-Modus erfolgte für ANA, CYN, NOD und MCs folgende Selektion:  $[M+H]^+$  oder  $[M+2H]^{2+}$  im Q1 und  $[\text{Precursor-Ion}]^+$  im Q3. Für jede verfügbare Standardsubstanz wurden die MS-Parameter im MRM-Modus durch schrittweise Variation der Parameterwerte optimiert.

### PSP-Toxine

Die PSP-Toxine, die dem Precursor-Ionen-Scan-Modus nicht zugänglich sind, wurden unter Einsatz der bereits beschriebenen MRM-Übergänge detektiert [174] (Tab. 13). Abb. 26 zeigt als Beispiel für die PSP-Toxine mehrere Produkt-Ionen-Spektren von GTX1/4 mit verschiedenen DP- und CE-Werten.

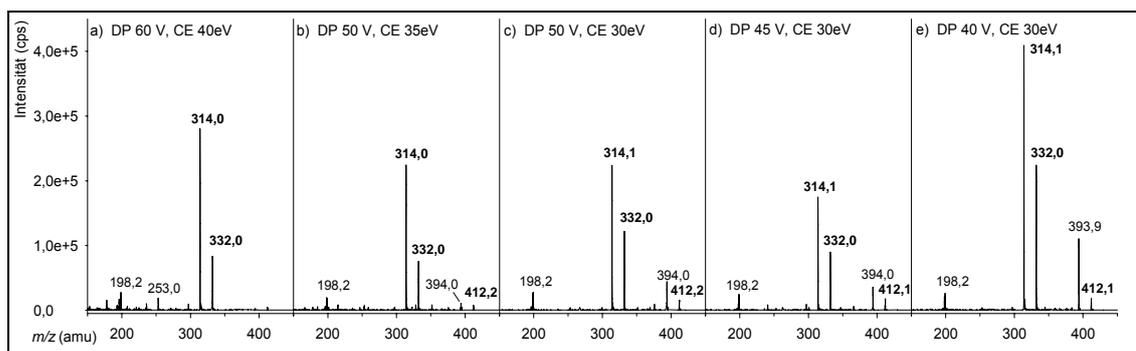


Abb. 26: Produkt-Ionen-Spektren von GTX1/4 (0,48 ng GTX1 / 1,44 ng GTX4) mit DP 60 V, CE 40 eV (a); DP 50 V, CE 35 eV (b); DP 50 V, CE 30 eV (c); DP 45 V, CE 30 eV (d); DP 40 V, CE 30 eV (e)

Wird das Declustering Potential mit 60 V (a) zu hoch gewählt, ist das Elternfragment  $[M+H]^+$  mit  $m/z$  412 nicht mehr detektierbar, jedoch führt die Reduktion dieses Wertes auf 50 V (b, c), 45 V (d) und 40 V (e) dazu, dass das Elternion wieder auftaucht. Auch hat die Stärke der Kollisionsenergie von 30-40 eV einen bedeutenden Einfluss auf die Fragmentierung und damit auf die

Intensitäten der Tochterfragmente  $[M+H-SO_3]^+$  mit  $m/z$  332,  $[M+H-SO_3-H_2O]^+$  mit  $m/z$  314 und  $[M+H-H_2O]^+$  mit  $m/z$  394. Die höchsten Intensitäten dieser Fragmentationen bei geringer Intensität des Elternfragments waren bei Fragmentierungsbedingungen mit DP 40 V und CE 30 eV vorhanden (Abb. 26e), was auch im MRM-Modus zur größten Signalintensität führte. Für die Detektion der PSP-Toxine konnten gleiche MS-Parameter für alle PSP-Toxine angewendet werden (Tab. 16). Abb. 27 zeigt ein MRM-Chromatogramm eines PSP-Standards mit STX, NEO, B1, dcSTX und GTX1-4 unter diesen Bedingungen.

Tab. 16: MS-Parameter innerhalb der unterschiedlichen Experimente in den Perioden 1-3 zur Detektion der cyanobakteriellen Toxine im Precursor-Ionen-Scan-Modus

Toxine	Periode	Experiment	CUR (L h <sup>-1</sup> )	IS (V)	Temp (°C)	CAD-Level	GS 1 (L h <sup>-1</sup> )	GS 2 (L h <sup>-1</sup> )	DP (V)	EP (V)	CE (eV)
PSP-Toxine	1	1	15	4500	550	High	30	70	40	8	30
ANAs	2	1	25	5200	550	High	50	70	80	10	50
CYNs	2	2	25	5200	550	High	50	70	80	10	50
MCs	3	1	15	5500	550	High	50	70	46	10	17
MCs	3	2	15	5500	550	High	50	70	40	10	35
MCs	3	3	15	5500	550	High	50	70	60	9	60
NODs	3	4	15	5500	550	High	50	70	130	10	90

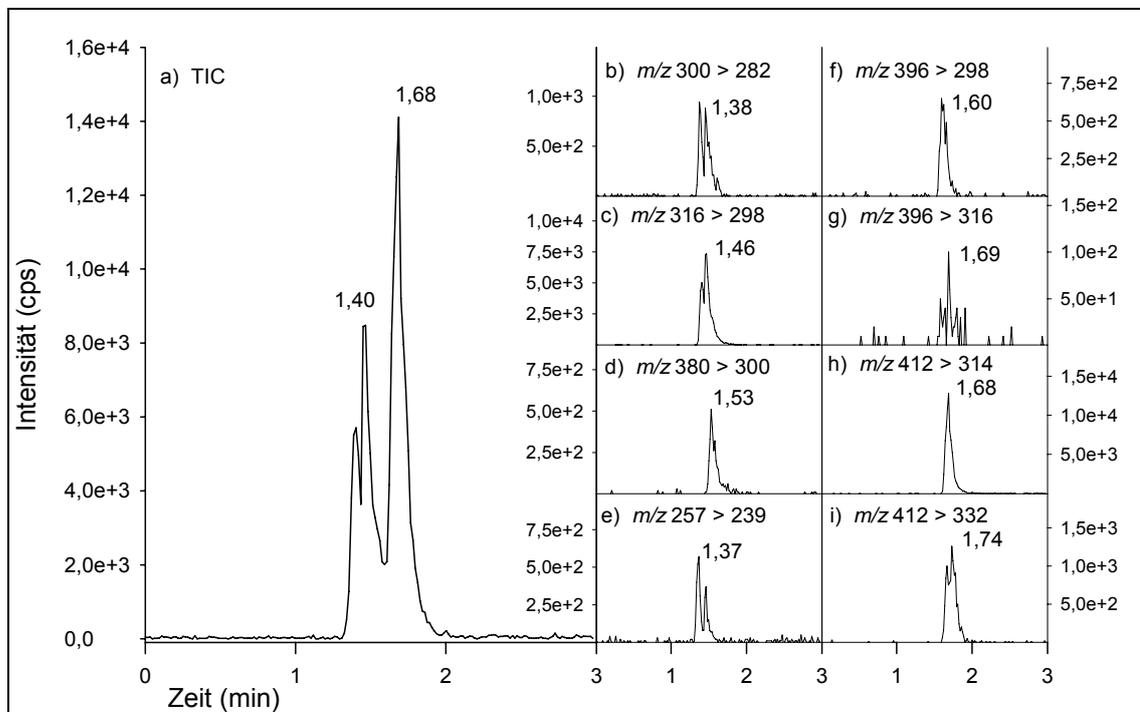


Abb. 27: MRM-Chromatogramm eines PSP-Mischstandards: a) TIC, b) STX (0,13 ng) bei  $t_R$  1,38 min, c) NEO (1,44 ng) bei  $t_R$  1,46 min, d) B1 (0,05 ng) bei  $t_R$  1,53 min, e) dcSTX (0,15 ng) bei  $t_R$  1,37 min, f) GTX2/3 (0,15 / 0,30 ng) bei  $t_R$  1,60 min, g) GTX2/3 (0,15 / 0,30 ng) bei  $t_R$  1,69 min, h) GTX1/4 (0,95/2,84 ng) bei  $t_R$  1,68 min, i) GTX1/4 (0,95 / 2,84 ng) bei  $t_R$  1,74 min

## Anatoxine und Cylindrospermopsine

Bei der Detektion der ANAs wurde im ersten Quadrupol ein Scan-Bereich von  $m/z$  100-300 amu eingestellt und nach Kollision im zweiten Massenanalysator das Fragmentation mit  $m/z$  91,0 selektiert. Für die CYNs beträgt der Scan-Bereich  $m/z$  300-500 amu und das Precursor-Ion  $m/z$  194,0. Die Erfassung der ANAs und CYNs wurde innerhalb einer Zeitperiode mit zwei verschiedenen, sich jedoch ständig wiederholenden Experimenten vorgenommen. Die optimalen Quellenparameter für ANA und CYN unterschieden sich bzgl. der Ionenspray-Spannung und den Gasflüssen für GS1 und GS2. Für ANA wurden die höchsten Intensitäten bei CUR 25 L h<sup>-1</sup>, hohem CAD-Level und einer Temperatur von 600°C bei Gasflüssen von 45 L h<sup>-1</sup> (GS1), 60 L h<sup>-1</sup> (GS2) und IS von 4700 V erreicht. Dagegen lagen für CYN die optimalen Werte für GS1, GS2 und IS bei 55 L h<sup>-1</sup>, 80 L h<sup>-1</sup> und 5300 V. Diese unterschiedlichen Quellenparameter innerhalb der Experimente, die eine ständige Änderung der Potenziale nach sich zogen, führten zu geringeren Peakintensitäten, so dass als Kompromiss folgende MS-Parameter eingesetzt wurden: 50 L h<sup>-1</sup> für GS1, 70 L h<sup>-1</sup> für GS2 und 5000 V für IS. Die Substanzparameter zur Fragmentierung der Moleküle konnten für beide Standardsubstanzen gleich gewählt werden, da sich die optimalen Parameter nur wenig unterschieden (Tab. 16).

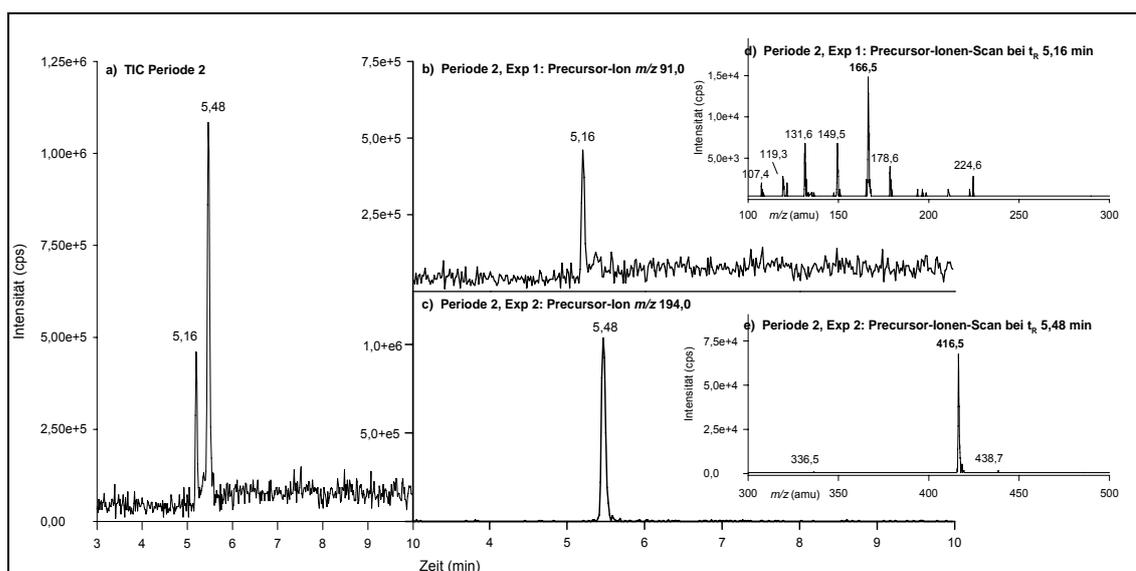


Abb. 28: Precursor-Ionen-Chromatogramm von Periode 2 (a); Experiment 1 für ANAs mit Precursor-Ion  $m/z$  91,0: b) ANA-Standard (2 ng) bei  $t_R$  5,16 min; Experiment 2 für CYNs mit Precursor-Ion  $m/z$  194,0: c) CYN-Standard (2 ng) bei  $t_R$  5,48 min; Precursor-Ionen-Scan von ANA (d) und CYN (e)

Im Precursor-Ionen-Scan von CYN bei  $t_R$  5,48 min in Abb. 28e treten neben dem Hauptpeak, dem protonierten Molekülion ( $m/z$  416,5), Spuren von  $m/z$  336,5 für  $[M+H-SO_3]^+$  und das  $Na^+$ -Addukt mit  $m/z$  438,7 auf. Dagegen sind im Precursor-Ionen-Scan von ANA eine Reihe Signale vorhanden (Abb. 28d). Außer dem Hauptpeak  $[ANA+H]^+$  mit  $m/z$  166,5 erscheinen  $[ANA+Na]^+$  ( $m/z$  178,6),  $[ANA-NH_3+H]^+$  ( $m/z$  149,5),  $[ANA-NH_3-H_2O+H]^+$  ( $m/z$  131,6),  $[ANA-NH_3-COCHCH_3+H]^+$  ( $m/z$  107,4) und weitere Massen.

### Anatoxin-a(s)

Für den Phosphatester ANAS fehlen Originalpublikation zur MS-Detektion. Auch sind die Elutionseigenschaften von LC-Säulen unbekannt. Da weder ANAS noch eine verwandte Variante als Standardsubstanz verfügbar sind, wurde ein ANAS-haltiger *Anabaena lemmermannii*-Extrakt während der Methodenoptimierung eingesetzt. Fragmentierungsexperimente führten zu signifikanten Fragmenten nach Wasser- und  $PO_3CH_3$ -Abspaltung von  $m/z$  235,1 und  $m/z$  159,1 (E. Pinto, persönliche Mitteilung), so dass die MRM-Übergänge  $[M+H]^+ > [M+H-H_2O]^+$  mit  $m/z$  253 > 235 und  $[M+H]^+ > [M+H-PO_3CH_3]^+$  mit  $m/z$  253 > 159 zur Detektion herangezogen wurden. Unter den gewählten chromatographischen Bedingungen mit dem Gradientenprofil aus Tab. 15 eluiert ANAS bei 2,41 min, d. h. innerhalb der Zeitperiode für die PSP-Toxine. Deshalb wurde innerhalb des ersten Zeitfensters ein zweites MRM-Experiment mit optimierten Parametern für die Detektion von ANAS erstellt (Tab. 16).

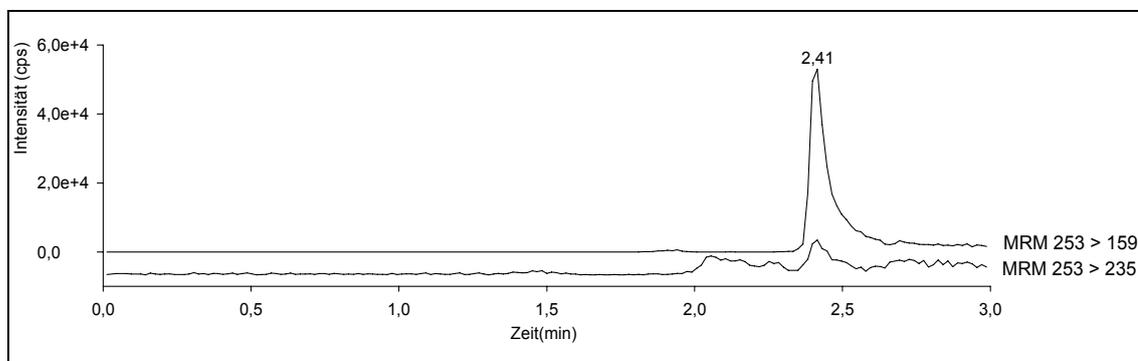


Abb. 29: MRM-Chromatogramm eines Extraktes von *Anabaena lemmermannii* mit ANAS bei  $t_R$  2,41 min

## Microcystine und Nodularine

Für MCs wurde beschrieben, dass die Anzahl der Arg-Reste die Protonierungsstufe im Molekül bestimmt [178]. Somit sollten innerhalb der untersuchten MC-Standards MC-LA, MC-LF und MC-LW einfach protonierte Ionen, MC-LR und MC-YR einfach und doppelt protonierte und MC-RR mit zwei Arginin-Resten nur doppelt protonierte Molekülonen bilden. Allerdings konnte für MC-LW keine Fragmentierung von  $[M+H]^+$  mit  $m/z$  1025,5 bis zu  $m/z$  135,0 erreicht werden. Dafür gelang eine Erfassung des doppelt ionisierten Moleküls mit  $m/z$  513,3. Somit mussten für die MCs die Scan-Bereiche der einfach und zweifach ionisierten Moleküle mit  $m/z$  450-575 für  $[M+2H]^{2+}$  und  $m/z$  900-1150 für  $[M+H]^+$  abgedeckt werden. Bei der Fragmentierung der  $[M+2H]^{2+}$ -Ionen wurde festgestellt, dass MC-RR im Gegensatz zu MC-LR, MC-LW und MC-YR mildere Fragmentierungsbedingungen benötigt, um eine gute Sensitivität zu erreichen (Tab. 16). Es wurden innerhalb der Zeitperiode 3 drei Analysenexperimente speziell im Hinblick auf die MC-Detektion mit verschiedenen Scan-Bereichen und MS-Parametern eingerichtet (Tab. 17, Abb. 30).

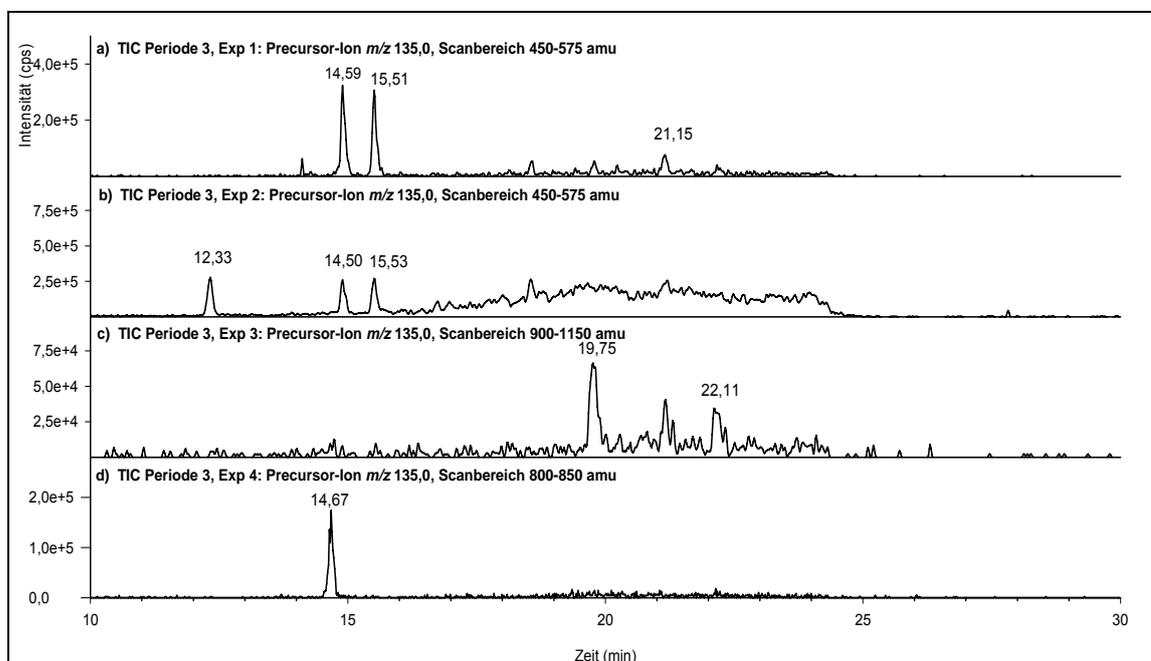


Abb. 30: Precursor-Ionen-Chromatogramm von Periode 3: a) Experiment 1 mit MC-YR (100 pg) bei  $t_R$  14,59 min, MC-LR (100 pg) bei  $t_R$  15,51 min, MC-LW (100 pg) bei  $t_R$  21,15; b) Experiment 2 mit MC-RR (100 pg) bei  $t_R$  12,33 min, MC-YR bei  $t_R$  14,50 min und MC-LR bei  $t_R$  15,53 min; c) Experiment 3 mit MC-LA (100 pg) bei  $t_R$  19,75 min und MC-LF (100 pg) bei  $t_R$  22,11 min; d) Experiment 4 mit NOD (100 pg) bei  $t_R$  14,67 min

Dabei sollten MC-LR und MC-YR im ersten und zweiten Experiment (Abb. 30a, b), MC-LW nur im ersten (Abb. 30a), MC-RR (Abb. 30b) im zweiten und MC-LA und MC-LF im dritten Experiment (Abb. 30c) erfasst werden. In den Precursor-Ionen-Scan-Spektren (Abb. 31) traten jeweils die  $[M+H]^+$ - und  $[M+2H]^{2+}$ -Massen der MCs mit  $m/z$  520,4 für MC-RR (Abb. 31a),  $m/z$  523,8 für MC-YR (Abb. 31b),  $m/z$  498,6 für MC-LR (Abb. 31c),  $m/z$  514,6 für MC-LW (Abb. 31d),  $m/z$  911,3 für MC-LA (Abb. 31e) und  $m/z$  987,5 für MC-LF (Abb. 31f) auf.

Aus Abb. 32 wird das Vorgehen im Hinblick auf eine Optimierung unterschiedlicher MS-Parameter anhand der Peakintensitäten für MC-LW mit  $[M+2H]^{2+} > [Adda-Fragment]^+$  ersichtlich.

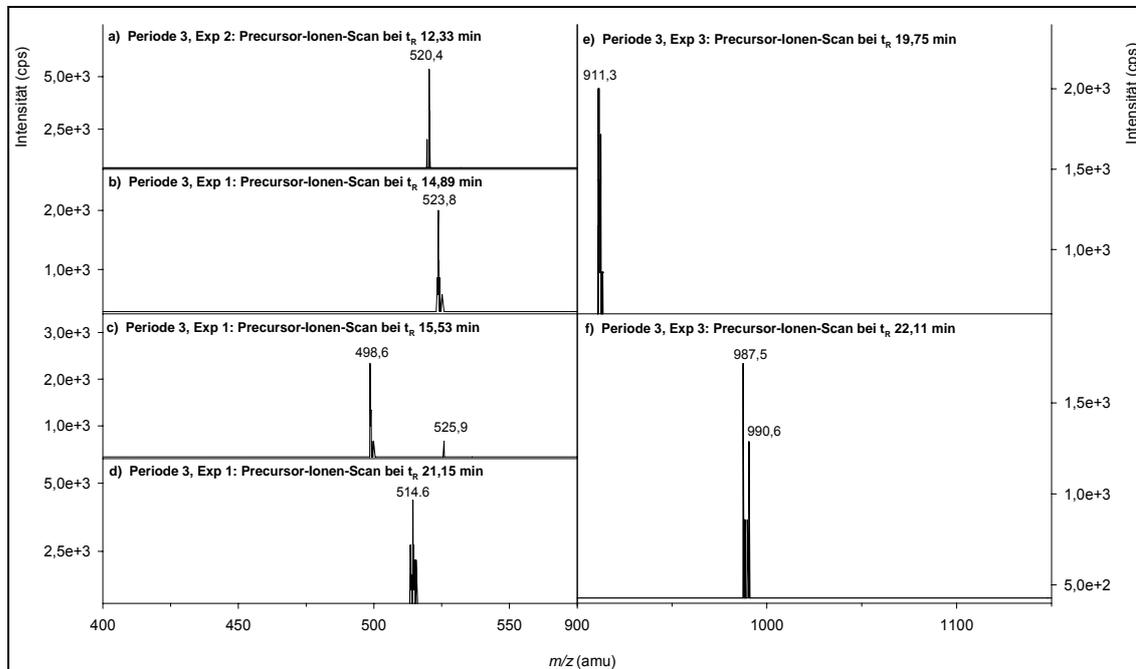


Abb. 31: Precursor-Ionen-Scans von MC-RR (a), MC-YR (b), MC-LR (c), MC-LW (d), MC-LA (e), MC-LF (f)

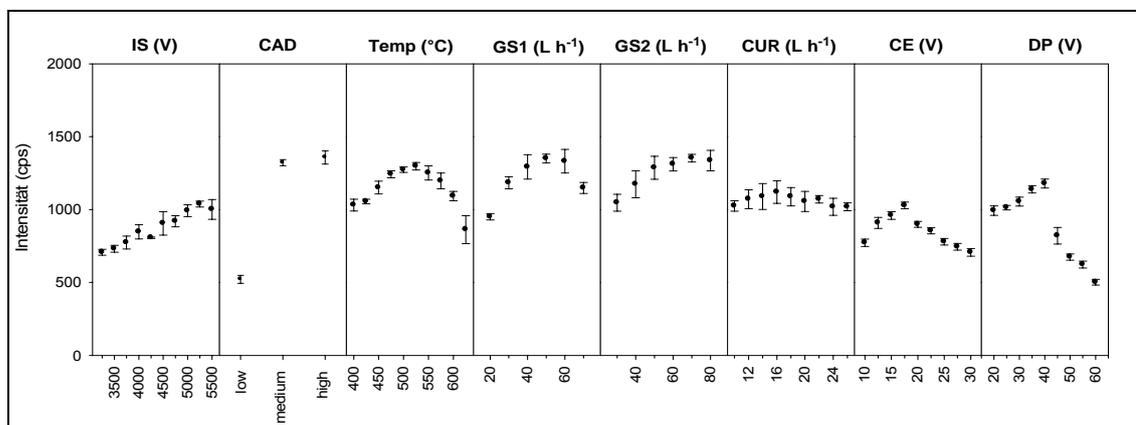


Abb. 32: Signalintensitäten (cps) von MC-LW ( $m/z$  513,3 > 135,0) für verschiedene MS-Parameter im Optimierungsprozess

Tab. 17: Differenzierung der vier Analysenexperimente für MCs und NODs nach Scanbereichen, Protonierungsgrad und Anzahl der Arg-Reste im Molekül

Detektion von	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4
	MCs	MCs	MCs	NODs
Scanbereich ( $m/z$ )	400 - 575	400 - 575	900 - 1150	800 - 850
Molekülionen $[M+H]^+$ / $[M+2H]^{2+}$	$[M+2H]^{2+}$	$[M+2H]^{2+}$	$[M+H]^+$	$[M+H]^+$
Anzahl Arg-Reste im MC-Peptid	1, Ausnahme 0 bei MC-LW	2	0	0

Für die NODs, die ausschließlich einfach protonierte Basisionen bilden, wurde der Massenbereich im Q1 auf  $m/z$  800-850 eingestellt. Abb. 33 stellt den Optimierungsprozess von NOD unter Anwendung verschiedener Werte für die MS-Parameter dar. Eine Analyse unter den optimierten Bedingungen (Tab. 16) in einem vierten Experiment innerhalb der Periode für MCs und NODs (Abb. 30) ergab im Precursor-Ionen-Scan-Spektrum neben dem Pseudo-Molekülpeak mit  $m/z$  825,6 Isotopenmassen mit  $m/z$  826,8 und  $m/z$  827,4 (Abb. 34).

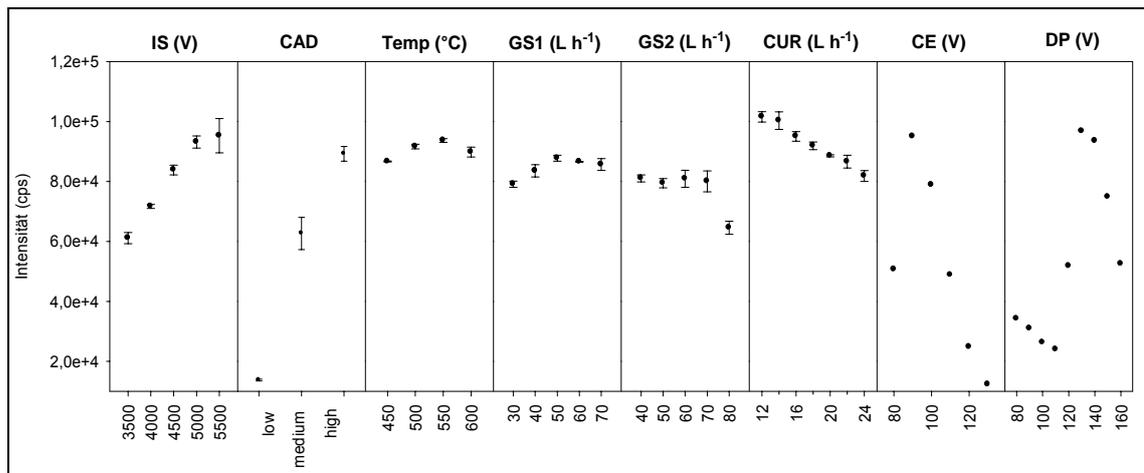


Abb. 33: Signalintensitäten (cps) von NOD ( $m/z$  825,5 > 135,0) für verschiedene MS-Parameter im Optimierungsprozess

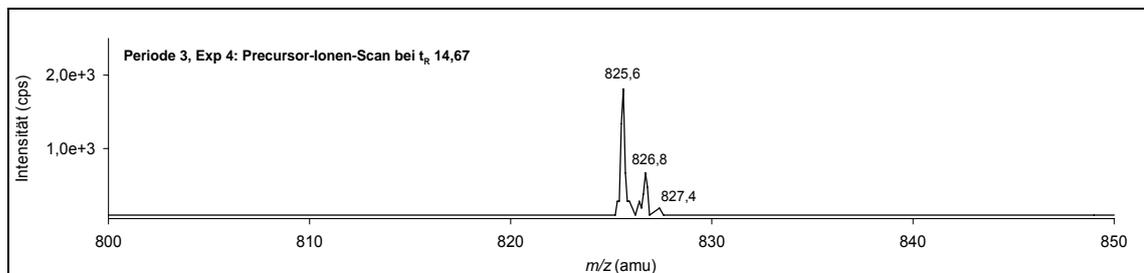


Abb. 34: Precursor-Ionen-Scan von NOD, Scan-Bereich  $m/z$  800-850 amu

#### 4.4.5.3 Nachweisgrenze / Bestimmungsgrenze

Obwohl diese LC-MS/MS-Methode vorrangig mit dem Ziel eines Screenings entwickelt wurde, erfolgte eine Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen unter Verwendung zertifizierter Referenzmaterialien für folgende cyanobakterielle Toxine STX, NEO, GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, B1, dcGTX2, dcGTX3, dcSTX, CYN, ANA, MC-LA, MC-LW, MC-LF, MC-LR, MC-YR, MC-RR und NOD. Die quantitativen Bestimmungen erfolgten anhand der Precursor-Ionen-Chromatogramme der Toxinstandards bekannter Konzentration. Das Verhältnis aus Peakhöhe zu gemitteltem Basislinienrauschen (S/N) wurde gemessen, wobei die Basislinie nicht über den gesamten Retentionsbereich sondern nur in der unmittelbaren Umgebung des Analytenpeaks betrachtet wurde. LODs wurden mit einem S/N von 3 und die LOQs mit einem S/N von 5 berechnet.

Die LODs und LOQs für die jeweiligen Toxine sind in Tab. 18 als absoluter Gehalt (in ng) auf der HPLC-Säule aufgeführt. Die entsprechenden Daten sind im Anhang in den Tab. 22-24 enthalten.

Tab. 18: Nachweisgrenze (LOD, pg) und Bestimmungsgrenze (LOQ, pg) für jedes Standardtoxin

	Konzentrationsbereich (pg)	Anzahl Datenpunkte	Konzentrations- koeffizient R <sup>2</sup>	LOD (pg) S/N=3	LOQ (pg) S/N=5
STX	4 - 200	12	0,9764	10,0	17,0
NEO	1 - 200	15	0,9937	1,0	1,7
GTX 1	2 - 440	18	0,9967 / 0,9973	6,0	10,0
GTX 2	15 - 600	19	0,9450 / 0,9387	12,0	15,0
GTX 3	5 - 1160	19	0,9358 / 0,8685	6,0	10,0
GTX 4	0.7 - 145	18	0,9967 / 0,9973	0,6	1,0
GTX 5	3 - 150	12	0,9676	3,0	5,0
dcGTX 2	16 - 640	19	0,9260	25,0	40,0
dcGTX 3	4.5 - 180	19	0,9260	25,0	40,0
dcSTX	16 - 160	12	0,9818	9,0	15,0
Anatoxin	100 - 5000	5	0,9894	300,0	500,0
Cylindrospermopsin	5 - 200	18	0,9607	9,0	15,0
MC-LA	12.5 - 200	15	0,9392	18,0	30,0
MC-LW	50 - 200	9	0,9798	100,0	170,0
MC-LF	50 - 200	9	0,8980	100,0	170,0
MC-LR	5 - 200	18	0,9861	15,0	25,0
MC-YR	5 - 200	18	0,9636	15,0	25,0
MC-RR	5 - 200	18	0,9603	20,0	35,0
Nodularin	5 - 200	18	0,9922	6,0	10,0

Die Gonyautoxine GTX1/4 und GTX2/3 und die Decarbamoylgonyautoxine dcGTX2/3 stellen jeweils Epimere mit gleichem Molekulargewicht dar. Nach Fragmentierung weisen die Paare unterschiedliche Produkt-Ionen-Spektren mit

gleichen Tochterionen aber verschiedenen Intensitäten auf. Deshalb erfolgte zur Quantifizierung der jeweiligen Epimeren die Bestimmung der Responsefaktoren der Einzelisomeren nach ihrer vollständigen chromatographischen Trennung entsprechend Dell'Aversano et al. [174].

#### 4.4.5.4 Diskussion der Ergebnisse

##### **Chromatographische Trennung**

Da während der Methodenentwicklung ausschließlich kommerziell erhältliche Standardsubstanzen eingesetzt wurden, konnten nicht alle Vertreter der einzelnen Toxingruppen in die Experimente einbezogen werden. Ein enger Retentionsbereich für die gesamte Toxingruppe erhöht jedoch die Wahrscheinlichkeit, dass unbekannte Strukturvarianten einer Toxingruppe im selben Zeitfenster eluieren.

Die PSP-Toxine sind extrem polar und eluieren deshalb sehr früh (< 2 min). Diese Tatsache ist für die Gruppentrennung der cyanobakteriellen Toxine von großem Vorteil, da die PSP-Toxine somit von allen anderen Toxinen, die eine stärkere Retention aufweisen, separiert werden können.

ANA wurde als einzige verfügbare Standardsubstanz der ANAs für die Messungen eingesetzt, jedoch wurde die Detektion von ANA neben HANA oder ANA neben Dihydro-ANA nach chromatographischer Trennung beschrieben [117, 168, 171, 194]. Danach eluieren von einer C18-Säule alle ANA-Strukturen in einem engen Elutionsbereich, was auf ähnliche Adsorptionseigenschaften der Strukturvarianten hindeutet.

Innerhalb der CYNs ist bekannt, dass CYN vor DoCYN eluiert [38], jedoch liegen die Retentionszeiten sehr nahe beieinander, was auf den strukturellen Gemeinsamkeiten beruht. Über die dritte Strukturvariante EpiCYN wurden bzgl. der Elution keine Angaben gemacht. Aber aufgrund der Struktur kann eine ähnliche Retentionszeit wie für CYN oder DoCYN erwartet werden.

ANA und CYN sind, obwohl beide Alkaloidstrukturen besitzen, sehr unterschiedlich aufgebaut. Dennoch ist ihr Adsorptions-/Desorptionsverhalten im Hinblick auf die stationäre Phase und das gewählte Fließmittel sehr ähnlich.

Damit ist eine immer erfolgreich verlaufende chromatographische Trennung von ANA und CYN sehr unwahrscheinlich. Da die Zeitfenster für die einzelnen Toxingruppen alle möglichen Strukturvarianten abdecken sollen, erschien in diesem Fall das Risiko, dass Strukturvarianten ein gegebenes Zeitfenster verlassen, als zu groß. Deshalb wurde eine gemeinsame Zeitperiode für beide Toxingruppen, d. h. für ANAs und CYNs festgelegt, wobei die MS-Bedingungen hinsichtlich Peakform und Sensitivität optimiert wurden.

Nach den PSP-Toxinen sowie den ANAs und CYNs sollte für die MCs als größte Toxingruppe mit über 70 beschriebenen Vertretern ein drittes Zeitfenster erstellt werden. Für die Messungen standen die MCs MC-LA, MC-LF, MC-LR, MC-LW, MC-RR und MC-YR zur Verfügung. Diese Heptapeptide wurden chromatographisch deutlich von den ANAs und CYNs mit Alkaloidstruktur abgetrennt. Innerhalb der MCs eluierte zuerst MC-RR, gefolgt von MC-YR, MC-LR, MC-LA, MC-LW und MC-LF. In zahlreichen Publikationen ist die Elutionsfolge der MCs auf einer C18-Säule auch bei Anwesenheit seltener Strukturvarianten, wie [MeSer<sup>7</sup>]-MC-LR, [Asp<sup>3</sup>]-MC-LA, [Asp<sup>3</sup>]-MC-LL, MC-LY, MC-VF, MC-AR, MC-LAib, und MC-LL [41, 51], beschrieben worden, jedoch wurden niemals MCs erwähnt, die vor MC-RR oder nach MC-LF eluieren, so dass diese beiden MCs geeignet sind, einen Hinweis auf den gesamten Elutionsbereich der MCs zu geben. Deshalb kann gefolgert werden, dass im gewählten Zeitfenster 10-30 min alle MCs enthalten sind.

Für NODs wurden ein begrenzter Elutionszeitraum innerhalb der MCs beschrieben [81, 104, 179]. Da der NOD-Standard zwischen MC-RR und MC-YR eluierte, liegt das Zeitfenster für NOD-Varianten mitten im MC-Bereich, so dass in der dritten Zeitperiode alle MCs und NODs erfasst werden können.

### **Optimierung der MS-Parameter**

Die PSP-Toxine sind relativ instabile Moleküle, die bei Anwendung sehr milder Fragmentierungsbedingungen in der Kollisionszelle intensive Produktionen-Spektren erzeugen, die eine gute Basis für den MRM-Modus bilden. Dabei unterscheiden sich die einzelnen PSP-Toxine bzgl. der optimalen MS-Parameter voneinander nur wenig, so dass für alle PSP-Toxine dieselben Quellenparameter und Fragmentierungsenergien genutzt werden können.

Die PSP-Toxine stellen die am besten und längsten untersuchte Toxingruppe nicht nur in Blaualgen sondern auch in marinen Dinoflagellaten dar. Deshalb ist die Wahrscheinlichkeit, dass neue PSP-Strukturen entdeckt werden, als relativ gering einzuschätzen. Damit ist auch das Risiko für den Erhalt falsch-negativer Ergebnisse bzgl. einer PSP-Toxin-Kontamination nach Detektion im MRM-Modus niedrig.

Ein Scan-Bereich von  $m/z$  100-300 amu im Q1 deckt die protonierten Molekülonen  $[M+H]^+$  aller ANA-Derivate ab: ANA ( $m/z$  166), HANA ( $m/z$  180), EpoxyANA ( $m/z$  182), EpoxyHANA ( $m/z$  196), DihydroANA ( $m/z$  168), DihydroHANA ( $m/z$  182), HydroxyHANA ( $m/z$  196), DihydromethoxyHANA ( $m/z$  212) und KetoHANA ( $m/z$  194) und lässt zusätzlich weitere Möglichkeiten zur Detektion offen.

Das für die CYNs eingesetzte Precursor-Ion  $m/z$  194 wird von allen drei bisher bekannten Vertretern CYN, DoCYN und EpiCYN gebildet. Allerdings können in möglichen neuen Strukturvarianten Änderungen im Guanidyl-Rest zur Bildung anderer Fragmente führen, die mit  $m/z$  194 nicht erfasst werden können, jedoch umfasst der Scan-Bereich von  $m/z$  300-500 die beschriebenen Änderungen im Molekül.

Aufgrund des einfachen und zweifachen Ionisationsgrades der MC-Moleküle wurden die Massenbereiche für  $[M+H]^+$  mit  $m/z$  900-1150 und  $[M+2H]^{2+}$  mit  $m/z$  400-575 als Scan-Bereiche im Q1 bei Anwendung unterschiedlicher Fragmentierungsbedingungen im Q3 festgelegt. Derzeit ist  $[\text{Asp}^3]$ -MC-LA (896 Da) das MC mit dem geringstem Molekulargewicht und  $[\text{MeLan}^7]$ -MC-LR mit *N*-Methylanthionin das mit der höchsten Masse (1115 Da). Damit schließt der gewählte Massenbereich das gesamte Spektrum bisher beschriebener MCs ein. Dass MCs mit zwei Arg-Resten wie MC-RR zur Fragmentierung mildere Bedingungen gegenüber den anderen MCs verlangen, wurde bisher nicht beschrieben. MC-LW, ein MC ohne Arginin, bildete bei der ESI überraschenderweise das  $[M+2H]^{2+}$ -Signal anstatt  $[M+H]^+$ . Das schließt die Möglichkeit ein, dass bei den MCs ohne Arginin Ausnahmen mit einer zweiten Protonierungsstelle neben Adda existieren. Im Fall von MC-LW könnte die zweite Ionisierung beim Tryptophan erfolgen.

Der NOD-Scanbereich von  $m/z$  800-850 umfasst alle bekannten NOD-Varianten (inklusive der Strukturvarianten der beteiligten Aminosäuren). Das Precursor-Ion mit  $m/z$  135 wird von allen MCs und NODs mit Adda- und MeAdda-Struktur gebildet. Die [DMAdda]-Peptide, die eine Desmethylierung im Adda-Teil aufweisen, bilden hingegen das Fragment  $m/z$  121 und werden deshalb nicht im Precursor-Ionen-Scan-Modus detektiert.

#### **4.4.6 Anwendung der Methode**

Durch den Einsatz der LC-MS/MS-Methode unter Anwendung des Precursor-Ionen-Scan-Modus (für PSP-Toxine Einsatz des MRM-Modus) zur Untersuchung von Phytoplanktonproben sollten die Vorteile des Arbeitens in diesem MS-Modus bei der gezielten Erfassung von Toxinvarianten, die nicht als Standards erhältlich sind aber in den natürlichen Algenmatrizes vorkommen, aufgezeigt werden. Gleichzeitig sollte die Bedeutung einer sinnvollen Nutzung der drei Zeitfenster zum schnellen, empfindlichen und eindeutigen Nachweis der verschiedenen cyanobakteriellen Toxine aus Phytoplankton unbekannter Zusammensetzung demonstriert werden.

##### 4.4.6.1 Detektion cyanobakterieller Toxine aus natürlich belasteten Phytoplanktonproben

Drei verschiedene *Aphanizomenon*-Spezies, d. h. *Aph. flos-aquae*, ein potentieller Bildner von ANA [11], CYN [33], MCs [53, 60, 75] und einer Reihe PSP-Toxine [88, 93, 94], *Aph. gracile*, ein Produzent von STX und NEO [92] und *Aph. issatschenkoj*, einem ANA-Bildner [20], wurden hinsichtlich ihrer Toxinprofile untersucht.

Der *Aph. flos-aquae*-Extrakt zeigte im Zeitfenster der PSP-Toxine nach Detektion im MRM-Modus Signale für STX (Abb. 35b), NEO (Abb. 35 c), B1 (Abb. 35d) und dcSTX (Abb. 35e). Für *Aph. gracile* wurden die folgenden PSP-Toxine detektiert: STX (Abb. 35g), NEO (Abb. 35h) und dcSTX (Abb. 35j). Allerdings deuten die Signale, die in den Abb. 35 a-j als „Berge“ erscheinen, auf eine hohe Überlagerung mit Matrixbestandteilen hin. Innerhalb der Zeitfenster der anderen Toxingruppen wurden keine Signale aufgezeichnet.

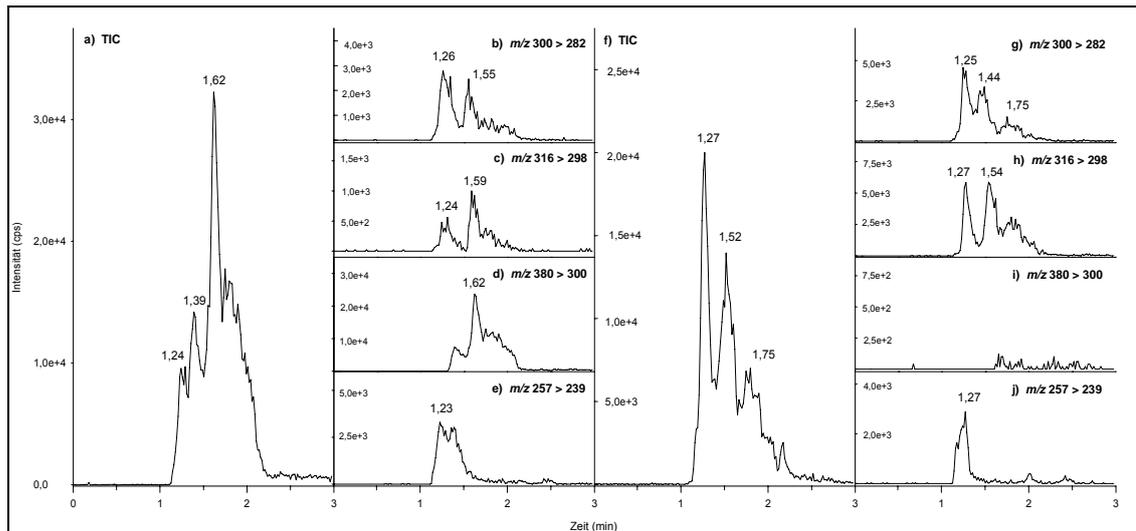


Abb. 35: MRM-Chromatogramme eines Extraktes von *Aphanizomenon flos-aquae* (a-e) und von *Aphanizomenon gracile* (f-j): a) TIC, b) STX bei  $t_R$  1,26 min, c) NEO bei  $t_R$  1,59 min, d) B1 bei  $t_R$  1,62 min, e) dcSTX bei  $t_R$  1,23 min, f) TIC, g) STX bei  $t_R$  1,25 min, h) NEO bei  $t_R$  1,54 min, i) kein B1, j) dcSTX bei  $t_R$  1,27 min

Das TIC eines *Aph. issatschenkoi*-Extraktes im Bereich der Analyse mit dem Precursor-Ion  $m/z$  91 ergab drei deutliche Peaks bei  $t_R$  5,38 min,  $t_R$  5,51 min und  $t_R$  6,01 min (Abb. 36b). Das erste Signal konnte anhand des Precursor-Spektrums ANA (Abb. 37a) zugeordnet werden. Der ANA-Gehalt betrug  $55 \mu\text{g}$  je g Trockenbiomasse. Der zweite Peak (Abb. 37b), der von  $m/z$  136,6 dominiert wurde und kleinere Signale mit  $m/z$  119,4; 147,6 und 166,6 aufweist, konnte keiner ANA-Variante zugeordnet werden. Der Precursor-Ionen-Scan bei  $t_R$  6,01 min (Abb. 37c) konnte anhand der Fragmente mit  $m/z$  120,5; 149,6 und 166,6 ebenfalls keiner ANA-Struktur zugeordnet werden.

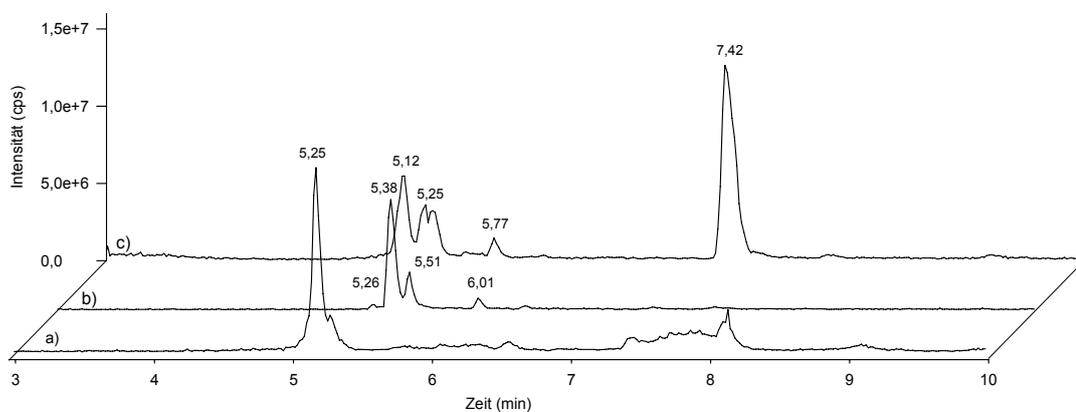


Abb. 36: Precursor-Ionen-Scan-Chromatogramme (Periode 2, Exp. 1) mit Precursor-Ion  $m/z$  91: a) Extrakt von *Anabaena flos-aquae* mit Peak bei  $t_R$  5,25 min; b) Extrakt von *Aphanizomenon issatschenkoi* mit Peaks bei  $t_R$  5,26 min;  $t_R$  5,38 min;  $t_R$  5,51 min und  $t_R$  6,01 min; c) Extrakt von *Oscillatoria* sp. mit Peaks bei  $t_R$  5,12 min;  $t_R$  5,25 min,  $t_R$  5,77 min und  $t_R$  7,42 min

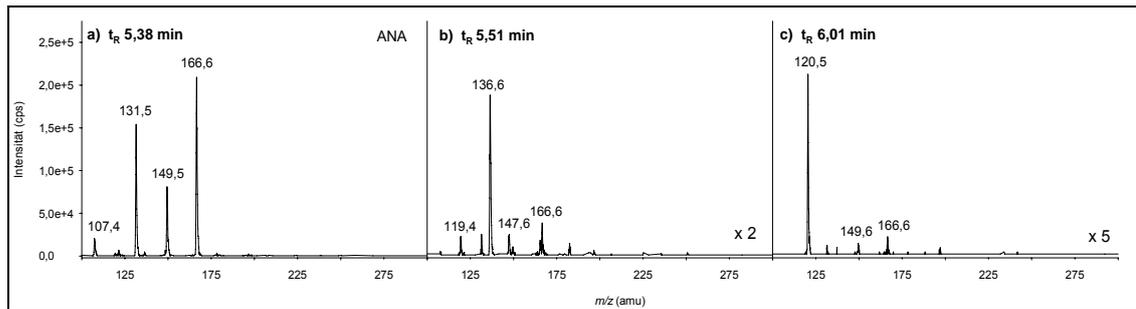


Abb. 37: Precursor-Ionen-Scans eines *Aphanizomenon issatschenkoi*-Extraktes mit Precursor-Ion  $m/z$  91, Scan-Bereich  $m/z$  100-300 amu: a) ANA bei  $t_R$  5,25 min; b) Peak bei  $t_R$  5,51 min; c) Peak bei  $t_R$  6,01 min

Das Chromatogramm von *Anabaena flos-aquae*, einem ANA- [15] und ANAS-Produzenten [25, 26], zeigte im MS-Experiment für ANAs einen Peak bei 5,25 min (Abb. 36a), der Retentionszeit des ANA-Standards. Im Precursor-Ionen-Scan (Abb. 38) erschienen die gleichen Tochterionen wie im Standard-Spektrum (Abb. 27d) mit  $m/z$  166,5 als Hauptsignal  $[\text{ANA}+\text{H}]^+$ . Der ANA-Gehalt wurde nach quantitativer Auswertung im Precursor-Ionen-Scan-Modus ermittelt. Er betrug 140,2  $\mu\text{g}$  pro g Lyophilisat.

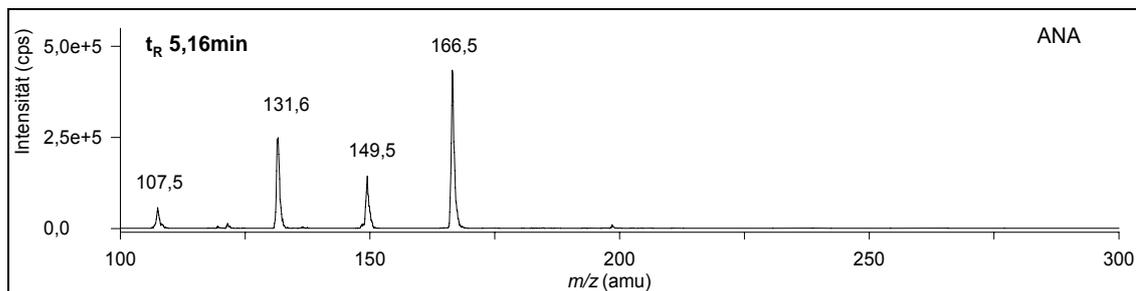


Abb. 38: Precursor-Ionen-Scans eines *Anabaena flos-aquae*-Extraktes mit Precursor-Ion  $m/z$  91, Scan-Bereich  $m/z$  100-300 amu; Peak bei  $t_R$  5,16 min

Ein *Oscillatoria* sp.- Extrakt wurde chemisch auf das mögliche Vorkommen von HANA [24] untersucht. Das TIC im Zeitfenster für ANAs (Abb. 36c) wies deutliche Peaks bei  $t_R$  5,12 min;  $t_R$  5,25 min,  $t_R$  5,77 min und  $t_R$  7,42 min auf. Anhand der Hauptmassen in den Precursor-Ionen-Scans (Abb. 39) konnten folgende ANA-Strukturen identifiziert werden: Dihydro-ANA bei  $t_R$  5,12 min mit  $[\text{M}+\text{H}]^+$  von  $m/z$  168,6 (Abb. 39a), DiHydro-HANA bei  $t_R$  5,25 min mit  $m/z$  182,5 (Abb. 39b) und HANA bei  $t_R$  5,77 min mit  $m/z$  180,6 (Abb. 39c). Der Precursor-Ionen-Scan des intensivsten Peaks bei  $t_R$  7,42 min wurde von einem Fragment mit  $m/z$  136,5 dominiert, jedoch konnte er nicht zugeordnet werden. Der HANA-Gehalt wurde als ANA-Äquivalent berechnet, wobei sich ein Gehalt von 49,1  $\mu\text{g}$  je g Lyophilisat ergab.

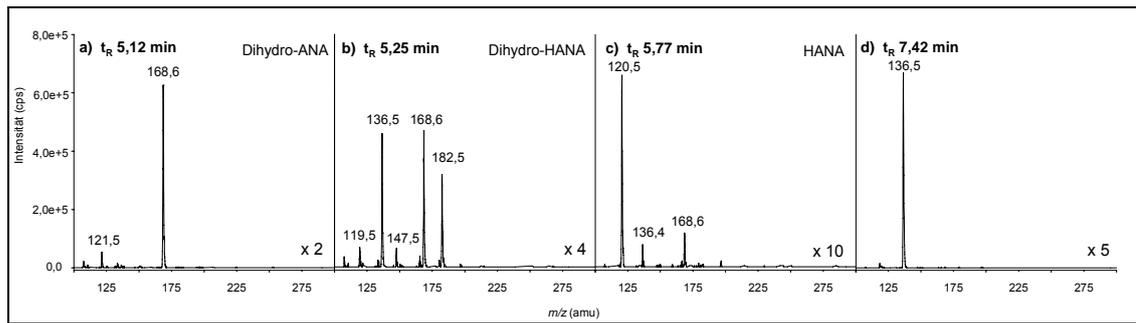


Abb. 39: Precursor-Ionen-Scans eines *Oscillatoria* sp.-Extraktes mit Precursor-Ion  $m/z$  91, Scan-Bereich  $m/z$  100-300 amu: a) Dihydro-ANA bei  $t_R$  5,12 min; b) Dihydro-HANA bei  $t_R$  5,25 min; c) HANA bei  $t_R$  5,77 min und d) Peak bei  $t_R$  7,42 min

Verschiedene Strains von *Lyngbya wollei* sind in der Lage, CYNs wie CYN und DoCYN [38] und PSP-Toxine wie STX, dcSTX, GTX4, B2, dcGTX2/3 [86, 87] und LWTX-1 bis LWTX-6 [87] zu bilden. Der analysierte *L. wollei*-Extrakt enthielt keinerlei PSP-Toxine, aber CYN bei  $t_R$  5,47 min und DoCYN bei  $t_R$  5,63 min (Abb. 40). Die Toxingehalte betragen 3,5  $\mu\text{g}$  CYN und 465,5  $\mu\text{g}$  DoCYN je g Lyophilisat, wobei DoCYN als CYN-Äquivalent quantifiziert wurde.

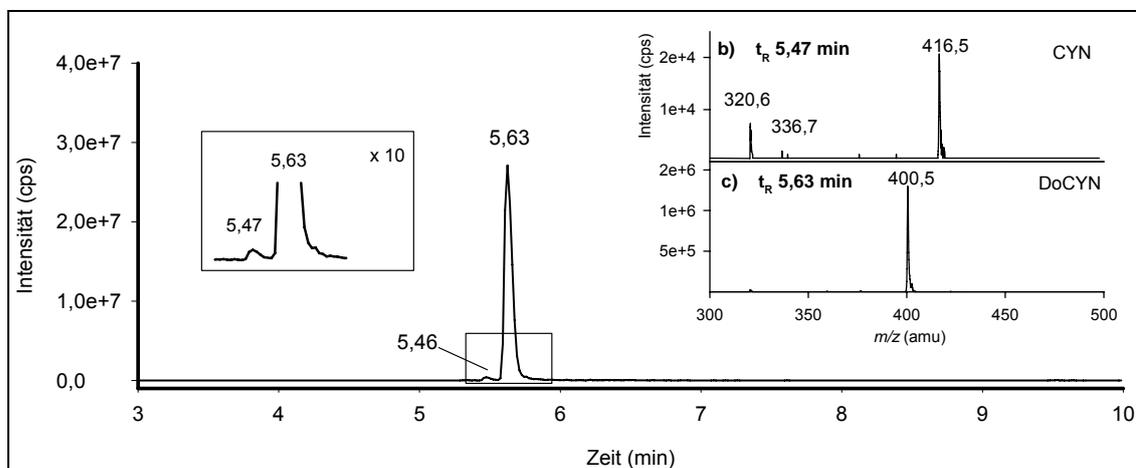


Abb. 40: a) Precursor-Ionen-Chromatogramm (Periode 2, Exp. 2) mit Precursor-Ion  $m/z$  194 eines *Lyngbya wollei* – Extraktes mit CYN bei  $t_R$  5,47 min und DoCYN bei  $t_R$  5,63 min; b) Precursor-Ionen-Scan von CYN, c) Precursor-Ionen-Scan von DoCYN; Scan-Bereich  $m/z$  300-500 amu

Eine Phytoplankton-Probe des Senftenberger Sees mit Dominanz von *Microcystis aeruginosa*, einem potentiellen Bildner einer Reihe MCs [41, 42, 45, 46, 48, 51, 53, 58, 59, 62, 65, 70, 71, 74], wurde hinsichtlich des Toxinprofils analysiert. Die MS-Signale wurden in den Experimenten 1 und 2 des Zeitfensters für MCs aufgezeichnet (Abb. 41). Im ersten Experiment (Abb. 41a)

ko-eluierten eine dmMC-YR-Variante und MC-YR bei  $t_R$  14,98 min (Abb. 42a) vor MC-LR (Abb. 42b,  $t_R$  15,60 min) und einer dmM-LR-Variante (Abb. 42c,  $t_R$  15,85 min). Im zweiten Experiment mit milderer Fragmentierungsbedingungen eluierten die zweifach Arginin-haltigen MCs dmdmMC-RR bei  $t_R$  11,84 min und dmMC-RR bei  $t_R$  12,22 min.

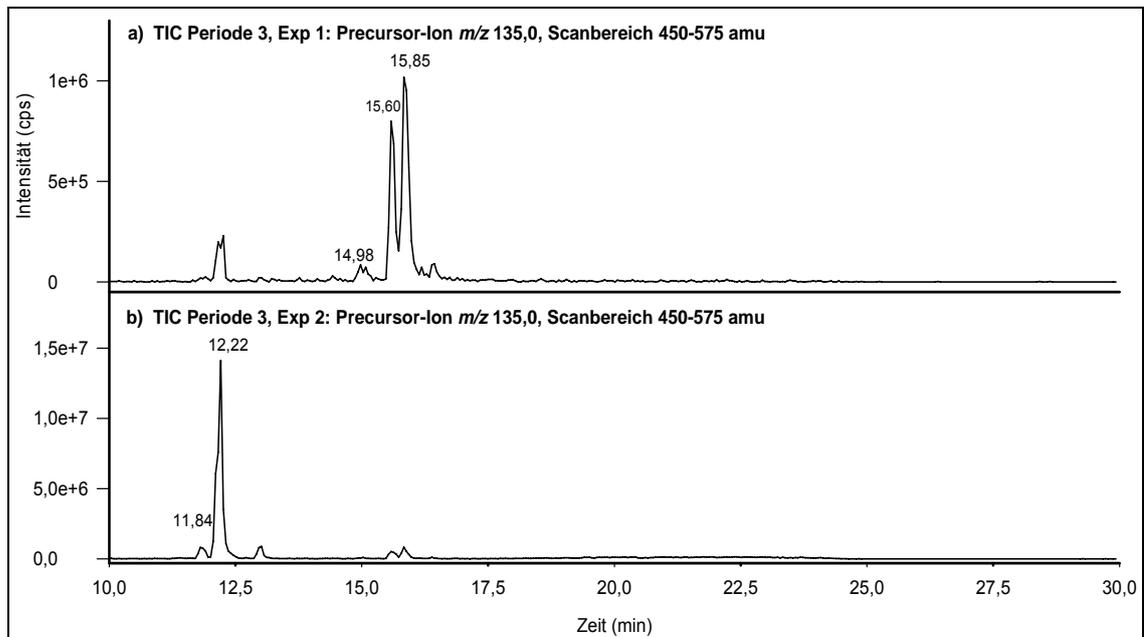


Abb. 41: Precursor-Ionen-Chromatogramm (Periode 3, mit Precursor-Ion  $m/z$  135 eines *Microcystis aeruginosa*-Extraktes: a) Exp. 1 mit Ko-Elution von MC-YR und dmMC-YR bei  $t_R$  14,98 min, MC-LR bei  $t_R$  15,60 min und dmMC-LR bei  $t_R$  15,85 min; b) Exp. 2 mit dmdmMC-RR bei  $t_R$  11,84 min und dmMC-RR bei  $t_R$  12,22 min

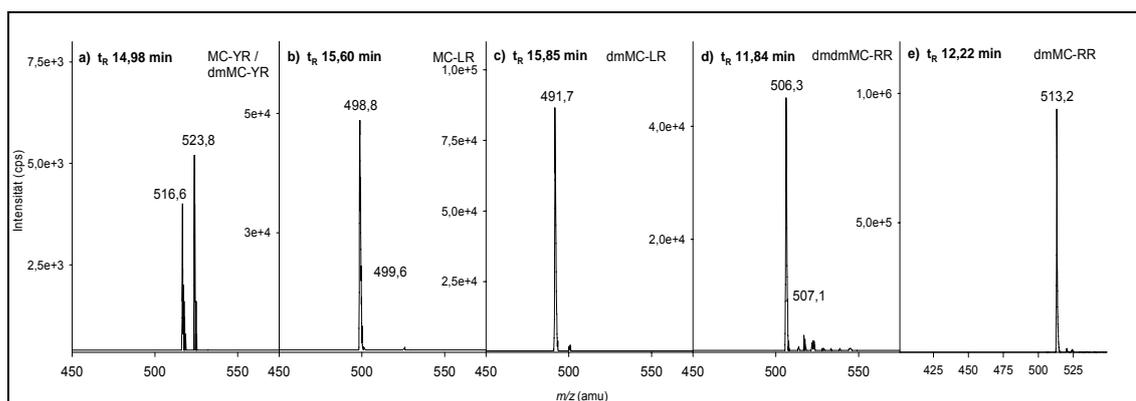


Abb. 42: Precursor-Ionen-Scans eines *Microcystis aeruginosa*-Extraktes mit Precursor-Ion  $m/z$  135, Scan-Bereich  $m/z$  450-575 amu: a) dmMC-YR und MC-YR bei  $t_R$  14,98 min; b) MC-LR bei  $t_R$  15,60 min; c) dmMC-LR bei  $t_R$  15,85 min, d) dmdmMC-RR bei  $t_R$  11,84 min und e) dmMC-RR bei  $t_R$  12,22 min

Die MC-Gehalte betragen: 14,7 µg als Summe von MC-YR und dmMC-YR; 200 µg dmMC-LR; 145,3 µg MC-LR; 66,1 µg dmdmMC-RR und 818 µg dmMC-RR jeweils pro g Trockenmasse. Die Desmethyl-Varianten wurden als Äquivalente der jeweiligen methylierten Form: dmMC-YR als MC-YR-Äquivalent, dmMC-LR als MC-LR-Äquivalent, dmdmMC-RR und dmMC-RR als MC-RR-Äquivalent, quantifiziert.

*Nodularia spumigena*, die einzige Spezies, die zur Bildung von NODs befähigt ist [14, 62, 78, 81, 84, 85], wurde auf den Gehalt an NODs mittels des Precursor-Ionen-Scan-Modus unter Heranziehung von  $m/z$  135 untersucht. Neben dem Hauptpeak bei  $t_R$  14,47, der NOD darstellt (Abb. 43c), waren zwei weitere NOD-Varianten detektierbar. Der Peak bei  $t_R$  13,80 min konnte anhand des Scan-Spektrums (Abb. 43b) als desmethyliertes NOD mit  $m/z$  811,7 als Hauptmasse und entsprechenden Isotopenmassen identifiziert werden. Der Precursor-Ionen-Scan des dritten Peaks bei  $t_R$  15,09 min (Abb. 43d) wies das gleiche Fragmentmuster wie NOD auf, und es könnte sich hierbei um ein NOD-Isomer handeln. Als NOD-Gehalte wurden 4871,6 µg für NOD und 90,6 µg für dmNOD (als NOD-Äquivalent bestimmt) je g Trockenmasse ermittelt.

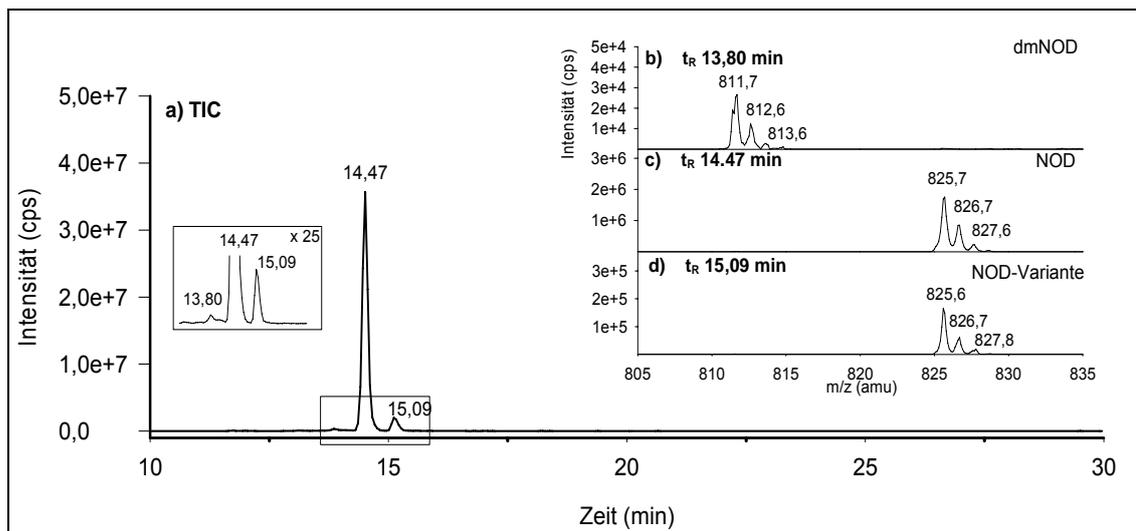


Abb. 43: a) Precursor-Ionen-Chromatogramm (Periode 3, Exp. 4) mit Precursor-Ion  $m/z$  135 eines *Nodularia spumigena* – Extraktes mit dmNOD bei  $t_R$  13,80 min, NOD bei  $t_R$  14,47 min und einer NOD-Variante bei  $t_R$  15,09 min; b) Precursor-Ionen-Scan von dmNOD, c) Precursor-Ionen-Scan von NOD, d) Precursor-Ionen-Scan der NOD-Variante; Scan-Bereich  $m/z$  800-850 amu

#### 4.4.6.2 Qualitative und quantitative Überprüfung

Um die Effizienz der LC-MS/MS-Screening-Methode zu verbessern und dabei insbesondere das Risiko, Toxine nicht zu erfassen, zu minimieren, wurde auf eine umfangreiche Probenaufarbeitung mittels Festphasenextraktion verzichtet. Daher könnten Substanzen aus der Probenmatrix durch Überlagerungen falsch-positive Ergebnisse erzeugen. Folglich sollte bei positiver Detektion eines Toxins dessen Nachweis durch eine zweite analytische Methode zur Identifizierung und Quantifizierung abgesichert werden.

Die PSP-toxinhaltigen Phytoplanktonproben wurden zusätzlich mittels einer HPLC-FLD-Methode nach Diener et al. [186] analysiert. Qualitativ konnte für *Aph. flos-aquae* das Vorkommen der PSP-Toxine STX, NEO, dcSTX und B1 bestätigt werden. Im *Aph. gracile*-Extrakt wurden STX und NEO detektiert, jedoch konnte das Vorkommen von dcSTX nicht bestätigt werden. Eine Quantifizierung der Toxine im Precursor-Ionen-Scan-Modus war aufgrund der Überlagerung mit anderen Matrixbestandteilen nicht möglich gewesen. Auch konnte innerhalb einer Verdünnungsreihe der Extrakte mit Verdünnungsfaktoren von 1, 10 und 100 keine Korrelation der Peakflächen erreicht werden. Daher war ein quantitativer Vergleich der mit beiden Analysenmethoden erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich der PSP-Toxine nicht möglich.

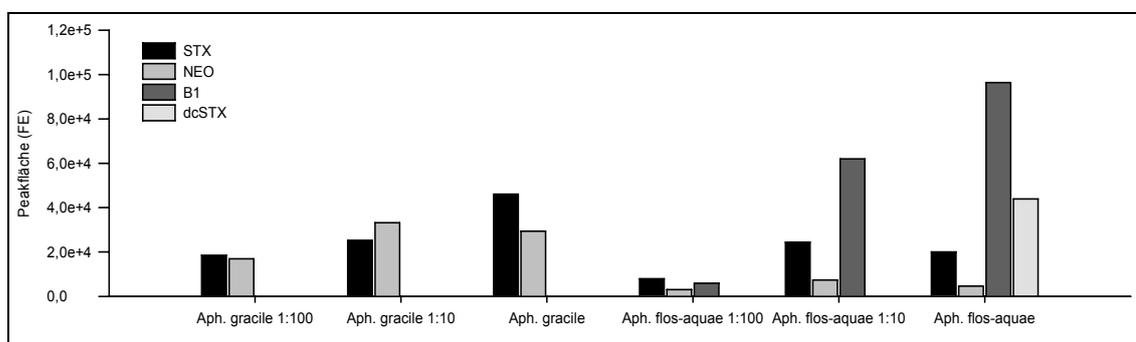


Abb. 44: Peakflächen (FE) von STX, NEO, B1 und dcSTX in Verdünnungsreihen (unverdünnt, 1:10, 1:100) der Extrakte von *Aphanizomenon flos-aquae* und *Aphanizomenon gracile*

Alle anderen Blaualgen-Extrakte wurden mit einer MS/MS-Methode basierend auf den MRM-Modus analysiert (siehe 4.3.3.3) und die ermittelten Toxingehalte mit denen aus dem Scan-Modus verglichen.

Für die ANA-Gehalte wurden 241 µg je g Lyophilisat für *Aphanizomenon issatschenkoi* und 22,6 mg je g Trockenmasse für *Anabaena flos-aquae* mittels  $[\text{ANA} + \text{H}]^+$  ( $m/z$  166) >  $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$  ( $m/z$  91) bestimmt. Die beiden im Precursor-Ionen-Scan-Modus nicht identifizierbaren Peaks des *Aph. issatschenkoi*-Extraktes waren im MRM-Modus nicht nachweisbar, während der HANA-Gehalt im *Oscillatoria*-Extrakt auch nach Detektion im MRM-Modus als ANA-Äquivalent mit 370,3 µg je g Lyophilisat ermittelt wurde. Die untoxischen Abbauprodukte Dihydro-ANA und Dihydro-ANA wurden im MRM-Modus nicht erfasst, da lediglich die Massen der toxischen Substanzen aufgezeichnet wurden, um eine Sensitivitätsminderung für die stark toxischen Strukturvarianten zu vermeiden.

Im *Lyngbya wollei*-Extrakt wurden beide CYN-Strukturen, CYN und DoCYN, jedoch keine PSP-Toxine nachgewiesen. Die Gehalte an CYNs betragen 6,0 µg CYN und 1832,9 µg DoCYN (als CYN-Äquivalent bestimmt) je g Lyophilisat.

Das MC-Muster im *Microcystis aeruginosa*-Extrakt konnte qualitativ bestätigt werden. Lediglich dmMC-YR, das mit Hilfe des Precursor-Ionen-Scans identifiziert wurde, war nicht nachweisbar. Die MC-Gehalte betragen mit 14,7 µg MC-YR; 294 µg dmMC-LR; 150 µg MC-LR; 50,4 µg dmdmMC-RR und 690 µg dmMC-RR je g Lyophilisat, berechnet über die entsprechenden MC-Äquivalente. Zusätzlich wurden geringe Gehalte an MC-RR (6,9 µg je g Trockenmasse) nachgewiesen.

Qualitativ waren im *Nodularia spumigena*-Extrakt bei Detektion im MRM-Modus NOD und dmNOD nachweisbar. Die nach dem Arbeiten im Precursor-Ionen-Scan-Modus vermutete weitere NOD-Variante mit gleichem Fragmentierungsmuster wie NOD aber späterer Elution bei 15,09 min konnte nicht bestätigt werden. Allerdings wurde ein solches NOD-Isomer mit (1000-fach geringerer Intensität als NOD) für eine *Nod. spumigena*-Blüte beschrieben [81]. Die Gehalte an NODs betragen 4774,2 µg NOD und 260,4 µg dmNOD je g Lyophilisat.

Alle für die verschiedenen Strains von cyanobakteriellen Phytoplanktonproben unter Anwendung beider MS-Detektionsmethoden ermittelten Toxin-Gehalte sind in Abb. 45 dargestellt. Die Ergebnisse des Arbeitens im Precursor-Ionen-Scan-Modus wurden willkürlich mit 1,0 festgelegt, und die nach dem MRM-Modus ermittelten Werte wurden zu diesen in Relation gesetzt.

Nur die Gehalte für die ANA- und HANA-Konzentrationen wichen stark voneinander ab, was daran liegen könnte, dass die Analysen im Precursor-Ionen-Scan-Modus weit außerhalb des Kalibrationsbereiches durchgeführt wurden. Für die anderen untersuchten cyanobakteriellen Toxine korrelierten die Gehalte jedoch relativ gut.

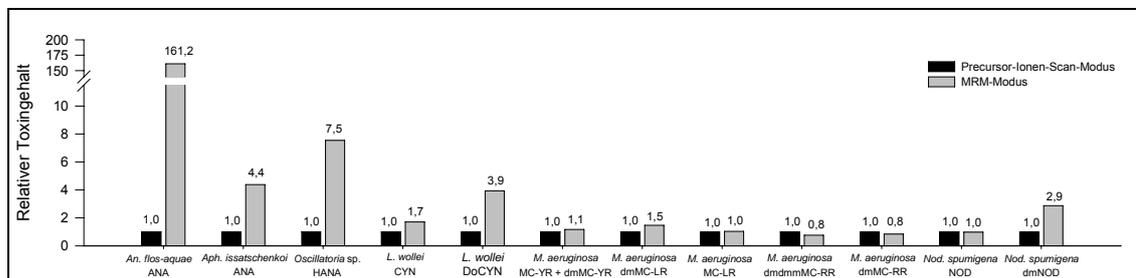


Abb. 45: Vergleich der relativen Toxingehalte, bestimmt im Precursor-Ionen-Scan-Modus und im MRM-Modus

#### 4.4.7 Diskussion

Das Ziel bei der Entwicklung dieser Screening-Methode basierend auf einer LC-MS/MS-Kopplung war die Optimierung der chromatographischen und massenspektrometrischen Bedingungen im Hinblick auf die sensitive und selektive MS-Detektion einer maximalen Anzahl cyanobakterieller Toxine unterschiedlicher Toxingruppen nach nur einem chromatographischen Lauf.

Deshalb erfolgte parallel zur Optimierung des Gradientenprofils das Einrichten von drei Zeitfenstern für die unterschiedlichen Toxingruppen: Periode 1 für die Detektion von PSP-Toxinen und ANAS, Periode 2 für die Erfassung der anderen ANAs und CYNs und Periode 3 für die Detektion von MCs und NODs.

Mit einer Vielzahl von Injektionen während der Entwicklung und Anwendung der Methode wurden stabile Retentionszeiten abgesichert, denn diese sind die Voraussetzung für die Anwendung von Zeitfenstern, die dazu dienen, dass alle Strukturvarianten einer Toxingruppe innerhalb eines engen Elutionsbereiches unter Anwendung optimaler MS-Parameter detektiert werden können.

Während der LC-MS/MS-Analyse natürlich belasteter Proben konnte für eine Reihe cyanobakterieller Toxine nachgewiesen werden, dass strukturell ähnliche Toxine tatsächlich in engen Zeitfenstern eluieren, wodurch die Wahl des Gradientenprofils und die Festsetzung der Zeitfenster bestätigt werden konnten.

Der Precursor-Ionen-Scan-Modus ist dann für eine Erfassung aller einer Toxingruppe zugehörigen Toxine geeignet, wenn alle Strukturvarianten das gleiche charakteristische Massenfragment bilden. Folglich führen Änderungen der chemischen Struktur, die mit der Bildung eines anderen Massenfragmentes verbunden sind dazu, dass die entsprechenden Toxine in diesem Precursor-Ionen-Scan-Modus nicht erfasst werden können.

Innerhalb der bisher beschriebenen ANAs und CYNs bilden alle Analoga die Fragmente  $m/z$  91 bzw.  $m/z$  194. Die Guanidylgruppe innerhalb der CYN-Struktur und die Ringstruktur im ANA-Molekül sind verantwortlich für die Bildung dieser Precursor-Ionen. Allerdings sind chemische Änderungen durch Substitutionen funktioneller Gruppen in den entsprechenden Strukturen möglich, die dann ein anderes Fragment bilden würden.

Innerhalb der MCs und NODs, der umfangreichsten Toxingruppe, sind Strukturen mit Änderungen im Adda-Fragment durch Desmethylierungen und Methylierungen bekannt. Im Gegensatz zu den methylierten Adda-Strukturen, die ebenfalls das Adda-Fragment  $m/z$  135 bilden, führt eine Desmethylierung von Adda in [DMAdda]-Toxinen zur Bildung des DMAdda-Fragmentes mit  $m/z$  121, das mit dem eingesetzten Precursor-Ion  $m/z$  135 nicht detektierbar ist. Hinsichtlich der Toxizität von MCs mit Änderungen innerhalb der Adda-Struktur ist bekannt, dass eine Substitution der Methoxygruppe durch eine Acetoxygruppe zu einer verminderten toxischen Wirkung führt, so dass eine nicht erfolgte Detektion dieser Toxine einen relativ geringen Einfluss auf die Einschätzung der Gesamtoxizität einer Phytoplanktonprobe hat.

Die Scan-Bereiche im Precursor-Ionen-Scan-Modus deckten die  $m/z$  aller Toxingruppen und damit auch deren Strukturvarianten ab. Somit erlaubt das Arbeiten im Precursor-Ionen-Scan-Modus für ANAs, CYNs, MCs und NODs im Gegensatz zum MRM-Modus die Detektion einer Reihe „seltener“ Toxinvarianten, bei denen funktionelle Gruppen oder Aminosäuren im Toxinmolekül substituiert und / oder variiert wurden.

Bei den analysierten Extrakten von Cyanobakterien wurde durch die Precursor-Ionen eine Vielzahl cyanobakterieller Toxine simultan erfasst. Bei den ANAs wurde bei *Oscillatoria* sp. HANA neben einigen Abbauprodukten der ANAs und innerhalb der CYNs wurde bei *Lyngbya wollei* DoCYN neben CYN detektiert. Die Analyse eines *Nodularia spumigena*-Extraktes ergab die Anwesenheit von NOD neben dmNOD. Ein *Microcystis aeruginosa*-Extrakt wies ein MC-Profil bestehend aus Desmethyl-Varianten dmMC-YR, dmMC-LR und dmdmMC-RR sowie MC-RR, MC-YR und MC-LR auf.

Um diese Ergebnisse mittels MRM-Modus zu erhalten, müsste eine Vielzahl an Massenübergängen gemessen werden, was zu einem Sensitivitätsverlust führen würde, besonders dann, wenn es sich um Phytoplanktonproben unbekannter Zusammensetzung handelt. In solchen Fällen können auch keine Aussagen bzgl. der zu erwartenden Toxine gemacht werden. Erschwerend kommt bei einer Prüfung auf alle Toxingruppen unter Anwendung des MRM-Modus hinzu, dass unbekannte Strukturvarianten schwierig zu detektieren sind, da hiermit nur bekannte Massen erfasst werden.

Die Sensitivität der Precursor-Ionen-Scan-Methode liegt für die Bestimmung der cyanobakteriellen Toxine bei den gewählten MS-Parametern im pg-Bereich mit Nachweisgrenzen zwischen 15 und 100 pg MCs, 6 pg NOD, 9 pg CYN und 300 pg ANA je Injektion.

Die Notwendigkeit milderer Fragmentierungsbedingungen, die während der Methodenentwicklung anhand des Standards für MC-RR festgestellt wurde, konnten bei Analysen von *M. aeruginosa*-Proben bestätigt werden, denn die darin enthaltenen MCs mit zwei Arg-Resten (dmdmMC-RR und dmMC-RR) konnten nur in Experiment 2 und nicht in Experiment 1 innerhalb des dritten Zeitfensters eindeutig nachgewiesen werden.

Obwohl beide Analysenexperimente mit dem Precursor-Ion  $m/z$  135 durchgeführt wurden, ist zu beachten, dass MC-RR nicht unter den gleichen Bedingungen wie MC-LR und MC-YR detektierbar war. Offensichtlich verlangt der MS/MS-Nachweis von MC-RR im Vergleich zu MC-LR und MC-YR weichere Fragmentierungsbedingungen, d. h. niedrigere CE- und DP-Werte.

Alle Proben wurden zusätzlich zum Precursor-Ionen-Scan-Modus im MRM-Modus analysiert. Danach wurden die Ergebnisse mit denen im Precursor-Ionen-Scan-Modus erhaltenen verglichen. Die Toxingehalte korrelierten mit Ausnahme der ANAs relativ gut, so dass die Precursor-Ionen-Scan-Methode in diesem Fall nicht nur qualitative sondern auch quantitative Aussagen zulässt.

Da die PSP-Toxine nicht im Precursor-Ionen-Scan-Modus erfasst werden können, erfolgte ihre Analyse im MRM-Modus. Allerdings wurden für die von *Lyngbya wollei* gebildeten PSP-Toxinvarianten LWTX1-6 [87] keine MS/MS-Messungen veröffentlicht. Zwar könnte man aufgrund der charakteristischen Fragmentierungen der anderen PSP-Strukturen mit Abspaltungen von Wasser, Ammoniak und von Substituenten am R4 Tochterfragmente berechnen, jedoch wäre das gegenwärtig rein spekulativ. Aus diesem Grund wurde vorerst auf die MS/MS-Erfassung der Toxine LWTX1-6 verzichtet.

Bei einer Vereinfachung der Probenaufarbeitung (speziell für PSP-Toxine) ist es leider nicht auszuschließen, dass bei der nachfolgenden MS-Bestimmung Interferenzen durch Matrixbestandteile auftreten, wodurch es zu falsch-positiven Ergebnissen kommen kann. So musste im Fall von *Aphanizomenon gracile* der im MRM-Modus geführte Nachweis der Anwesenheit des PSP-Toxins dcSTX nach einer Wiederholung der PSP-Toxin-Bestimmung mit einem HPLC-FLD-Verfahren revidiert werden.

Auch konnte aus Mangel an Biomasse keine mit C-Toxinen kontaminierte Algenprobe analysiert werden, jedoch hätte diese PSP-Toxin-Analyse aufgrund der zweifach positiven Ladung der C-Toxine eine zusätzliche Optimierung der HPLC- und MS-Bedingungen erfordert.

Hingegen ermöglichte eine persönliche Mitteilung von Prof. E. Pinto zum Fragmentierungsschema von ANAS erstmals deren MS/MS-Detektion im MRM-Modus. Die Elutionseigenschaft von ANAS mit einer Retentionszeit im Bereich der PSP-Toxine erforderte lediglich ein zusätzliches MRM-Experiment innerhalb des ersten Zeitfensters.

Besonders wegen der beobachteten falsch-positiven Ergebnisse bei Einsatz der neuen LC-MS/MS-basierten Screening-Methode zur simultanen Erfassung cyanobakterieller Toxine sollte diese nicht ausschließlich eingesetzt werden, sondern bei positiven Ergebnissen sollte auf speziellere (und für die jeweilige Toxingruppe bereits validierte) Analysemethoden zurückgegriffen werden. Auch ist für die Erfassung der Toxingruppen (außer PSP-Toxinen) eine Beibehaltung der chromatographischen Bedingungen mit anschließender Detektion im MRM-Modus mit bereits beschriebenen Massenübergängen denkbar (siehe z. B. für ANAs bei Furey et al. [171] oder Bogialli et al. [172], für CYN und DoCYN bei Eaglesham et al. [173], für MCs bei Dahlmann et al. [205] oder Hummert et al. [200] und für NODs bei Mazur-Marzec et al. [81]).

Hinsichtlich der Detektion von ANA besteht aufgrund der Möglichkeit des Vorkommens von Phenylalanin mit gleichem Fragmentierungsmuster das Risiko falsch-positiver Ergebnisse. Daher müssen ANA-positive Ergebnisse ebenfalls abgesichert oder die Retention von Phenylalanin unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen überprüft werden.

Die Precursor-Ionen-Scan-Methode ermöglicht die Erfassung noch nicht beschriebener und relativ seltener Toxinvarianten neben häufig vorkommenden und gut untersuchten cyanobakteriellen Toxinen. Die hier vorgestellte breit angelegte MS/MS-Methode ist besonders für die schnelle Ermittlung des Toxinprofils mutmaßlich toxischer Phytoplanktonproben unbekannter Spezieszusammensetzung geeignet. Auch ermöglicht die Methodik eine schnelle Erfassung cyanobakterieller Toxine aus Wasser, Plankton und Nahrungsergänzungsmitteln.

## 5 Zusammenfassung

Das zunehmende Auftreten von Cyanobakterien, auch als Blaualgen bezeichnet, sowohl in Binnengewässern als auch im Brackwasser durch die globale Erwärmung ist ein weltweit beobachtetes Phänomen. Diese Massenvermehrungen sind mit der Bildung cyanobakterieller Toxine und deren Eintrag in Nahrungsketten verbunden, und sie haben häufig Intoxikationen (vor allem bei Weidevieh aber auch beim Menschen) zur Folge.

Bisher wurden über 100 verschiedene Strukturvarianten cyanobakterieller Toxine beschrieben, wobei die jeweiligen Toxine aufgrund ihrer Wirkungsweise in verschiedene Gruppen eingeteilt wurden: 1) die neurotoxisch wirksamen Paralytic Shellfish Poisoning-Toxine (PSP-Toxine), Anatoxine (ANAs) und Anatoxin-a(s) (ANAS), 2) die cyto- und hepatotoxischen Cylindrospermopsine (CYNs) und 3) die hepatotoxisch wirksamen Nodularine (NODs) und Microcystine (MCs).

Die chemischen Strukturen sind Ursache für sehr unterschiedliche Wirkmechanismen der Toxine; z. B. als Acetylcholinagonisten (ANAs), Inhibitoren der Acetylcholinesterase (ANAS), Inhibitoren von Na<sup>+</sup>-Kanälen (PSP-Toxine), Inhibitoren der Protein- und Glutathionsynthese (CYNs) sowie als Inhibitoren der Proteinphosphatasen (PP) 1 und 2A. Dabei weisen PSP-Toxine, ANAs und CYNs eine Alkaloid-Struktur auf, ANAS ist ein Guanidin-Derivat, während NODs und MCs zyklische Penta- und Heptapeptide darstellen.

Die Strukturvarianten innerhalb der einzelnen Toxingruppen weisen je nach der Anwesenheit bestimmter funktioneller Gruppen unterschiedliche Toxizitäten gemessen als intraperitoneale letale Dosen (LD<sub>50</sub>, i. p.) im Tierversuch (z. B. Maustest) auf.

Grenz- oder Richtwerte hinsichtlich einer Kontamination von Lebensmitteln, Nahrungsergänzungsmitteln und Badegewässern mit cyanobakteriellen Toxinen wurden festgelegt, wobei zum Schutz vor einer Gefährdung der Gesundheit deren Einhaltung kontrolliert werden muss. Hierfür war die Etablierung leistungsfähiger analytischer Verfahren zur eindeutigen und empfindlichen Bestimmung vor allem der rechtlich relevanten cyanobakteriellen Toxine unumgänglich notwendig geworden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die bestehende Norm ISO 20179, die eine Erfassung der MCs MC-RR, MC-LR und MC-YR zur Kontrolle der Einhaltung des WHO-Richtwertes von 1,0 Mikrogramm MC-LR je Liter Trinkwasser über eine UV-Detektion nach HPLC-Trennung beschreibt, hinsichtlich falsch-positiver und falsch-negativer Ergebnisse mit Hilfe der Massenspektrometrie überprüft werden, wobei ein LC-MS-System einzusetzen war.

Außerdem sollte - ausgehend von zwei publizierten LC-MS-Methoden zur simultanen Bestimmung cyanobakterieller Toxine unterschiedlicher Struktur - eine optimierte Analysenmethode im SIM-Modus entwickelt werden.

Da eine gemeinsame Extraktion der unterschiedlich polaren cyanobakteriellen Toxine aus verschiedenen Matrices die Voraussetzung für ihre nachfolgende massenspektrometrische Erfassung nach ihrer chromatographischen Trennung (sog. Multikomponenten-Methode bzw. *packaging method*) darstellt, sollte diese Extraktion optimiert werden.

Außerdem war eine LC-MS/MS-Methode zu entwickeln, mit der nicht nur charakteristische Vertreter der Toxingruppen sondern auch möglichst viele Strukturvarianten innerhalb der cyanobakteriellen Toxine nach nur einem chromatographischen Lauf erfasst werden können.

Im Rahmen von Routine-Untersuchungen wurde Phytoplankton aus dem Senftenberger See auf das Vorhandensein cyanobakterieller Toxine zunächst unter Einsatz des HPLC-UV-Verfahrens gemäß der Norm ISO 20179 untersucht, wobei MC-LR, MC-RR sowie MC-YR anhand von Standardsubstanzen detektiert werden konnten, jedoch ergaben hier die LC-MS-Bestimmungen zur Absicherung des Befundes deutlich geringere MC-Gehalte. Allerdings wurden desmethylierte Strukturvarianten dieser rechtlich relevanten MCs nachgewiesen, und es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass unter den vorgeschriebenen HPLC-Bedingungen wegen der weitgehenden strukturellen Gemeinsamkeiten MCs und ihre jeweiligen Desmethyl-Varianten gleichzeitig eluieren.

Unter den chromatographischen Bedingungen der ISO-Norm erfolgt eine Ko-Elution von MC-RR und einer dmMC-RR-Variante sowie von MC-LR und einer dmMC-LR-Variante, die bei einer UV-Detektion gemeinsam als MC-RR bzw. MC-LR erfasst werden.

Da sich die Toxizitäten der methylierten und desmethylierten MC-Varianten unterscheiden, kann es im Fall der MC-LR-Strukturen durch einen höheren LD<sub>50</sub>-Wert (i. p., Maus) der dmMC-LR-Varianten gegenüber MC-LR zu falsch-positiven Ergebnissen, innerhalb der MC-RR-Toxine durch einen geringeren LD<sub>50</sub>-Wert der dmMC-RR-Varianten zu falsch-negativen Ergebnissen kommen. Daher ist die internationale Norm ISO 20179 zur Erfassung von MCs aus Trinkwasser nur ungenügend zur Kontrolle der Einhaltung des WHO-Richtwertes für MCs geeignet, so dass positive Ergebnisse zur eindeutigen Identifizierung und exakten Quantifizierung der Toxine unbedingt durch MS-Messungen abgesichert werden sollten. Allerdings müssen dabei die chromatographischen Bedingungen so verändert werden, dass eine ausreichende Empfindlichkeit bei der MS-Detektion resultiert.

Um die chromatographische Trennung unterschiedlicher Toxingruppen vor der MS-Detektion zu erreichen, wurden verschiedene HPLC-Säulen sowie MS-geeignete Eluenten unterschiedlicher Polarität getestet. Es konnte gezeigt werden, dass die PSP-Toxine bei Einsatz von C18-Material als stationäre Phase ohne Zusatz von Ionenpaarbildnern keine Retention ( $t_R$  2 min) und damit auch keine Trennung aufweisen. Somit erwies sich eine C18-Phase zur Trennung der Toxine mit Alkaloidstruktur ohne den Einsatz von Ionenpaarreagenzien als ungeeignet. Durch den Zusatz von Heptafluorbuttersäure (HFBA) als Ionenpaarreagenz konnten für die PSP-Toxine zwar Retentionszeiten von 5-7 min erreicht werden, jedoch wurde keine oder nur eine unzureichende Separation der einzelnen Strukturvarianten bewirkt. Außerdem geht der Einsatz von HFBA mit einem hohen Sensitivitätsverlust bei der MS-Detektion einher.

Für eine gemeinsame Extraktion von PSP-Toxinen, MCs und NOD aus lyophilisiertem Phytoplankton wurde als Extraktionsmittel ein Gemisch aus Methanol / 0,1 M Essigsäurelösung in verschiedenen Volumenanteilen (1:3, 1:1, 3:1) getestet. Die höchsten Extraktionsausbeuten für die Toxine mit Peptidstruktur (MCs / NOD) konnten mit 50 % und 75 % Methanol-Anteil und für die PSP-Toxine mit 25 % und 50 % Methanol erreicht werden.

Somit stellt ein Methanol/Essigsäure-Gemisch mit gleichen Anteilen an beiden Komponenten ein optimales Extraktionsmittel für die im Mittelpunkt der

Untersuchungen stehenden cyanobakteriellen Toxine dar und in der Folgezeit wurde ausschließlich dieses Extraktionsmittel bei der Aufarbeitung von gefriergetrocknetem Blaualgenmaterial eingesetzt. Eine Ein-Schritt-Extraktion hatte eine Extraktionsausbeute von 77-90 % der Toxine zur Folge, die bei wiederholter Extraktion auf 94-100 % gesteigert werden konnte. Die Effizienz des Methanol-Essigsäure-Gemisches zur Extraktion von CYNs und ANAs konnte jedoch durch Mangel natürlicher mit diesen Toxinen kontaminierter Proben nicht untersucht werden.

Um möglichst viele Toxine unterschiedlicher Struktur in nur einem analytischen Lauf qualitativ zu erfassen, wurde eine LC-MS/MS-Methode mit vorwiegender Detektion im Precursor-Ionen-Scan-Modus entwickelt. Die Vorteile des Arbeitens in diesem MS-Modus speziell bei der Erfassung einer hohen Anzahl verschiedener Strukturen geht jedoch mit einer verringerten Sensitivität im Vergleich zum MRM-Modus einher.

ANAs, CYNs, MCs und NODs verfügen jeweils über ein charakteristisches Tochterfragment, das zur Selektion im Precursor-Ionen-Scan-Modus herangezogen werden kann. Hingegen müssen die PSP-Toxine und ANAS im MRM-Modus bestimmt werden.

Das chromatographische Ziel der MS/MS-Screening-Methode bestand in einer Gruppentrennung der cyanobakteriellen Toxine, wobei innerhalb der jeweiligen Gruppe die Elution der verschiedenen Toxine in einem engen Bereich erfolgen sollte. Hierzu wurde ein Gradientenprofil erstellt, und es wurden drei Zeitfenster zur Erfassung der Toxine mit unterschiedlichen Detektionsmodi und MS-Parametern eingerichtet. Die erste Analysenperiode (Zeitfenster 1) dient der Erfassung von PSP-Toxinen und ANAS, die zweite (Zeitfenster 2) der Detektion von ANAs und CYNs sowie die dritte (Zeitfenster 3) der Bestimmung von MCs und NODs. Hierbei wurden folgende Precursor-Ionen eingesetzt:  $m/z$  91 für ANAs,  $m/z$  194 für CYNs,  $m/z$  135 für MCs und NODs. Alle bisher beschriebenen ANAs- und CYNs-Analoga bilden ausnahmslos diese Fragmente, jedoch könnten strukturelle Änderungen in den Toxinen die Bildung anderer Tochterionen bewirken. Innerhalb der MCs und NODs, der umfangreichsten Toxingruppe, sind z. B. [DMAdda]-Strukturen bekannt, die im Gegensatz zum Adda-Fragment ( $m/z$  135) das DMAdda-Fragment mit  $m/z$  121 bilden und somit im Precursor-Ionen-Scan-Modus nicht erfasst werden.

Die Scan-Bereiche im Precursor-Ionen-Scan-Modus deckten die  $m/z$  aller Toxingruppen und damit auch deren Strukturvarianten ab. Somit erlaubt der Precursor-Ionen-Scan-Modus für ANAs, CYNs, MCs und NODs im Gegensatz zum MRM-Modus die Detektion einer Reihe struktureller Varianten sowie den Nachweis der Substitution funktioneller Gruppen und von Veränderungen an den Aminosäuren im Toxinmolekül.

Die Sensitivität der neuen LC-MS/MS-Methode im Precursor-Ionen-Scan-Modus zur Erfassung cyanobakterieller Toxine lag im pg-Bereich. Die mittels Precursor-Ionen-Scan-Modus erhaltenen Ergebnisse wurden mittels MRM-Methode oder bei den PSP-Toxinen durch Fluoreszenzdetektion nach HPLC-Trennung überprüft. Mit Ausnahme der PSP-Toxine (für die bei der Detektion falsch-positive Ergebnisse auf Grund von Interferenzen von Substanzen aus der Probenmatrix zu verzeichnen waren) wurden gut korrelierende Ergebnisse erhalten.

Folglich ermöglicht die Precursor-Ionen-Scan-Methode die Erfassung einer Reihe ungewöhnlicher, d. h. seltener Strukturvarianten cyanobakterieller Toxine neben häufig vorkommenden, und damit gelingt die schnelle Einschätzung des toxischen Potenzials von Phytoplanktonproben unbekannter Spezieszusammensetzung.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Norm ISO 20179 zur Kontrolle der Einhaltung des WHO-Richtwertes bzgl. der Belastung von Trinkwasser mit Microcystinen nur unzureichend geeignet ist. Auch ist die empfindliche Bestimmung von PSP-Toxinen mit einer C18-Säule ohne Zusatz von Ionenpaarbildnern, der wiederum einen negativen Einfluss auf die Nachweisempfindlichkeit hat, nicht möglich. Hinsichtlich der gemeinsamen Extraktion für strukturell unterschiedliche cyanobakterielle Toxine wurden mit gleichen Volumenanteilen Methanol und 0,1 M Essigsäurelösung die höchsten Extraktionsausbeuten erreicht. Obwohl die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Precursor-Ionen-Scan-Methode andere selektive und dabei sensitivere Analysemethoden nicht vollständig ersetzen kann, gelingt damit dennoch die eindeutige Erfassung einer Vielzahl cyanobakterieller Toxine in nur einem analytischen Lauf.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Zurawell RW, Chen HR, Burke JM, and Prepas EE, Hepatotoxic cyanobacteria: A review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews*, 2005. **8**(1): S. 1-37.
2. Chorus I, Algal metabolites and water quality: toxins, allergens, and taste-and-odorsubstances. *Memorie - International Journal of Limnology*, 1993. **52**: S. 257-280.
3. Byth S, Palm Island Mystery Disease. *Medical Journal of Australia*, 1980. **2**(1): S. 40-42.
4. Francis G, Poisonous Australian lake. *Nature*, 1878. **18**: S. 11-12.
5. Gussmann HJ, Molzahn J, and Bicks B, Poisoning of Young Cattle by *Nodularia-Spumigena*. *Monatshfte Fur Veterinarmedizin*, 1985. **40**(3): S. 76-79.
6. Jochimsen EM, Carmichael WW, An JS, Cardo DM, Cookson ST, Holmes CEM, Antunes MBD, de Melo DA, Lyra TM, Barreto VST, Azevedo S, and Jarvis WR, Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine*, 1998. **338**(13): S. 873-878.
7. Kalbe L, Duty J, Heise H, Putzke H-P, Schulz E, and Tiess D, Zu einer Blaualgen-Wasserblüte (*Nodularia*) der Ostsee im August 1974. *Zeitschrift der gesamten Hygiene und Grenzgebiete*, 1976. **22**: S. 250-255.
8. Kalbe L and Tiess D, Entenmassensterben durch *Nodularia* - Wasserblüte am Kleinen Jasmunder Bodden auf Rügen. *Archiv für Experimentelle Veterinarmedizin*, 1964. **18**: S. 535-555.
9. Teixeira M, Costa M, Carvalho V, Pereira M, and Hage E, Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organisation*, 1993. **27**: S. 244-253.
10. Turner PC, Gammie AJ, Hollinrake K, and Codd GA, Pneumonia Associated with Contact with Cyanobacteria. *British Medical Journal*, 1990. **300**(6737): S. 1440-1441.
11. Bumke-Vogt C, Mailahn W, and Chorus I, Anatoxin-a and neurotoxic cyanobacteria in German lakes and reservoirs. *Environmental Toxicology*, 1999. **14**(1): S. 117-125.
12. Edwards C, Beattie KA, Scrimgeour CM, and Codd GA, Identification of Anatoxin-a in Benthic Cyanobacteria (Blue-Green-Algae) and in Associated Dog Poisonings at Loch Insh, Scotland. *Toxicon*, 1992. **30**(10): S. 1165-1175.
13. Carmichael WW, Cyanobacteria Secondary Metabolites - the Cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, 1992. **72**(6): S. 445-459.
14. Sivonen K, Himberg K, Luukkainen R, Niemelä SI, Poon GK, and Codd GA, Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacteria blooms and strains from Finland. *Toxicity Assessment*, 1989. **4**: S. 339-352.
15. Devlin JP, Edwards OE, Gorham PR, Hunter NR, Pike RK, and Stavric B, Anatoxin-a, a Toxic Alkaloid from *Anabaena-Flos-Aquae* Nrc-44h. *Canadian Journal of Chemistry- Revue Canadienne De Chimie*, 1977. **55**(8): S. 1367-1371.
16. Gugger M, Lenoir S, Berger C, Ledreux A, Druart JC, Humbert JF, Guette C, and Bernard C, First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon*, 2005. **45**(7): S. 919-928.
17. Park H-D, Watanabe MF, Harada K-I, Nagai H, Suzuki M, Watanabe M, and Hayashi H, Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters. *Natural Toxins*, 1993. **1**(6): S. 353-360.
18. Namikoshi M, Murakami T, Watanabe MF, Oda T, Yamada J, Tsujimura S, Nagai H, and Oishi S, Simultaneous production of homoanatoxin-a, antitoxin-a, and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. *Toxicon*, 2003. **42**(5): S. 533-538.

19. Ballot A, Krienitz L, Kotut K, Wiegand C, and Pflugmacher S, Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in the alkaline crater Lakes Sonachi and Simbi, Kenya. *Harmful Algae*, 2005. **4**(1): S. 139-150.
20. Selwood AI, Holland PT, Wood SA, Smith KF, and McNabb PS, Production of anatoxin-a and a novel biosynthetic precursor by the cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi*. *Environmental Science & Technology*, 2007. **41**(2): S. 506-510.
21. Carmichael W and Gorham P. Anatoxins from Clones of *Anabaena Flos-Aquae* Isolated from Lakes of Western Canada in *Symposium: Experimental Use of Algal Culture in Limnology 26-28 October 1976*, . 1978. Sandefjord, Norway: Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie.
22. Carmichael WW and Biggs DF, Muscle Sensitivity Differences in 2 Avian Species to Anatoxin-Alpha Produced by Freshwater Cyanophyte *Anabaena-Flos-Aquae* Nrc-44-1. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie*, 1978. **56**(3): S. 510-512.
23. Kluge S and Szinicz L, Acute Exposure Guideline levels (AEGLs), toxicity and properties of selected chemical and biological agents. *Toxicology*, 2005. **214**(3): S. 268-270.
24. Skulberg OM, Carmichael WW, Andersen RA, Matsunaga S, Moore RE, and Skulberg R, Investigations of a Neurotoxic Oscillatorial Strain (Cyanophyceae) and Its Toxin - Isolation and Characterization of Homoanatoxin-A. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1992. **11**(3): S. 321-329.
25. Matsunaga S, Moore RE, Niemczura WP, and Carmichael WW, Anatoxin-a(S), a Potent Anticholinesterase from *Anabaena-Flos-Aquae*. *Journal of the American Chemical Society*, 1989. **111**(20): S. 8021-8023.
26. Mahmood NA and Carmichael WW, Anatoxin-a(S), an Anticholinesterase from the Cyanobacterium *Anabaena-Flos-Aquae* Nrc-525-17. *Toxicon*, 1987. **25**(11): S. 1221-1227.
27. Onodera H, Oshima Y, Henriksen P, and Yasumoto T, Confirmation of anatoxin-a(s), in the cyanobacterium *Anabaena lemmermannii*, as the cause of bird kills in Danish lakes. *Toxicon*, 1997. **35**(11): S. 1645-1648.
28. Henriksen P, Carmichael WW, An JS, and Moestrup O, Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of Cyanobacteria/blue-green algae from Danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds. *Toxicon*, 1997. **35**(6): S. 901-913.
29. Carmichael WW, Mahmood NA, and Hyde EG, Natural Toxins from Cyanobacteria (Blue-Green-Algae). *Acs Symposium Series*, 1990. **418**: S. 87-106.
30. Hawkins PR, Runnegar MTC, Jackson ARB, and Falconer IR, Severe Hepatotoxicity Caused by the Tropical Cyanobacterium (Blue-Green-Alga) *Cylindrospermopsis Raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju Isolated from a Domestic Water-Supply Reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985. **50**(5): S. 1292-1295.
31. Li R, Carmichael WW, Brittain S, Eaglesham GK, Shaw GR, Mahakhant A, Noparatnaraporn N, Yongmanitchai W, Kaya K, and Watanabe MM, Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Toxicon*, 2001. **39**(7): S. 973-980.
32. Harada K, Ohtani I, Iwamoto K, Suzuki M, Watanabe MF, Watanabe M, and Terao K, Isolation of Cylindrospermopsin from a Cyanobacterium *Umezakia Natans* and Its Screening Method. *Toxicon*, 1994. **32**(1): S. 73-84.
33. Preussel K, Stuken A, Wiedner C, Chorus I, and Fastner J, First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon*, 2006. **47**(2): S. 156-162.
34. Banker R, Carmeli S, Hadas O, Teltsch B, Porat R, and Sukenik A, Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. *Journal of Phycology*, 1997. **33**(4): S. 613-616.

35. Banker R, Carmeli S, Werman M, Teltsch B, Porat R, and Sukenik A, Uracil moiety is required for toxicity of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*, 2001. **62**(4): S. 281-288.
36. Schembri MA, Neilan BA, and Saint CP, Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology*, 2001. **16**(5): S. 413-421.
37. Li RH, Carmichael WW, Brittain S, Eaglesham GK, Shaw GR, Liu YD, and Watanabe MM, First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology*, 2001. **37**(6): S. 1121-1126.
38. Seifert M, McGregor G, Eaglesham G, Wickramasinghe W, and Shaw G, First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck. *Harmful Algae*, 2007. **6**: S. 73-80.
39. Spoo L, Berg KA, Rapala J, Lahti K, Lepisto L, Metcalf JS, Codd GA, and Meriluoto J, First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). *Environmental Toxicology*, 2006. **21**(6): S. 552-560.
40. Ohtani I, Moore RE, and Runnegar MTC, Cylindrospermopsin - a Potent Hepatotoxin from the Blue-Green-Alga *Cylindrospermopsis-Raciborskii*. *Journal of the American Chemical Society*, 1992. **114**(20): S. 7941-7942.
41. Diehnelt CW, Dugan NR, Peterman SM, and Budde WL, Identification of microcystin toxins from a strain of *Microcystis aeruginosa* by liquid chromatography introduction into a hybrid linear ion trap-fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, 2006. **78**(2): S. 501-512.
42. Botes DP, Tuinman AA, Wessels PL, Viljoen CC, Kruger H, Williams DH, Santikarn S, Smith RJ, and Hammond SJ, The Structure of Cyanoginosin-La, a Cyclic Heptapeptide Toxin from the Cyanobacterium *Microcystis-Aeruginosa*. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*, 1984(10): S. 2311-2318.
43. Kaya K and Watanabe MM, Microcystin composition of an axenic clonal strain of *Microcystis viridis* and *Microcystis viridis*-containing waterblooms in Japanese freshwaters *Journal of Applied Phycology* 1990. **2**(2): S. 173-178.
44. Sivonen K and Jones G, Cyanobacterial Toxins, in *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*, Chorus I and Bartram J, Editors. 1999, E & FN Spon: London, New York. S. 416.
45. Gathercole PS and Thiel PG, Liquid-Chromatographic Determination of the Cyanoginosins, Toxins Produced by the Cyanobacterium *Microcystis-Aeruginosa*. *Journal of Chromatography*, 1987. **408**: S. 435-440.
46. Craig M, McCready TL, Luu HA, Smillie MA, Dubord P, and Holmes CFB, Identification and Characterization of Hydrophobic Microcystins in Canadian Fresh-Water Cyanobacteria. *Toxicon*, 1993. **31**(12): S. 1541-1549.
47. Namikoshi M, Rinehart KL, Sakai R, Stotts RR, Dahlem AM, Beasley VR, Carmichael WW, and Evans WR, Identification of 12 Hepatotoxins from a Homer Lake Bloom of the Cyanobacteria *Microcystis-Aeruginosa*, *Microcystis-Viridis*, and *Microcystis-Wesenbergii* - 9 New Microcystins. *Journal of Organic Chemistry*, 1992. **57**(3): S. 866-872.
48. Harada K, Ogawa K, Matsuura K, Nagai H, Murata H, Suzuki M, Itezono Y, Nakayama N, Shirai M, and Nakano M, Isolation of 2 Toxic Heptapeptide Microcystins from an Axenic Strain of *Microcystis-Aeruginosa*, K-139. *Toxicon*, 1991. **29**(4-5): S. 479-489.
49. Sivonen K, Namikoshi M, Evans WR, Carmichael WW, Sun F, Rouhiainen L, Luukkainen R, and Rinehart KL, Isolation and Characterization of a Variety of Microcystins from 7 Strains of the Cyanobacterial Genus *Anabaena*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992. **58**(8): S. 2495-2500.
50. Namikoshi M, Yuan M, Sivonen K, Carmichael WW, Rinehart KL, Rouhiainen L, Sun F, Brittain S, and Otsuki A, Seven new microcystins possessing two L-glutamic acid units,

- isolated from *Anabaena* sp. strain 186. *Chemical Research in Toxicology*, 1998. **11**(2): S. 143-149.
51. Bateman KP, Thibault P, Douglas DJ, and White RL, Mass-Spectral Analyses of Microcystins from Toxic Cyanobacteria Using Online Chromatographic and Electrophoretic Separations. *Journal of Chromatography A*, 1995. **712**(1): S. 253-268.
  52. Krishnamurthy T, Szafraniec L, Hunt DF, Shabanowitz J, Yates JR, Hauer CR, Carmichael WW, Skulberg O, Codd GA, and Missler S, Structural Characterization of Toxic Cyclic-Peptides from Blue-Green-Algae by Tandem Mass-Spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989. **86**(3): S. 770-774.
  53. Cremer J and Henning K, Application of Reversed-Phase Medium-Pressure Liquid-Chromatography to the Isolation, Separation and Amino-Acid-Analysis of 2 Closely Related Peptide Toxins of the Cyanobacterium *Microcystis-Aeruginosa* Strain Pcc-7806. *Journal of Chromatography*, 1991. **587**(1): S. 71-80.
  54. Harada K, Matsuura K, Suzuki M, Watanabe MF, Oishi S, Dahlem AM, Beasley VR, and Carmichael WW, Isolation and Characterization of the Minor Components Associated with Microcystins Lr and Rr in the Cyanobacterium (Blue-Green-Algae). *Toxicon*, 1990. **28**(1): S. 55-64.
  55. Luukkainen R, Sivonen K, Namikoshi M, Fardig M, Rinehart KL, and Niemela SI, Isolation and Identification of 8 Microcystins from 13 *Oscillatoria-Agardhii* Strains and Structure of a New Microcystin. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993. **59**(7): S. 2204-2209.
  56. Sivonen K, Skulberg OM, Namikoshi M, Evans WR, Carmichael WW, and Rinehart KL, 2 Methyl-Ester Derivatives of Microcystins, Cyclic Heptapeptide Hepatotoxins, Isolated from *Anabaena-Flos-Aquae* Strain Cya 83/1. *Toxicon*, 1992. **30**(11): S. 1465-1471.
  57. Sivonen K, Namikoshi M, Evans WR, Fardig M, Carmichael WW, and Rinehart KL, 3 New Microcystins, Cyclic Heptapeptide Hepatotoxins, from *Nostoc* Sp Strain 152. *Chemical Research in Toxicology*, 1992. **5**(4): S. 464-469.
  58. Azevedo S, Evans WR, Carmichael WW, and Namikoshi M, 1st Report of Microcystins from a Brazilian Isolate of the Cyanobacterium *Microcystis-Aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology*, 1994. **6**(3): S. 261-265.
  59. Devries SE, Namikoshi M, Galey FD, Merritt JE, Rinehart KL, and Beasley VR, Chemical Study of the Hepatotoxins from *Microcystis-Aeruginosa* Collected in California. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1993. **5**(3): S. 409-412.
  60. Sivonen K, Namikoshi M, Evans WR, Gromov BV, Carmichael WW, and Rinehart KL, Isolation and Structures of 5 Microcystins from a Russian *Microcystis-Aeruginosa* Strain Calu-972. *Toxicon*, 1992. **30**(11): S. 1481-1485.
  61. Sano T, Takagi H, and Kaya K, A Dhb-microcystin from the filamentous cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *Phytochemistry*, 2004. **65**(14): S. 2159-2162.
  62. Rinehart KL, Harada K, Namikoshi M, Chen C, Harvis CA, Munro MHG, Blunt JW, Mulligan PE, Beasley VR, Dahlem AM, and Carmichael WW, Nodularin, Microcystin, and the Configuration of Adda. *Journal of the American Chemical Society*, 1988. **110**(25): S. 8557-8558.
  63. Watanabe MF, Oishi S, Harada KI, Matsuura K, Kawai H, and Suzuki M, Toxins Contained in *Microcystis* Species of Cyanobacteria (Blue-Green-Algae). *Toxicon*, 1988. **26**(11): S. 1017-1025.
  64. Namikoshi M, Sivonen K, Evans WR, Carmichael WW, Sun F, Rouhiainen L, Luukkainen R, and Rinehart KL, 2 New L-Serine Variants of Microcystins-Lr and Microcystins-Rr from *Anabaena* Sp Strains 202-A1 and 202-A2. *Toxicon*, 1992. **30**(11): S. 1457-1464.
  65. Stoner RD, Adams WH, Slatkin DN, and Siegelman HW, The Effects of Single L-Amino-Acid Substitutions on the Lethal Potencies of the Microcystins. *Toxicon*, 1989. **27**(7): S. 825-828.

66. Beattie KA, Kaya K, Sano T, and Codd GA, Three dehydrobutyrine-containing microcystins from Nostoc. *Phytochemistry*, 1998. **47**(7): S. 1289-1292.
67. Namikoshi M, Rinehart KL, Sakai R, Sivonen K, and Carmichael WW, Structures of 3 New Cyclic Heptapeptide Hepatotoxins Produced by the Cyanobacterium (Blue-Green-Alga) Nostoc Sp Strain 152. *Journal of Organic Chemistry*, 1990. **55**(25): S. 6135-6139.
68. Rinehart KL, Namikoshi M, and Choi BW, Structure and Biosynthesis of Toxins from Blue-Green-Algae (Cyanobacteria). *Journal of Applied Phycology*, 1994. **6**(2): S. 159-176.
69. Meriluoto JAO, Sandstrom A, Eriksson JE, Remaud G, Craig AG, and Chattopadhyaya J, Structure and Toxicity of a Peptide Hepatotoxin from the Cyanobacterium *Oscillatoria-Agardhii*. *Toxicon*, 1989. **27**(9): S. 1021-1034.
70. Luukkainen R, Namikoshi M, Sivonen K, Rinehart KL, and Niemela SI, Isolation and Identification of 12 Microcystins from 4 Strains and 2 Bloom Samples of *Microcystis* Spp - Structure of a New Hepatotoxin. *Toxicon*, 1994. **32**(1): S. 133-139.
71. Kiviranta J, Namikoshi M, Sivonen K, Evans WR, Carmichael WW, and Rinehart KL, Structure Determination and Toxicity of a New Microcystin from *Microcystis-Aeruginosa* Strain-205. *Toxicon*, 1992. **30**(9): S. 1093-1098.
72. Blom JF, Robinson JA, and Juttner F, High grazer toxicity of [D-Asp(3) (E)-Dhb(7)]microcystin-RR of *Planktothrix rubescens* as compared to different microcystins. *Toxicon*, 2001. **39**(12): S. 1923-1932.
73. Sivonen K, Carmichael WW, Namikoshi M, Rinehart KL, Dahlem AM, and Niemela SI, Isolation and Characterization of Hepatotoxic Microcystin Homologs from the Filamentous Fresh-Water Cyanobacterium Nostoc Sp Strain-152. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990. **56**(9): S. 2650-2657.
74. Kusumi T, Ooi T, Watanabe MM, Takahashi H, and Kakisawa H, Cyanoviridin-Rr, a Toxin from the Cyanobacterium (Blue-Green-Alga) *Microcystis-Viridis*. *Tetrahedron Letters*, 1987. **28**(40): S. 4695-4698.
75. Harada K, Ogawa K, Kimura Y, Murata H, Suzuki M, Thorn PM, Evans WR, and Carmichael WW, Microcystins from *Anabaena-Flos-Aquae* Nrc-525-17. *Chemical Research in Toxicology*, 1991. **4**(5): S. 535-540.
76. Namikoshi M, Sivonen K, Evans WR, Carmichael WW, Rouhiainen L, Luukkainen R, and Rinehart KL, Structures of 3 New Homotyrosine-Containing Microcystins and a New Homophenylalanine Variant from *Anabaena* Sp Strain 66. *Chemical Research in Toxicology*, 1992. **5**(5): S. 661-666.
77. Frias HV, Mendes MA, Cardozo KHM, Carvalho VM, Tomazela D, Colepicolo P, and Pinto E, Use of electrospray tandem mass spectrometry for identification of microcystins during a cyanobacterial bloom event. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006. **344**(3): S. 741-746.
78. Sandstrom A, Glemarec C, Meriluoto JAO, Eriksson JE, and Chattopadhyaya J, Structure of a Hepatotoxic Pentapeptide from the Cyanobacterium *Nodularia-Spumigena*. *Toxicon*, 1990. **28**(5): S. 535-540.
79. Carmichael WW, Eschedor JT, Patterson GML, and Moore RE, Toxicity and Partial Structure of a Hepatotoxic Peptide Produced by the Cyanobacterium *Nodularia-Spumigena* Mertens Emend L575 from New-Zealand. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988. **54**(9): S. 2257-2263.
80. Runnegar MTC, Jackson ARB, and Falconer IR, Toxicity of the Cyanobacterium *Nodularia-Spumigena* Mertens. *Toxicon*, 1988. **26**(2): S. 143-151.
81. Mazur-Marzec H, Meriluoto J, Plinski M, and Szafranek J, Nodularins, cyclic pentapeptide hepatotoxins produced by *Nodularia spumigena* from the Baltic Sea. *Journal of Peptide Science*, 2006. **12**: S. 233-233.
82. Namikoshi M, Choi BW, Sakai R, Sun F, Rinehart KL, Carmichael WW, Evans WR, Cruz P, Munro MHG, and Blunt JW, New Nodularins - a General-Method for Structure Assignment. *Journal of Organic Chemistry*, 1994. **59**(9): S. 2349-2357.

83. Desilva ED, Williams DE, Andersen RJ, Klix H, Holmes CFB, and Allen TM, Motuporin, a Potent Protein Phosphatase Inhibitor Isolated from the Papua-New-Guinea Sponge *Theonella-Swinhoei* Gray. *Tetrahedron Letters*, 1992. **33**(12): S. 1561-1564.
84. Beattie KA, Kaya K, and Codd GA, The cyanobacterium *Nodularia* in PCC 7804, of freshwater origin, produces [L-Har(2)]nodularin. *Phytochemistry*, 2000. **54**(1): S. 57-61.
85. Saito K, Konno A, Ishii H, Saito H, Nishida F, Abe T, and Chen CY, Nodularin-Har: A new nodularin from *Nodularia*. *Journal of Natural Products*, 2001. **64**(1): S. 139-141.
86. Carmichael WW, Evans WR, Yin QQ, Bell P, and Moczydlowski E, Evidence for paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) comb. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997. **63**(8): S. 3104-3110.
87. Onodera H, Satake M, Yasumoto T, and Carmichael W, New saxitoxin analogues from the freshwater filamentous cyanobacterium *Lyngbya wollei*. *Natural Toxins*, 1997. **5**: S. 146-151.
88. Mahmood NA and Carmichael WW, Paralytic Shellfish Poisons Produced by the Fresh-Water Cyanobacterium *Aphanizomenon-Flos-Aquae* Nh-5. *Toxicon*, 1986. **24**(2): S. 175-186.
89. Lagos N, Onodera H, Zagatto PA, Andrinolo D, Azevedo S, and Oshima Y, The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon*, 1999. **37**(10): S. 1359-1373.
90. Humpage AR, Rositano J, Bretag AH, Brown R, Baker PD, Nicholson BC, and Steffensen DA, Paralytic Shellfish Poisons from Australian Cyanobacterial Blooms. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 1994. **45**(5): S. 761-771.
91. Negri AP and Jones GJ, Bioaccumulation of Paralytic Shellfish Poisoning (Psp) Toxins from the Cyanobacterium *Anabaena-Circinalis* by the Fresh-Water Mussel *Alathyria-Condola*. *Toxicon*, 1995. **33**(5): S. 667-678.
92. Pereira P, Li RH, Carmichael WW, Dias E, and Franca S, Taxonomy and production of paralytic shellfish toxins by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* LMECYA40. *European Journal of Phycology*, 2004. **39**(4): S. 361-368.
93. Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, and Stanier RY, Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 1979. **111**(MAR): S. 1-61.
94. Liu YM, Chen W, Li DH, Shen YW, Liu YD, and Song LR, Analysis of paralytic shellfish toxins in *Aphanizomenon* DC-1 from Lake Dianchi, China. *Environmental Toxicology*, 2006. **21**(3): S. 289-295.
95. WHO, [http://www.who.edu/redtide/HABdistribution/PSP\\_worldmap\\_1970-2006.jpg](http://www.who.edu/redtide/HABdistribution/PSP_worldmap_1970-2006.jpg). 2006.
96. Azevedo S, Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, and Eaglesham GK, Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology*, 2002. **181-182**(1): S. 441-446.
97. Fastner J, Heinze R, and Chorus I, Microcystin-content, hepatotoxicity and cytotoxicity of cyanobacteria in some German water bodies. *Water Science and Technology*, 1995. **32**(4): S. 165-170.
98. Fastner J, M E, and U N, Microcystin variants in *Microcystis* and *Planktothrix* dominated field samples, in *Cyanotoxins: Occurrence, Causes, Consequences*, Chorus I, Editor. 2001, Springer-Verlag: Heidelberg. S. 148-152.
99. Mischke U, Der Neophyt *Cylindrospermopsis raciborskii*: Eine Blaualge aus tropischen Regionen in Gewässern des Spree-Dahme-Einzugsgebietes, in *Gewässerreport (Nr. 6): Entwicklungen der Gewässer im scharmützelgebiet und angewandte Probleme des Gewässerschutzes*, Krumbeck H and Mischke U, Editors. 2001, Eigenverlag der BTU Cottbus: Cottbus. S. 39-62.

100. Fastner J, Heinze R, Humpage AR, Mischke U, Eaglesham GK, and Chorus I, Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon*, 2003. **42**(3): S. 313-321.
101. Saker ML, Metcalf JS, Codd GA, and Vasconcelos VM, Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Toxicon*, 2004. **43**(2): S. 185-194.
102. Saitanu K, Laobhripatr S, Limpakarnjanarat K, Sangwanloy O, Sudhasaneyya S, Anuchatvorakul B, and Leelasitorn S, Toxicity of the Fresh-Water Puffer Fish *Tetraodon-Fangi* and *T-Palembangensis* from Thailand. *Toxicon*, 1991. **29**(7): S. 895-897.
103. Saker ML and Eaglesham GK, The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the Redclaw crayfish *Cherax quandricarinatus*. *Toxicon*, 1999. **37**(7): S. 1065-1077.
104. Karlsson K, Sipia V, Kankaanpaa H, and Meriluoto J, Mass spectrometric detection of nodularin and desmethylnodularin in mussels and flounders. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2003. **784**(2): S. 243-253.
105. Mazur-Marzec H, Tyminska A, Szafranek J, and Plinski M, Accumulation of nodularin in sediments, mussels, and fish from the Gulf of Gdansk, southern Baltic Sea. *Environmental Toxicology*, 2007. **22**(1): S. 101-111.
106. Kautek L, Chorus I, and Deuckert I, Erkrankungen nach dem Baden in Berlin und Umland 1991/1992. *Bundesgesundheitsblatt*, 1993. **36**(10): S. 405-409.
107. Jakobi C, Rinehart KL, Codd GA, Carmienke I, and Weckesser J, Occurrence of toxic water blooms containing microcystins in a German lake over a three year period. *Systematic and Applied Microbiology*, 1996. **19**(2): S. 249-254.
108. Jensen G, Ginsberg D, and Drapeau C, Blue-green algae as an immuno-enhancer and biomodulator. *Journal of the American Nutraceutical Association*, 2001. **3**: S. 24-30.
109. Chen YM, Huang R, and Chou HN, Application of protein phosphatase 1 inhibition assay and reversed phase liquid chromatography for the detection of microcystins in algal dietary supplements. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2005. **13**(1): S. 71-77.
110. Gilroy DJ, Kauffman KW, Hall RA, Huang X, and Chu FS, Assessing potential health risks from microcystin toxins in blue-green algae dietary supplements. *Environmental Health Perspectives*, 2000. **108**(5): S. 435-439.
111. Yu FY, Liu BH, Chou HN, and Chu FS, Development of a sensitive ELISA for the determination of microcystins in algae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002. **50**(15): S. 4176-4182.
112. Lawrence JF, Niedzwiadek B, Menard C, Lau BPY, Lewis D, Kuper-Goodman T, Carbone S, and Holmes C, Comparison of liquid chromatography/mass spectrometry, ELISA, and phosphatase assay for the determination of microcystins in blue-green algae products. *Journal of Aoac International*, 2001. **84**(4): S. 1035-1044.
113. Saker ML, Jungblut AD, Neilan BA, Rawn DFK, and Vasconcelos VM, Detection of microcystin synthetase genes in health food supplements containing the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *Toxicon*, 2005. **46**(5): S. 555-562.
114. WHO, Cyanobacterial toxins, in *Guidelines for Drinking-water Quality*, WHO, Editor. 2004, SNP Best-set Typesetter Ltd.: Hong Kong. S. 192-196.
115. Umweltbundesamt, Empfehlung zum Schutz von Badenden vor Cyanobakterien-Toxinen. *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz*, 2003. **6**: S. 530-538.
116. Schaeffer DJ, Malpas PB, and Barton LL, Risk assessment of microcystin in dietary *Aphanizomenon flos-aquae*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1999. **44**(1): S. 73-80.

117. James KJ, Crowley J, Hamilton B, Lehane M, Skulberg O, and Furey A, Anatoxins and degradation products, determined using hybrid quadrupole time-of-flight and quadrupole ion-trap mass spectrometry: forensic investigations of cyanobacterial neurotoxin poisoning. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2005. **19**(9): S. 1167-1175.
118. Adeyemo OM and Siren AL, Cardiorespiratory Changes and Mortality in the Conscious Rat Induced by (+)-Anatoxin-a and (+/-)-Anatoxin-A. *Toxicon*, 1992. **30**(8): S. 899-905.
119. Norris RL, Eaglesham GK, Pierens G, Shaw GR, Smith MJ, Chiswell RK, Seawright AA, and Moore MR, Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology*, 1999. **14**(1): S. 163-165.
120. Sukenik A, Reisner M, Carmeli S, and Werman M, Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in mice: Long-term exposure to low doses. *Environmental Toxicology*, 2006. **21**(6): S. 575-582.
121. Shaw GR, Seawright AA, Moore MR, and Lam PKS, Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: Evaluation of its toxicologic activity. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2000. **22**(1): S. 89-92.
122. Shen XY, Lam PKS, Shaw GR, and Wickramasinghe W, Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicon*, 2002. **40**(10): S. 1499-1501.
123. Runnegar MT, Kong SM, Zhong YZ, and Lu SC, Inhibition of Reduced Glutathione Synthesis by Cyanobacterial Alkaloid Cylindrospermopsin in Cultured Rat Hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, 1995. **49**(2): S. 219-225.
124. Humpage AR and Falconer IR, Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: Determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environmental Toxicology*, 2003. **18**(2): S. 94-103.
125. Carmichael WW, Beasley V, Bunner DL, Eloff JN, Falconer I, Gorham P, Harada KI, Krishnamurthy T, Yu MJ, Moore RE, Rinehart K, Runnegar M, Skulberg OM, and Watanabe M, Naming of Cyclic Heptapeptide Toxins of Cyanobacteria (Blue-Green-Algae). *Toxicon*, 1988. **26**(11): S. 971-973.
126. Ito E, Kondo F, and Harada K, First report on the distribution of orally administered microcystin-LR in mouse tissue using an immunostaining method. *Toxicon*, 2000. **38**(1): S. 37-48.
127. Goldberg J, Huang HB, Kwon YG, Greengard P, Nairn AC, and Kuriyan J, 3-Dimensional Structure of the Catalytic Subunit of Protein Serine/Threonine Phosphatase-1. *Nature*, 1995. **376**(6543): S. 745-753.
128. Mackintosh RW, Dalby KN, Campbell DG, Cohen PTW, Cohen P, and Mackintosh C, The Cyanobacterial Toxin Microcystin Binds Covalently to Cysteine-273 on Protein Phosphatase-1. *Febs Letters*, 1995. **371**(3): S. 236-240.
129. Nishiwakimatsushima R, Nishiwaki S, Ohta T, Yoshizawa S, Suganuma M, Harada K, Watanabe MF, and Fujiki H, Structure-Function-Relationships of Microcystins, Liver-Tumor Promoters, in Interaction with Protein Phosphatase. *Japanese Journal of Cancer Research*, 1991. **82**(9): S. 993-996.
130. Abdelrahman S, Elayouty YM, and Kamael HA, Characterization of Heptapeptide Toxins Extracted from *Microcystis-Aeruginosa* (Egyptian Isolate) - Comparison with Some Synthesized Analogs. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 1993. **41**(1): S. 1-7.
131. Bourne DG, Jones GJ, Blakeley RL, Jones A, Negri AP, and Riddles P, Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996. **62**(11): S. 4086-4094.
132. Bagu JR, Sykes BD, Craig MM, and Holmes CFB, A molecular basis for different interactions of marine toxins with protein phosphatase-1 - Molecular models for bound motuporin, microcystins, okadaic acid, and calyculin A. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(8): S. 5087-5097.

133. Eriksson JE, Toivola D, Meriluoto JAO, Karaki H, Han YG, and Hartshorne D, Hepatocyte Deformation Induced by Cyanobacterial Toxins Reflects Inhibition of Protein Phosphatases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1990. **173**(3): S. 1347-1353.
134. Ohta T, Nishiwaki R, Yatsunami J, Komori A, Suganuma M, and Fujiki H, Hyperphosphorylation of Cytokeratins 8 and 18 by Microcystin-Lr, a New Liver-Tumor Promoter, in Primary Cultured Rat Hepatocytes. *Carcinogenesis*, 1992. **13**(12): S. 2443-2447.
135. Carmichael WW, Health effects of toxin-producing cyanobacteria: "The CyanoHABs". *Human and Ecological Risk Assessment*, 2001. **7**(5): S. 1393-1407.
136. Stotts RR, Namikoshi M, Haschek WM, Rinehart KL, Carmichael WW, Dahlem AM, and Beasley VR, Structural Modifications Imparting Reduced Toxicity in Microcystins from *Microcystis* Spp. *Toxicon*, 1993. **31**(6): S. 783-789.
137. Yatsunami J, Komori A, Ohta T, Suganuma M, and Fujiki H, Hyperphosphorylation of Retinoblastoma Protein and P53 by Okadaic Acid, a Tumor Promoter. *Cancer Research*, 1993. **53**(2): S. 239-241.
138. Humpage AR, Hardy SJ, Moore EJ, Froscio SM, and Falconer IR, Microcystins (cyanobacterial toxins) in drinking water enhance the growth of aberrant crypt foci in the mouse colon. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*, 2000. **61**(3): S. 155-165.
139. Ohta T, Sueoka E, Iida N, Komori A, Suganuma M, Nishiwaki R, Tatematsu M, Kim SJ, Carmichael WW, and Fujiki H, Nodularin, a Potent Inhibitor of Protein Phosphatase-1 and Phosphatase-2a, Is a New Environmental Carcinogen in Male F344 Rat-Liver. *Cancer Research*, 1994. **54**(24): S. 6402-6406.
140. Nishiwakimatsushima R, Ohta T, Nishiwaki S, Suganuma M, Kohyama K, Ishikawa T, Carmichael WW, and Fujiki H, Liver-Tumor Promotion by the Cyanobacterial Cyclic Peptide Toxin Microcystin-Lr. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1992. **118**(6): S. 420-424.
141. Falconer IR, Tumor Promotion and Liver-Injury Caused by Oral Consumption of Cyanobacteria. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 1991. **6**(2): S. 177-184.
142. Suzuki H, Watanabe MF, Wu YP, Sugita T, Kita K, Sato T, Wang XL, Tanzawa H, Sekiya S, and Suzuki N, Mutagenicity of microcystin-LR in human RSa cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 1998. **2**(1): S. 109-112.
143. Ding WX, Shen HM, Zhu HG, Lee BL, and Ong CN, Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 1999. **442**(2): S. 69-77.
144. Ding WX, Shen HM, Shen Y, Zhu HG, and Ong CN, Microcystic cyanobacteria causes mitochondrial membrane potential alteration and reactive oxygen species formation in primary cultured rat hepatocytes. *Environmental Health Perspectives*, 1998. **106**(7): S. 409-413.
145. Ding WX, Shen HM, and Ong CN, The critical role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and reactive oxygen species in microcystin-induced mitochondrial permeability transition in rat hepatocytes. *Hepatology*, 2000. **32**(4): S. 493A-493A.
146. Bouaicha N and Maatouk I, Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicology Letters*, 2004. **148**(1-2): S. 53-63.
147. Jos A, Pichardo S, Prieto AI, Repetto G, Vazquez CM, Moreno I, and Camean AM, Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, 2005. **72**(3): S. 261-271.
148. Morena I, Pichardo S, Jos A, Gomez-Amores L, Mate A, Vazquez CM, and Camean AM, Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. *Toxicon*, 2005. **45**(4): S. 395-402.

149. Pflugmacher S, Wiegand C, Beattie KA, Krause E, Steinberg CEW, and Codd GA, Uptake, effects, and metabolism of cyanobacterial toxins in the emergent reed plant *Phragmites australis* (cav.) trin. ex steud. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001. **20**(4): S. 846-852.
150. Sahin A, Tencalla FG, Dietrich DR, and Naegeli H, Biliary excretion of biochemically active cyanobacteria (blue-green algae) hepatotoxins in fish. *Toxicology*, 1996. **106**(1-3): S. 123-130.
151. Magalhaes VF, Marinho MM, Domingos P, Oliveira AC, Costa SM, Azevedo LO, and Azevedo S, Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon*, 2003. **42**(3): S. 289-295.
152. Xie LQ, Xie P, Guo LG, Li L, Miyabara Y, and Park HD, Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China. *Environmental Toxicology*, 2005. **20**(3): S. 293-300.
153. Wright JLC, Dealing with Seafood Toxins - Present Approaches and Future-Options. *Food Research International*, 1995. **28**(4): S. 347-358.
154. Luckas B, Hummert C, and Oshima Y, Analytical methods for paralytic shellfish poisons, in *Manual on Harmful Marine Microalgae*, Hallegraeff GM AD, Cembella AD, Editor. 2003, United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization: Paris. S. 191-209.
155. Hall S, Strichartz G, Moczydlowski E, Ravindran A, and Reichardt PB, The Saxitoxins - Sources, Chemistry, and Pharmacology. *Acs Symposium Series*, 1990. **418**: S. 29-65.
156. Shimizu Y, Paralytic shellfish poisons. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*, 1984. **45**: S. 235-164.
157. Oshima Y, Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms, in *Harmful Algal Blooms*, Lassus P, Arzul G, Erard E, Gentien P, and Marcaillou C, Editors. 1995, Lavoisier: Paris. S. 475-480.
158. Koehn FE, Hall S, Wichmann CF, Schnoes HK, and Reichardt PB, Dinoflagellate Neurotoxins Related to Saxitoxin - Structure and Latent Activity of Toxin-B1 and Toxin-B2. *Tetrahedron Letters*, 1982. **23**(22): S. 2247-2248.
159. Shimizu Y and Yoshioka M, Transformation of Paralytic Shellfish Toxins as Demonstrated in Scallop Homogenates. *Science*, 1981. **212**(4494): S. 547-549.
160. Sullivan JJ, Iwaoka WT, and Liston J, Enzymatic Transformation of Psp Toxins in the Littleneck Clam (*Protothaca-Staminea*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1983. **114**(2): S. 465-472.
161. Strichartz G, Rando T, Hall S, Gitschier J, Hall L, Magnani B, and Bay CH, On the Mechanism by Which Saxitoxin Binds to and Blocks Sodium-Channels. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1986. **479**: S. 96-112.
162. Schantz EJ, Chemistry and Biology of Saxitoxin and Related Toxins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1986. **479**: S. 15-23.
163. Hall S and Reichardt PB, Cryptic Paralytic Shellfish Toxins. *Acs Symposium Series*, 1984. **262**: S. 113-123.
164. Stevens DK and Krieger RI, Analysis of Anatoxin-a by Gc Ecd. *Journal of Analytical Toxicology*, 1988. **12**(3): S. 126-131.
165. Smith RA and Lewis D, Cicuta Toxicosis in Cattle - Case-History and Simplified Analytical Method. *Veterinary and Human Toxicology*, 1987. **29**(3): S. 240-241.
166. Harada K, Kimura Y, Ogawa K, Suzuki M, Dahlem AM, Beasley VR, and Carmichael WW, A New Procedure for the Analysis and Purification of Naturally-Occurring Anatoxin-a from the Blue-Green-Alga *Anabaena-Flos-Aquae*. *Toxicon*, 1989. **27**(12): S. 1289-1296.
167. James KJ, Sherlock IR, and Stack MA, Anatoxin-a in Irish freshwater and cyanobacteria, determined using a new fluorimetric liquid chromatographic method. *Toxicon*, 1997. **35**(6): S. 963-971.

168. Draisci R, Ferretti E, Palleschi L, and Marchiafava C, Identification of anatoxins in blue-green algae food supplements using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*, 2001. **18**(6): S. 525-531.
169. Hormazabal V, Ostensvik O, Underdal B, and Skulberg OM, Simultaneous determination of the cyanotoxins anatoxin A, microcystin desmethyl-3-RR, LR, RR and YR in water using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2000. **23**(20): S. 3155-3164.
170. Poon GK, Griggs LJ, Edwards C, Beattie KA, and Codd GA, Liquid-Chromatography Electro-spray Ionization Mass-Spectrometry of Cyanobacterial Toxins. *Journal of Chromatography*, 1993. **628**(2): S. 215-233.
171. Furey A, Crowley J, Lehane M, and James KJ, Liquid chromatography with electrospray ion-trap mass spectrometry for the determination of anatoxins in cyanobacteria and drinking water. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2003. **17**(6): S. 583-588.
172. Bogialli S, Bruno M, Curini R, Di Corcia A, and Lagana A, Simple and rapid determination of anatoxin-a in lake water and fish muscle tissue by liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2006. **1122**(1-2): S. 180-185.
173. Eaglesham GK, Norris RL, Shaw GR, Smith MJ, Chiswell RK, Davis BC, Neville GR, Seawright AA, and Moore MR, Use of HPLC-MS/MS to monitor cylindrospermopsin, a blue-green algal toxin, for public health purposes. *Environmental Toxicology*, 1999. **14**(1): S. 151-154.
174. Dell'Aversano C, Eaglesham GK, and Quilliam MA, Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2004. **1028**(1): S. 155-164.
175. Lawton LA, Edwards C, and Codd GA, Extraction and High-Performance Liquid-Chromatographic Method for the Determination of Microcystins in Raw and Treated Waters. *Analyst*, 1994. **119**(7): S. 1525-1530.
176. Edwards C, Lawton LA, Beattie KA, Codd GA, Pleasance S, and Dear GJ, Analysis of Microcystins from Cyanobacteria by Liquid-Chromatography with Mass-Spectrometry Using Atmospheric-Pressure Ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1993. **7**(8): S. 714-721.
177. Yuan M, Namikoshi M, Otsuki A, Rinehart KL, Sivonen K, and Watanabe MF, Low-energy collisionally activated decomposition and structural characterization of cyclic heptapeptide microcystins by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 1999. **34**(1): S. 33-43.
178. Yuan M, Namikoshi M, Otsuki A, Watanabe MF, and Rinehart KL, Electrospray ionization mass spectrometric analysis of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins: Modulation of charge states and  $[M+H]^+$  to  $[M+Na]^+$  ratio. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 1999. **10**(11): S. 1138-1151.
179. Meriluoto J, Karlsson K, and Spoof L, High-throughput screening of ten microcystins and nodularins, cyanobacterial peptide hepatotoxins, by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Chromatographia*, 2004. **59**(5-6): S. 291-298.
180. Yuan M, Namikoshi M, Otsuki A, and Sivonen K, Effect of amino acid side-chain on fragmentation of cyclic peptide ions: differences of electrospray ionization collision-induced decomposition mass spectra of toxic heptapeptide microcystins containing ADMAdda instead of Adda. *European Mass Spectrometry*, 1998. **4**(4): S. 287-298.
181. Meriluoto J, Chromatography of microcystins. *Analytica Chimica Acta*, 1997. **352**(1-3): S. 277-298.
182. Bates HA and Rapoport H, Chemical Assay for Saxitoxin, Paralytic Shellfish Poison. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1975. **23**(2): S. 237-239.
183. Luckas B, Phycotoxins in Seafood - Toxicological and Chromatographic Aspects. *Journal of Chromatography*, 1992. **624**(1-2): S. 439-456.

184. Sullivan JJ and Wekell MM, Determination of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins by High-Pressure Liquid-Chromatography. *Acs Symposium Series*, 1984. **262**: S. 197-205.
185. Thielert G, Kaiser I, and Luckas B. HPLC determination of PSP toxins. in *Proceedings of Symposium on Marine Biotoxins*. 1991. Paris: C.N.E.V.A.
186. Diener M, Erler K, Hiller S, Christian B, and Luckas B, Determination of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins in dietary supplements by application of a new HPLC/FD method. *European Food Research and Technology*, 2006. **224**(2): S. 147-151.
187. Lawrence JF and Menard C, Liquid-Chromatographic Determination of Paralytic Shellfish Poisons in Shellfish after Prechromatographic Oxidation. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 1991. **74**(6): S. 1006-1012.
188. Lawrence JF, Niedzwiadek B, and Menard C, Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection: Collaborative study. *Journal of Aoac International*, 2005. **88**(6): S. 1714-1732.
189. Jaime E, Hummert C, Hess P, and Luckas B, Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by high-performance ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2001. **929**(1-2): S. 43-49.
190. Dell'Aversano C, Hess P, and Quilliam MA, Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. *Journal of Chromatography A*, 2005. **1081**(2): S. 190-201.
191. Sleno L, Volmer DA, Kovacevic B, and Maksic ZB, Gas-phase dissociation reactions of protonated saxitoxin and neosaxitoxin. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2004. **15**(4): S. 462-477.
192. Sleno L, Volmer DA, and Marshall AG, Assigning product ions from complex MS/MS spectra: The importance of mass uncertainty and resolving power. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2005. **16**(2): S. 183-198.
193. Harada K, Murata H, Qiang Z, Suzuki M, and Kondo F, Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. *Toxicon*, 1996. **34**(6): S. 701-710.
194. Harada K, Nagai H, Kimura Y, Suzuki M, Park HD, Watanabe MF, Luukkainen R, Sivonen K, and Carmichael WW, Liquid-Chromatography Mass-Spectrometric Detection of Anatoxin-a, a Neurotoxin from Cyanobacteria. *Tetrahedron*, 1993. **49**(41): S. 9251-9260.
195. Namikoshi M, Murakami T, Fujiwara T, Nagai H, Niki T, Harigaya E, Watanabe MF, Oda T, Yamada J, and Tsujimura S, Biosynthesis and transformation of homoanatoxin-a in the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja and structures of three new homologues. *Chemical Research in Toxicology*, 2004. **17**(12): S. 1692-1696.
196. Zotou A, Jefferies TM, Brough PA, and Gallagher T, Determination of Anatoxin-a and Homoanatoxin in Blue-Green-Algal Extracts by High-Performance Liquid-Chromatography and Gas-Chromatography Mass-Spectrometry. *Analyst*, 1993. **118**(7): S. 753-758.
197. Torokne A, Asztalos M, Bankine M, Bickel H, Borbely G, Carmeli S, Codd GA, Fastner J, Huang Q, Humpage A, Metcalf JS, Rabai E, Sukenik A, Suranyi G, Vasas G, and Weiszfeiler V, Interlaboratory comparison trial on cylindrospermopsin measurement. *Analytical Biochemistry*, 2004. **332**(2): S. 280-284.
198. Hawkins PR, Chandrasena NR, Jones GJ, Humpage AR, and Falconer IR, Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon*, 1997. **35**(3): S. 341-346.
199. Welker M, Bickel H, and Fastner J, HPLC-PDA detection of cylindrospermopsin - opportunities and limits. *Water Research*, 2002. **36**(18): S. 4659-4663.
200. Hummert C, Dahlmann J, Reinhardt K, Dang HPH, Dang DK, and Luckas B, Liquid chromatography - Mass spectrometry identification of microcystins in Microcystis

- aeruginosa strain from Lake Thanh Cong, Hanoi, Vietnam. *Chromatographia*, 2001. **54**(9-10): S. 569-575.
201. Spoo L, Vesterkvist P, Lindholm T, and Meriluoto J, Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2003. **1020**(1): S. 105-119.
202. Barco M, Rivera J, and Caixach J, Analysis of cyanobacterial hepatotoxins in water samples by microbore reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2002. **959**(1-2): S. 103-111.
203. Hollingworth T and Wekell M, Fish and other Marine Products 959.08. Paralytic shellfish poisoning. Biological Method, Final Action., in *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, Hellrich K, Editor. 1990: Arlington, Virginia, USA. S. 881-882.
204. Oehrle SA and Westrick J, Analysis of various cyanobacterial toxins by LC-MS. *Lc Gc Europe*, 2002. **15**(11): S. 2-6.
205. Dahlmann J, Budakowski WR, and Luckas B, Liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry based method for the simultaneous determination of algal and cyanobacterial toxins in phytoplankton from marine waters and lakes followed by tentative structural elucidation of microcystins. *Journal of Chromatography A*, 2003. **994**(1-2): S. 45-57.

## 7 Anhang

### 7.1 Geräte

#### HPLC-Anlagen

1. HPLC-Anlage der Firma Abimed Gilson (Gilson International B.V., Bad Camberg, Deutschland)
  - 234 - Autosampler (Gilson), 305 - und 306 - Pumpe (Gilson)
  - SPD-7A - UV-Detektor (Shimadzu, Duisburg, Deutschland)
  - Auswertungssoftware: UniPoint Software Version 5.11
2. HPLC-Anlage der Firma Perkin Elmer (PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-Juegesheim, Deutschland)
  - PE 200 - Autosampler, PE 200 - quartäre Pumpe (Perkin Elmer)
3. HPLC-Anlage der Firma Shimadzu (Shimadzu, Duisburg, Deutschland)
  - SIL-10AVP - Autosampler, zwei LC-10AT - Pumpen, SCL-10AVP - Systemcontroller, CTO-10AT - Säulenofen (Shimadzu)
4. HPLC-Anlage der Firma JASCO (JASCO, Groß-Umstadt, Deutschland)
  - AS 950 - Autosampler, tertiäre PU 980 - Pumpe, LC-Net II / ADC - Systemcontroller, FP 920 - Fluoreszenzdetektor (JASCO)
  - CTO-10AC - Säulenofen (Shimadzu)
  - CRX-Reaktionseinheit (Pickering Laboratories, Mountain View, USA) mit TFE-Reaktionsschleife (15 m x 0,3 mm)
  - zwei LC-9A - Reaktionspumpen (Shimadzu)
5. HPLC-Anlage der Firma Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)
  - Serie 1100: G 1329 A - Autosampler, binäre G 1312 A - Pumpe, G 1316 A - Säulenofen (Agilent)

#### LC-MS-System

- API 165 der Firma Applied Biosystems (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland)
- Single-Quadrupol-Massenspektrometer
  - mit Turbo-Ionenspray-Quelle
  - verbunden mit HPLC-Anlage der Firma Perkin Elmer (Herkunft)
  - Auswertungssoftware: Analyst Software Version 1.4 (Applied Biosystems)

#### LC-MS/MS-Systeme

1. API 365 der Firma Applied Biosystems (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland)
  - Triple-Quadrupol-Massenspektrometer
  - mit Turbo-Ionenspray-Quelle
  - verbunden mit HPLC-Anlage der Firma Shimadzu (Shimadzu Duisburg, Deutschland)
  - Auswertungssoftware: Analyst Software 1.4 (Applied Biosystems)

2. Sciex 4000 Q Trap (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland)
  - Triple-Quadrupol-Massenspektrometer
  - mit Turbo-Ionenspray-Quelle
  - verbunden mit HPLC-Anlage der Firma Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)
  - Auswertungssoftware: Analyst Software 1.4 (Applied Biosystems)

### **Analytische Trennsäulen**

- Aqua 5u C18 125A (250 mm x 4,6 mm ID), Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)
- Luna 5u C18(2) (250 mm x 4,6 mm ID), Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)
- Luna 5u C18 (250 mm x 3,0 mm ID), Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)
- Luna 3u C18(2) 100A (150 mm x 3,0 mm ID), Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)
- TSK gel Amide-80 (25 mm x 2 mm x 5 µm), Tosoh Biosep (Stuttgart, Deutschland)

### **Geräte zur Probenaufarbeitung**

- Ultraschallbad Sonorex Super RK 106 (Bandelin, Berlin, Deutschland)
- Ultraschallstab Sonoplus GM70 (Bandelin, Berlin, Deutschland)
- Ultrazentrifuge Z233M (Hermle Labortechnik GmbH, Wehningen, Deutschland)

## **7.2 Standardsubstanzen**

Microcystine:	MC-LA, MC-LF, MC-LR, MC-LW, MC-RR, und –YR (alle von Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, USA)
PSP-Toxine:	GTX1-4, B1, NEO, dcSTX und STX (alle vom National Research Council Canada, NRC-CRMB, Halifax, Kanada)
Anatoxin:	ANA (von A.G. Scientific, Inc., San Diego, USA)
Nodularine:	NOD (von Axxora-Alexis, Lausen, Schweiz)
Cylindrospermopsin:	CYN (von Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

### 7.3 Phytoplankton-Biomassen

*Anabaena flos-aquae* (Isolat)  
*Anabaena lemmermannii* (Isolat)  
*Aphanizomenon flos-aquae* (Isolat)  
*Aphanizomenon gracile* (Isolat)  
*Aphanizomenon issatschenkoi* (Isolat)  
*Lyngbya wollei* (Isolat)  
*Microcystis aeruginosa* (Blüte)  
*Nodularia spumigena* (Blüte)  
*Oscillatoria* sp.

### 7.4 Chemikalien

Acetonitril	HPLC grade VWR International GmbH, Dresden, Deutschland
Ameisensäure	99 % ACROS Organics, Geel, Belgien
Ammoniumformiat	≥ 95 % Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumphosphat	98 %, for analysis ACROS Organics, Geel, Belgien
Heptafluorbuttersäure	99 % ACROS Organics, Geel, Belgien
Heptansulfonsäure	Na-Salz – Monohydrat, HPLC grade ACROS Organics, Geel, Belgien
Methanol	HPLC grade VWR International GmbH, Dresden, Deutschland
Oktansulfonsäure	Na-Salz – Monohydrat, 98 % ACROS Organics, Geel, Belgien
Tetrahydrofuran	Tetrahydrofuran for HPLC VWR International GmbH, Dresden, Deutschland
Trifluoressigsäure	Spectranal® Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Wasser	MilliQ RG Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland

## 7.5 Tabellen

Tab. 19: Peakflächen der Toxine bei Extraktion mit unterschiedlichen Methanol / 0,1 M Essigsäure – Verhältnissen: 1:3, 1:1, 3:1

Extraktionsmittel		Peak Area	MW	SD	RSD		Peak Area	MW	SD	RSD
MeOH / HAc (1:3)	MC-LR	4,87E+05				BI	7,53E+06			
MeOH / HAc (1:3)		4,21E+05	448000	34598	8%		7,42E+06	7426093	103087	1%
MeOH / HAc (1:3)		4,36E+05					7,33E+06			
MeOH / HAc (1:1)		7,65E+05					6,60E+06			
MeOH / HAc (1:1)		7,24E+05	750667	23116	3%		6,72E+06	6660714	57616	1%
MeOH / HAc (1:1)		7,63E+05					6,67E+06			
MeOH / HAc (3:1)		7,80E+05					3,52E+06			
MeOH / HAc (3:1)		8,05E+05	793333	12583	2%		5,44E+06	4804346	1113510	23%
MeOH / HAc (3:1)		7,95E+05					5,45E+06			
MeOH / HAc (1:3)	MC-RR	7,21E+04				NEO	3,30E+06			
MeOH / HAc (1:3)		6,87E+04	70133	1762	3%		3,57E+06	3349073	200283	6%
MeOH / HAc (1:3)		6,96E+04					3,18E+06			
MeOH / HAc (1:1)		8,30E+04					3,15E+06			
MeOH / HAc (1:1)		8,30E+04	81133	3233	4%		3,07E+06	3025634	155327	5%
MeOH / HAc (1:1)		7,74E+04					2,85E+06			
MeOH / HAc (3:1)		8,01E+04					2,93E+06			
MeOH / HAc (3:1)		6,92E+04	76067	5977	8%		2,67E+06	2773882	138431	5%
MeOH / HAc (3:1)		7,89E+04					2,72E+06			
MeOH / HAc (1:3)	MC-YR	1,27E+04				dcSTX	6,22E+05			
MeOH / HAc (1:3)		1,26E+04	12567	153	1%		3,98E+05	560058	141366	25%
MeOH / HAc (1:3)		1,24E+04					6,60E+05			
MeOH / HAc (1:1)		2,74E+04					7,81E+05			
MeOH / HAc (1:1)		2,96E+04	27467	2101	8%		6,88E+05	656201	143315	22%
MeOH / HAc (1:1)		2,54E+04					5,00E+05			
MeOH / HAc (3:1)		2,43E+04					2,58E+05			
MeOH / HAc (3:1)		2,98E+04	26600	2858	11%		4,81E+05	423836	145627	34%
MeOH / HAc (3:1)		2,57E+04					5,32E+05			
MeOH / HAc (1:3)	NOD	5,43E+06				STX	1,39E+07			
MeOH / HAc (1:3)		4,57E+06	5066667	445234	9%		9,64E+06	12781235	2761418	22%
MeOH / HAc (1:3)		5,20E+06					1,48E+07			
MeOH / HAc (1:1)		6,53E+06					1,38E+07			
MeOH / HAc (1:1)		6,26E+06	6456667	172143	3%		1,36E+07	13593130	225346	2%
MeOH / HAc (1:1)		6,58E+06					1,34E+07			
MeOH / HAc (3:1)		6,97E+06					8,02E+06			
MeOH / HAc (3:1)		6,73E+06	6890000	138564	2%		1,21E+07	10759699	2376918	22%
MeOH / HAc (3:1)		6,97E+06					1,21E+07			

MW Mittelwert  
SD Standardabweichung  
RSD Relative Standardabweichung  
MeOH Methanol  
HAc Essigsäure

Tab. 20: Peakflächen der Toxine bei einamilger, zweiter und dritter Extraktion mit Methanol / 0,1 M Essigsäure (1:1)

Extraktion		Peak Area	MW	SD	RSD		Peak Area	MW	SD	RSD
1. Extraktion	<b>MC-LR</b>	6,75E+04	70620	2773	4%	<b>B1</b>	6,86E+06	6471221	1397254	22%
		7,46E+04					4,92E+06			
		7,21E+04					5,19E+06			
		6,98E+04					7,15E+06			
		6,91E+04					8,25E+06			
		9,95E+03					7,99E+05			
		1,05E+04					7,36E+05			
		1,09E+04					8,15E+05			
		1,08E+04					8,17E+05			
		1,20E+04					1,09E+06			
		1,80E+03					1,57E+05			
		1,95E+03					1,66E+05			
2. Extraktion	<b>MC-LR</b>	1,65E+03	10830	751	7%	<b>B1</b>	1,62E+05	850738	135973	16%
		1,96E+03					1,21E+05			
		1,92E+03					1,14E+05			
		2,08E+04					3,36E+06			
		2,10E+04					3,33E+06			
		1,98E+04					3,91E+06			
2. Extraktion	<b>MC-RR</b>	1,90E+04	20060	829	4%	<b>NEO</b>	3,50E+06	3522140	233672	7%
		1,97E+04					3,52E+06			
		3,56E+03					7,87E+05			
		3,07E+03					7,33E+05			
		4,02E+03					7,49E+05			
		4,17E+03					7,90E+05			
		3,23E+03					1,17E+06			
		1,14E+03					2,26E+05			
		6,98E+02					2,06E+05			
		7,00E+02					2,11E+05			
		9,78E+02					2,18E+05			
		1,04E+03					2,17E+05			
3. Extraktion	<b>MC-RR</b>	7,00E+02	911	202	22%	<b>NEO</b>	2,11E+05	215390	7642	4%
		9,78E+02					2,18E+05			
		1,04E+03					2,17E+05			
		1,25E+04					9,42E+05			
		1,53E+04					9,80E+05			
		1,24E+04					1,01E+06			
		1,22E+04					1,17E+06			
		1,32E+04					9,48E+05			
		2,76E+03					6,40E+04			
		3,23E+03					7,71E+04			
		2,57E+03					1,06E+05			
		3,04E+03					1,26E+05			
2. Extraktion	<b>MC-YR</b>	3,29E+03	2978	308	10%	<b>dcSTX</b>	2,12E+05	116937	58190	50%
		8,66E+02					0,00E+00			
		1,23E+03					0,00E+00			
		5,76E+02					0,00E+00			
		1,15E+03					0,00E+00			
		1,34E+03					0,00E+00			
3. Extraktion	<b>MC-YR</b>	5,76E+02	1032	310	30%	<b>dcSTX</b>	0,00E+00	0	0	#DIV/0!
		1,15E+03					0,00E+00			
		1,34E+03					0,00E+00			
		3,03E+06					1,43E+07			
		2,94E+06					1,45E+07			
		2,83E+06					1,69E+07			
1. Extraktion	<b>NOD</b>	2,81E+06	2886000	96073	3%	<b>STX</b>	1,60E+07	15415376	1061270	7%
		2,82E+06					1,54E+07			
		5,99E+05					1,58E+06			
		5,69E+05					1,58E+06			
		5,72E+05					1,65E+06			
		5,79E+05					1,63E+06			
		6,88E+05					2,52E+06			
		2,03E+05					4,08E+05			
		1,95E+05					4,26E+05			
		1,97E+05					4,53E+05			
		2,13E+05					4,41E+05			
		2,19E+05					4,71E+05			
2. Extraktion	<b>NOD</b>	5,72E+05	601400	49803	8%	<b>STX</b>	1,65E+06	1790436	406786	23%
		5,79E+05					1,63E+06			
		6,88E+05					2,52E+06			
		2,03E+05					4,08E+05			
		1,95E+05					4,26E+05			
		1,97E+05					4,53E+05			
3. Extraktion	<b>NOD</b>	1,97E+05	205400	10334	5%	<b>STX</b>	4,53E+05	439721	24068	5%
		2,13E+05					4,41E+05			
		2,19E+05					4,71E+05			

MW Mittelwert  
SD Standardabweichung  
RSD Relative Standardabweichung

Tab. 21: Gradientenprofile für Trennung der cyanobakteriellen Toxine im Abschnitt 4.4.5.1

		Step 0	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4	Step 5	Step 6
PSP-Toxin - Elution (Abb. 22)								
Gradient 1	Zeit (min)	0,0	2,0	5,0	15,0			
	Eluent A (%)	100	70	50	100			
	Eluent B (%)	0	30	50	0			
ANA / CYN - Elution (Abb. 23)								
Gradient 1	Zeit (min)	0,0	2,0	5,0	15,0			
	Eluent A (%)	100	70	50	100			
	Eluent B (%)	0	30	50	0			
Gradient 2	Zeit (min)	0,0	2,0	4,0	5,0	5,1	10,0	
	Eluent A (%)	100	70	70	50	100	100	
	Eluent B (%)	0	30	30	50	0	0	
Gradient 3	Zeit (min)	0,0	1,0	5,0	5,1	10,0		
	Eluent A (%)	100	70	70	100	100		
	Eluent B (%)	0	30	30	0	0		
Gradient 4	Zeit (min)	0,0	5,0	5,1	10,0			
	Eluent A (%)	100	70	100	100			
	Eluent B (%)	0	30	0	0			
Gradient 5	Zeit (min)	0,0	7,0	7,1	12,0			
	Eluent A (%)	100	85	100	100			
	Eluent B (%)	0	15	0	0			
Gradient 6	Zeit (min)	0,0	10,0	10,1	15,0			
	Eluent A (%)	100	85	100	100			
	Eluent B (%)	0	15	0	0			
Gradient 7	Zeit (min)	0,0	7,0	7,1	15,0			
	Eluent A (%)	100	90	100	100			
	Eluent B (%)	0	10	0	0			
Gradient 8	Zeit (min)	0,0	10,0	10,1	15,0			
	Eluent A (%)	100	92	100	100			
	Eluent B (%)	0	8	0	0			
Gradient 9	Zeit (min)	0,0	12,0	12,1	20,0			
	Eluent A (%)	100	92	100	100			
	Eluent B (%)	0	8	0	0			
Gradient 10	Zeit (min)	0,0	15,0	15,1	20,0			
	Eluent A (%)	100	92	100	100			
	Eluent B (%)	0	8	0	0			
NOD - Elution (Abb.24)								
Gradient 1	Zeit (min)	0	0,1	5	15	20	21	30
	Eluent A (%)	70	70	50	10	10	70	70
	Eluent B (%)	30	30	50	90	90	30	30
Gradient 2	Zeit (min)	0	2	5	15	20	21	30
	Eluent A (%)	100	70	50	10	10	100	70
	Eluent B (%)	0	30	50	90	90	0	30
Gradient 3	Zeit (min)	0	10	12	15	20	21	30
	Eluent A (%)	100	85	50	10	10	100	100
	Eluent B (%)	0	15	50	90	90	0	0
MC - Elution (Abb. 25)								
Gradient 1	Zeit (min)	0	0,1	5	15	20	21	30
	Eluent A (%)	100	50	50	10	10	100	100
	Eluent B (%)	0	50	50	90	90	0	0

Tab. 22: Konzentrationen, Peakflächen, Peakhöhen, Regressionsgerade und Regressionskoeffizient für PSP-Toxine im Abschnitt 4.4.5.3

	Konzentration (pg)		Peakfläche (counts)	Peakhöhe (cps)	Regressionsgerade (Peakfläche)	Regressionskoeffizient (R <sup>2</sup> )
dcGTX 2/3 - 353 / 273	dcGTX 2	dcGTX 3				
	16,1	4,5	346	56	dcGTX2  y = 12,028 x + 18,563	dcGTX2:  0,9260
	32,2	9,0	453	54		
	32,2	9,0	453	72		
	32,2	9,0	451	65		
	32,2	9,0	574	89		
	32,2	9,0	435	76		
	32,2	9,0	621	107		
	32,2	9,0	498	80		
	32,2	9,0	621	89	dcGTX3:  y = 42,751 x + 20,66	dcGTX3:  0,9260
	160,0	45,0	1730	337		
	160,0	45,0	1750	280		
	320,0	90,0	3980	571		
	320,0	90,0	3700	543		
	320,0	90,0	2640	363		
640,0	180,0	6350	947			
640,0	180,0	9780	1380			
dcSTX - 257 / 239	16,0		2530	426	y = 164,45 x - 382,09	0,9818
	16,0		2750	466		
	32,0		4810	675		
	32,0		6160	822		
	32,0		4250	562		
	32,0		5730	731		
	80,0		13900	1940		
	80,0		16800	2620		
	80,0		19000	2950		
	160,0		29600	3830		
	160,0		29700	3700		
160,0		31300	3910			
GTX 1/4 - 412 / 332	GTX 1	GTX 4			GTX1:  y = 238,46 x - 1118,4	GTX1:  0,9967
	2,2	0,7	503	54		
	4,4	1,4	1380	113		
	4,4	1,4	1240	123		
	4,4	1,4	1100	113		
	4,4	1,4	726	82		
	4,4	1,4	932	101		
	4,4	1,4	999	106		
	4,4	1,4	1150	88	GTX4:  y = 717,06 x - 370,62	GTX4:  0,9967
	4,4	1,4	712	114		
	43,7	7,2	7890	966		
	43,7	7,2	6760	764		
	87,3	28,8	17800	1680		
	87,3	28,8	18800	1760		
	87,3	28,8	18800	2120		
	87,3	28,8	18900	1890		
	218,0	72,1	45600	4590		
437,0	144,2	106000	10700			
437,0	144,2	104000	10500			
GTX 1/4 - 412 / 314	GTX 1	GTX 4			GTX1:  y = 640,48 x - 1771,8	GTX1:  0,9973
	2,2	0,7	999	240		
	4,4	1,4	2290	373		
	4,4	1,4	2250	375		
	4,4	1,4	2190	379		
	4,4	1,4	2070	337		
	4,4	1,4	2370	378		
	4,4	1,4	3180	451		
	4,4	1,4	2670	381	GTX4:  y = 1924,7 x +271,98	GTX4:  0,9973
	4,4	1,4	2580	418		
	43,7	7,2	24000	4110		
	43,7	7,2	24200	3770		
	87,3	28,8	54500	8040		
	87,3	28,8	52400	7650		
	87,3	28,8	53800	8260		
	87,3	28,8	55600	8070		
	218,0	72,1	121000	18300		
437,0	144,2	281000	38500			
437,0	144,2	284000	41500			

Fortsetzung Tab. 22

	Konzentration (pg)		Peakfläche (counts)	Peakhöhe (cps)	Regressionsgerade (Peakfläche)	Regressionskoeffizient (R <sup>2</sup> )
GTX 2/3 - 396 / 316	GTX 2	GTX 3				
	14,9	4,9	264	61		
	29,9	9,9	549	100		
	29,9	9,9	514	72		
	29,9	9,9	346	44		
	29,9	14,8	528	59		
	29,9	14,8	501	80	y = 25,232 x - 521,9	0,9450
	29,9	14,8	632	119		
	29,9	4,9	385	71		
	29,9	4,9	510	70		
	75,0	145,0	1550	177		
	75,0	145,0	1370	243		
	75,0	145,0	1430	214		
	150,0	295,0	2600	302		
	150,0	295,0	2730	339		
	300,0	580,0	6410	679	y = 12,46 x - 91,467	0,9358
	300,0	580,0	6510	650		
300,0	580,0	4800	550			
600,0	1160,0	12900	1390			
600,0	1160,0	18200	2100			
GTX 2/3 - 396 / 298	GTX 2	GTX 3				
	14,9	14,9	1020	162		
	29,9	29,9	2280	365		
	29,9	29,9	2250	413		
	29,9	29,9	2010	322		
	29,9	29,9	2060	320		
	29,9	29,9	2230	319	y = 88,055 x - 1462,2	0,9387
	29,9	29,9	2690	460		
	29,9	29,9	2180	333		
	29,9	29,9	2310	352		
	75,0	145,0	5270	865		
	75,0	145,0	5290	1000		
	150,0	150,0	11000	1750		
	150,0	295,0	5350	902		
	150,0	150,0	11200	1730		
	300,0	300,0	22900	3360		
	300,0	300,0	25100	3530	y = 84,528 x - 2181,8	0,8685
300,0	300,0	19200	3020			
600,0	600,0	43800	5880			
600,0	600,0	64200	9200			
GTX 5 - 380 / 300		3,0	290	70		
		3,0	300	118		
		5,9	519	131		
		5,9	472	100		
		5,9	534	90		
		5,9	623	110		
		14,8	1230	183		
		29,6	2690	569		
		29,6	2530	399	y = 56,591 x + 355,8	0,9676
		29,6	2770	493		
		29,6	1390	240		
	148,0	8510	822			
NEO - 316 / 298		10,3	9020	1270		
		20,6	20200	2840		
		20,6	17100	2680		
		20,6	20100	2720		
		20,6	22200	2940		
		41,2	44000	7020		
		41,2	48200	7730		
		41,2	39500	6130		
		41,2	49300	7470	y = 994,34 x + 986,43	0,9937
		103,0	97800	15300		
		206,0	201000	28500		
		206,0	205000	28400		
		206,0	225000	34600		
	206,0	197000	28400			
	206,0	202000	29100			

Fortsetzung Tab. 22

	Konzentration (pg)	Peakfläche (counts)	Peakhöhe (cps)	Regressionsgerade (Peakfläche)	Regressionskoeffizient (R <sup>2</sup> )
STX - 300 / 282	19,6	8480	1120	$y = 221,45 x + 3117$	0,9764
	19,6	10000	1260		
	39,1	10900	1110		
	39,1	13300	1490		
	39,1	8330	960		
	39,1	14900	1520		
	97,8	23800	2730		
	97,8	22100	2680		
	97,8	21500	2560		
	196,0	45600	5350		
	196,0	50000	6420		
	196,0	47000	5610		

Tab. 23: Konzentrationen, Peakflächen, Peakhöhen, Regressionsgerade und Regressionskoeffizient für CYN, ANA und NOD im Abschnitt 4.4.5.3

	Konzentration (pg)	Peakfläche (counts)	Peakhöhe (cps)	Regressionsgerade (Peakfläche)	Regressionskoeffizient (R <sup>2</sup> )
CYN	5,0	28300	10300	$y = 2327,7 x + 31338$	0,9607
	5,0	26300	12000		
	5,0	19700	6660		
	12,5	54600	20900		
	12,5	35000	12300		
	12,5	51500	21700		
	25	70800	14100		
	25	97100	36100		
	25	66700	22200		
	50,0	212000	82300		
	50,0	160000	38100		
	50,0	133000	38200		
	100,0	285000	85300		
	100,0	322000	84200		
	100,0	334000	88700		
	200,0	458000	109000		
200,0	481000	138000			
200,0	470000	99900			
ANA	100,0	68700	28300	$y = 374,02 x + 64665$	0,9894
	100,0	43000	23900		
	100,0	108000	19600		
	2000,0	954000	370000		
	5000,0	1880000	564000		
NOD	5,0	30700	8470	$y = 5033,6 x + 4496,7$	0,9922
	5,0	36800	10000		
	5,0	26000	8130		
	12,5	57200	11300		
	12,5	65300	15800		
	12,5	61000	10100		
	25,0	185000	34000		
	25,0	153000	27900		
	25,0	132000	20000		
	50,0	258000	47000		
	50,0	241000	44100		
	50,0	268000	42300		
	100,0	542000	71300		
	100,0	438000	79300		
	100,0	434000	58200		
	200,0	1020000	173000		
	200,0	1020000	152000		
	200,0	1040000	149000		

Tab. 24: Konzentrationen, Peakflächen, Peakhöhen, Regressionsgerade und Regressionskoeffizient für MCs im Abschnitt 4.4.5.3

	Konzentration (pg)	Peakfläche (counts)	Peakhöhe (cps)	Regressionsgerade (Peakfläche)	Regressionskoeffizient (R <sup>2</sup> )
MC-LA	12,5	29900	6660	y = 2437,3 x + 9143,1	0,9392
	12,5	70200	11800		
	12,5	59500	18500		
	25,0	90700	23500		
	25,0	116000	54000		
	25,0	12300	6750		
	50,0	135000	33000		
	50,0	178000	24500		
	50,0	91900	18000		
	100,0	208000	36500		
	100,0	178000	36100		
	100,0	263000	49500		
	200,0	472000	54800		
200,0	484000	97100			
200,0	582000	85800			
MC-LF	50,0	42800	12000	y = 1182,8 x - 19567	0,8980
	50,0	55100	12300		
	50,0	42900	18200		
	100,0	67400	12000		
	100,0	79600	18300		
	100,0	116000	23400		
	200,0	178000	30500		
	200,0	263000	56100		
200,0	221000	36400			
MC-LR	5,0	46000	11700	y = 8412,7 x + 16844	0,9861
	5,0	54900	20200		
	5,0	60800	24100		
	12,5	91800	24100		
	12,5	91200	29900		
	12,5	89500	17700		
	25,0	189000	54300		
	25,0	218000	47800		
	25,0	342000	107000		
	50	477000	84100		
	50	429000	78100		
	50	561000	293000		
	100,0	821000	187000		
	100,0	758000	168000		
	100,0	850000	197000		
200,0	1670000	337000			
200,0	1860000	475000			
200,0	1600000	307000			
MC-LW	50,0	110000	24200	y = 1765,7 x + 32333	0,9798
	50,0	123000	54100		
	50,0	110000	18200		
	100,0	233000	42300		
	100,0	214000	44300		
	100,0	208000	54900		
	200,0	352000	66400		
	200,0	397000	83700		
200,0	398000	73500			
MC-YR	5,0	52900	17700	y = 9249,5 x - 9393,3	0,9636
	5,0	17600	11800		
	5,0	63900	29900		
	12,5	99000	25000		
	12,5	136000	24100		
	12,5	91800	30400		
	25	178000	48300		
	25	296000	106000		
	25	188000	41300		
	50,0	423000	91300		
	50,0	415000	101000		
	50,0	484000	84100		
	100,0	747000	125000		
	100,0	1030000	185000		
	100,0	970000	195000		
200,0	1720000	378000			

Fortsetzung Tab. 24

	Konzentration (pg)	Peakfläche (counts)	Peakhöhe (cps)	Regressionsgerade (Peakfläche)	Regressionskoeffizient (R <sup>2</sup> )
<b>MC-YR</b>	200,0	1600000	313000		
	200,0	2210000	603000		
<b>MC-RR</b>	5,0	52100	23600	y = 8485,8 x - 5618,5	0,9603
	5,0	53300	18500		
	5,0	58000	17900		
	12,5	82300	23600		
	12,5	12400	23600		
	12,5	75800	25600		
	25,0	218000	48100		
	25,0	224000	47400		
	25,0	455000	183000		
	50,0	496000	110000		
	50,0	380000	78100		
	50,0	423000	78800		
	100,0	705000	115000		
	100,0	613000	121000		
	100,0	803000	240000		
	200,0	1670000	288000		
200,0	1590000	480000			
200,0	1980000	959000			

## Danksagung

Die praktischen Arbeiten für die vorliegende Arbeit wurden in der Zeit von Juli 2003 bis März 2007 am Lehrstuhl Lebensmittelchemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter der Leitung von Prof. Dr. Bernd Luckas, sowie während eines Forschungsaufenthaltes in der Zeit von Januar bis Juni 2006 am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung (AWI) Bremerhaven in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Allan Cembella durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn 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 mit der Teilnahme an internationalen Kongressen meine Arbeiten vorzustellen, sowie im Rahmen von Forschungsaufenthalten, Erfahrungen im wissenschaftlichen Austausch und für mein persönliches Leben zu sammeln.

Mein besonderer Dank gebührt Dr. Bernd Krock für die Betreuung meiner Arbeit während des Aufenthaltes am AWI Bremerhaven, für Rat und Hilfe insbesondere zur Analytik mit Massenspektrometrie, für die Experimente mit Anatoxin-a(s) sowie zahlreiche fachliche Diskussionen und seine Unterstützung bei der Fertigstellung von Manuskripten.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Lehrstuhls Lebensmittelchemie möchte ich für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft danken, insbesondere Frau Katrin Erler für die Bestimmung der PSP-Toxine, Frau Elke Stoll für die Unterstützung bei der Probenaufarbeitung und Thomas Lassig bei der Untersuchungen zur Extraktion der Toxine im Rahmen seiner Diplomarbeit.

Der Arbeitsgruppe Ökologische Chemie vom AWI Bremerhaven unter Leitung von Prof. Dr. Allan Cembella danke ich für die Möglichkeit, meine Arbeiten in ihrem Institut durchzuführen, sowie für die gute Integration und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Dank schulde ich den Wissenschaftlern, die mir Probenmaterial für massenspektrometrische Analysen zur Verfügung gestellt haben: Dr. Geoff Eaglesham (Queensland Health Scientific Service, Australien), Dr. Jutta Fastner (Bundesumweltamt, Deutschland), Dr. Peter Henriksen (Universität Kopenhagen, Dänemark), Dr. Patrick Holland (Cawthron Institute, Neuseeland), Dr. Hanna Mazur-Marzec (Universität Gdansk, Polen), Dr. Alexander Piek (Fachhochschule Lausitz, Deutschland).

Mein Dank geht an Prof. Dr. Ernani Pinto von der Universität Sao Paulo, Brasilien für seine Fragmentierungsuntersuchungen von Anatoxin-a(s).

Dank möchte ich auch meinen Freunden und meiner Familie aussprechen, die mich durch Ermutigung und Zuversicht unterstützt und somit zur Fertigstellung meiner Arbeit beigetragen haben.

## **Selbständigkeitserklärung**

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

Jena, 13. Mai 2007

## **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.

Jena, 13. Mai 2007

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Susann Hiller  
Geburtsdatum / -ort: 7. März 1980 in Jena / Thüringen  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

09/1986 - 08/1990 Polytechnische Oberschule Wormstedt  
09/1990 - 08/1992 Staatliche Regelschule Wormstedt  
09/1992 - 08/1994 Staatliches Gymnasium Bergschule Apolda  
09/1994 - 07/1998 Albert-Schweitzer-Gymnasium Erfurt,  
mathematisch-naturwissenschaftlicher  
Spezialschulteil

### Hochschulstudium

10/1998 - 06/2003 Studium der Ernährungswissenschaften an der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena  
19.06.2003 Abschluss als Diplom-Ernährungswissenschaftlerin

### Postgraduale Ausbildung

07/2003 Beginn der Arbeiten an der Dissertation am  
Lehrstuhl für Lebensmittelchemie (Prof. Dr. B.  
Luckas) an der Biologisch-Pharmazeutischen  
Fakultät der FSU Jena  
10/2005 Forschungsaufenthalt am „Queensland Health  
Scientific Service“, Brisbane, Australien bei Dr. Geoff  
Eaglesham

Jena, 13. Mai 2007