



© andrej pol - stock.adobe.com

# Härtetest für LC-MS/MS-Technologien

## Einsatz auf einem Forschungsschiff

Bernd Krock

**A**ls Polar- und Meeresforschungsinstitut betreibt das AWI eine kleine Flotte von Forschungsschiffen, die Meeresforschern den Zugang zu ihrem Forschungsgegenstand erlaubt. Dabei sind Forschungsfahrten in der Regel Probe- nahmeexpeditionen, bei denen auf den Forschungsfahrten Probematerialien genommen werden, die dann später nach der Expedition in Laboren der teilnehmenden Institute, teilweise mit aufwendiger instrumenteller Analytik, entsprechend der jeweiligen wissenschaftlichen Fragestellung untersucht werden. Ein Nachteil dieses Ansatzes besteht darin, dass in der Regel vor Ort, d.h. auf dem Meer, nicht auf eventuelle Befunde reagiert werden kann, weil die Untersuchung der Proben und die Ergebnisse der Expedition nachgeschaltet sind. Die Gründe für diesen Probenahme- ansatz vieler Forschungsfahrten liegen an den Limitationen, die die Schifffahrt mit sich bringt. Dazu zählen Platzmangel, das Fehlen von spezialisierten Laboren und die ständige Bewegung auf See, die aus dem Zittern der Schiffsmotoren und dem mehr oder weniger starken Seegang besteht, was nicht nur für die Technik ein Problem darstellen kann.

Die Arbeitsgruppe „Chemische Ökologie mariner Protisten“ des Alfred Wegener Institut-Helmholtz Zentrum für Polar- und Meeresforschung (AWI) in Bremerhaven befasst sich schwerpunktmäßig mit einzelligen Mikroalgen und deren Sekundärmetaboliten. Von den Mikroalgen sind wiederum dieje-

nigen von besonderem Interesse, die Toxine - sogenannte Phycotoxine - produzieren, die ihrerseits von filterfressenden Schalentieren aufgenommen und angereichert werden können. Dabei sind die meisten Phycotoxine nur für Wirbeltiere (einschließlich des Menschen) schädlich, in der Regel aber nicht

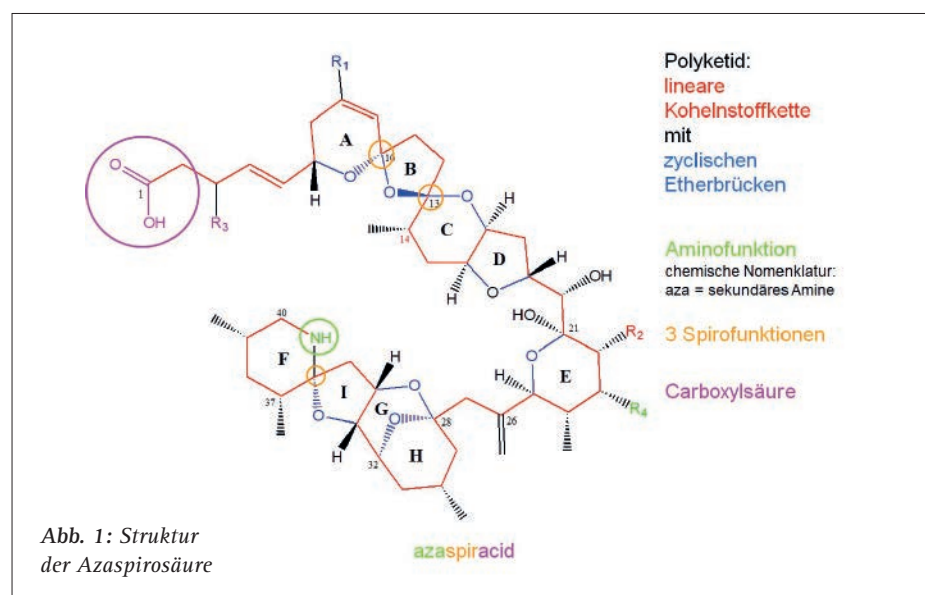


Abb. 1: Struktur der Azaspirosäure



Abb. 2: Das Forschungsschiff Heincke an der AWI Pier (oben links), Triple Quadrupol Massenspektrometer beim Entpacken aus der Transportkiste an Deck (oben rechts) und das installierte LC-MS/MS im Schiffslabor (unten).

für Mollusken, was der Grund dafür ist, dass Schalentiere Phycotoxine in großen Mengen anreichern können ohne dabei selbst Schaden zu nehmen. Besonders problematisch sind toxische Mikroalgen vor allem dann, wenn sie als quasi monospezifische Blüten auftreten und das marine Ökosystem negativ beeinflussen. Große Bedeutung haben Phycotoxine für die Lebensmittelsicherheit, weil alle Chargen von Schalentieren wie Muscheln, Austern, etc., die als Meeresfrüchte vermarktet werden sollen, vorher auf Phycotoxine getestet werden müssen, um Vergiftungen von Verbrauchern auszuschließen.

#### Azasirosäure Muschelvergiftung

Dennoch erkrankten 1995 acht Personen in den Niederlanden nach dem Verzehr von Muscheln an Symptomen, die einer diarrhöischen Muschelvergiftung (Diarrheie

Shellfish Poisoning, DSP) ähnelten. Die verzehrten Muscheln (*Mytilus edulis*) waren in Killary Harbour (Irland) geerntet worden. Trotz der DSP Symptome der Patienten waren keine DSP Toxine im Toxinmonitoring dieser Muschelcharge detektiert worden. Drei Jahre nach diesem Vorfall konnte die Vergiftung verursachende Substanz durch eine japanische Arbeitsgruppe isoliert und strukturaufgeklärt werden. Dabei handelte es sich um ein Polyketid mit der Molekülmasse von 841 Da: Azasirosäure (azaspiroic acid, AZA) [1]. Als Polyketide, also Nebenprodukte der Fettsäurebiosynthese, bestehen Azasirosäuren aus einer stark hydroxylierten linearen Kohlenstoffkette, deren Hydroxylgruppen durch Wasserabspaltung intramolekulare Etherbrücken und somit zyklische Strukturelemente bilden. Darüber hinaus enthält der F-Ring ein Stickstoffatom, das als sekundäres Amin laut IUPAC Nomenklatur mit der Vorsilbe

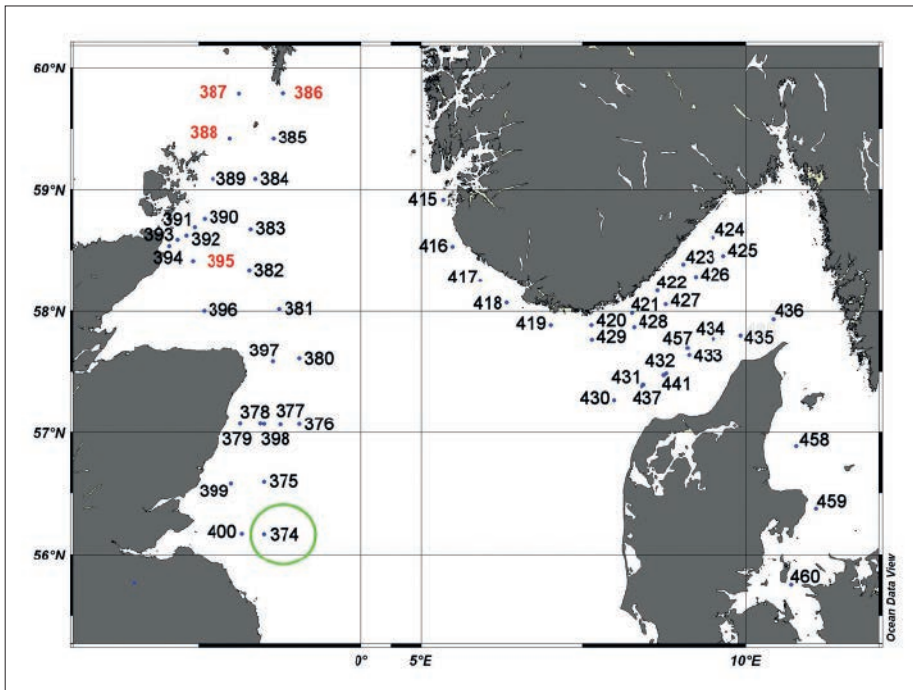


Abb. 3: Stationen der Nordsee Expedition 2007. Schwarze Stationsnummern zeigen AZA-1 im Plankton an, an Stationen mit roten Nummern wurde kein AZA-1 detektiert. Station 374 war die Station mit den höchsten AZA-1 Werten.

„aza“ bezeichnet wird. Drei der neun intramolekularen Ringe sind über Spirofunktionen mit einander verknüpft und die lineare Kohlenstoffkette endet in einer freien Carboxylgruppe. Die letzten drei chemischen Funktionen bilden das Kunstwort „azaspiracid“ (Abb. 1) und die entsprechenden Symptome wurden Azaspirosäure Muschelvergiftung (Azaspiracid Shellfish Poisoning, AZP) genannt. Nachdem AZA als neues Phycotoxin bekannt war, wurden in den Folgejahren 10 weitere Azaspirosäuren in Muscheln entdeckt und beschrieben [2,3,4], wobei der Ursprung dieser Toxine immer noch unbekannt war. Aufgrund der chemischen Struktur, die anderen Phycotoxinen ähnelt, die von marinen Dinoflagellaten produziert werden, und der Tatsache, dass AZAs in filterfressenden Muscheln auftraten, wurde vermutet, dass auch AZA von Dinoflagellaten synthetisiert werden. Entsprechend präsentierte 2003 eine irische Arbeitsgruppe den heterotrophen marinen Dinoflagellaten *Protoperdinium crassipes* als AZA Produzenten, da sie hohe AZA Mengen in dieser Spezies gefunden hatte [5]. Daraufhin startete das Marine Institute in Galway, Irland, das für das nationale Plankton- und Phycotoxinmonitoring zuständig ist, eine Langzeituntersuchung zum Auftreten von *P. crassipes* und AZAs in Muscheln in irischen Aquakulturen. Dabei wurde über einen Fünfjahreszeitraum zwischen 2002 und 2006 keinerlei Korrelation

zwischen dem Vorkommen von *Protoperdinium* Arten im Plankton und AZAs in Muscheln gefunden, infolgedessen die Autoren *Protoperdinium* als Quelle von AZAs ausschlossen [6]. Somit war nach über zehn Jahren nach dem ersten Auftreten von AZP der Ursprung von AZAs nach wie vor unbekannt.

#### Unter Verdacht: Wimperntierchen *Favella* ein AZA-Produzent?

Nachdem unsere Arbeitsgruppe zu dem Zeitpunkt eine Forschungsreise in die Nordsee geplant hatte und die Frage nach dem AZA Produzenten wieder offen war, sollte dieses Thema auf der Expedition untersucht werden. Um möglichst flexibel auf eventuelle AZA Funde im Meer reagieren zu können, erschien es notwendig Planktonproben schon während der Expedition an Bord zu messen. Nach anfänglichen Bedenken fiel trotzdem die Entscheidung das Risiko einzugehen und das LC-MS/MS an Bord zu nehmen (Abb. 2). Auf allen Stationen der Expedition wurden Planktonproben mit einem Planktonnetz (20 µm Maschenweite) genommen in drei Größenfraktionen (>200 µm, 50-200 µm und 20-50 µm) aufgeteilt, sofort extrahiert und gemessen. Die erste große Überraschung war, dass AZA-1 in der gesamten Nordsee nachzuweisen war, obwohl es bis dahin nur aus irischen Mu-

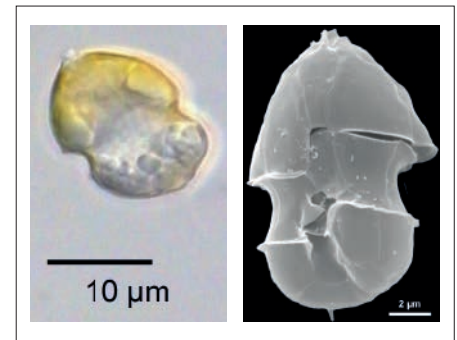


Abb. 4: Lichtmikroskop- (links) und Raster-elektronenmikroskopaufnahme (rechts) des AZA Produzenten *Azadinium spinosum*.

scheln bekannt war (Abb. 3). An Station 374 wurden besonders hohe AZA-1 Werte in der 50-200 µm Fraktion detektiert. Diese Fraktion wurde unter dem Mikroskop untersucht und es stellte sich heraus, dass sie fast ausschließlich Wimperntierchen der Art *Favella ehrenbergii* enthielt. Dieses Ergebnis war unerwartet, da Wimperntierchen nicht mit Phycotoxinen in Verbindung standen. Um andere Quellen auszuschließen wurden 160 einzelne Wimperntierchen mit einer Mikropipette isoliert, extrahiert und mit LC-MS/MS gemessen. Die Messung bestätigte, dass sie AZA-1 enthielten. Da es aber schon einmal eine Fehlidentifizierung von AZA Produzenten gegeben hatte, sollte experimentell überprüft werden, ob *Favella* tatsächlich ein AZA Produzent war. Dazu wurden erneut 100 *Favella* Zellen isoliert und mit der nicht-toxischen Dinoflagellatenart *Scrippsiella trochoidea* eine Woche lang ernährt und danach wieder gemessen. In dieser Messung konnte allerdings kein AZA-1 mehr nachgewiesen werden. Damit war klar, dass *Favella* kein AZA Produzent war, sondern sich an Station 374 vermutlich von dem unbekanntem AZA Produzenten ernährt hatte. Außerdem waren wir nach zwei Wochen intensiver Arbeit auf See bei der Frage nach dem AZA Produzenten nicht substantiell weitergekommen.

#### AZA produzierende Dinoflagellatengattungen: *Azadinium* und *Amphidoma*

Rückblickend war lediglich klar, dass AZAs bis dato im Plankton nur in zwei heterotrophen Organismen, d.h. Einzellern, die keine eigenen Chloroplasten zur Photosynthese besitzen, sondern fressen müssen, nämlich *Protoperdinium* und *Favella* nachgewiesen worden waren, die beide etwas größer als 50 µm sind. Sollte die AZA produzierenden Organismen von beiden Arten gefressen werden können, liegt nahe, dass sie kleiner als

ihre Prädatoren sind und womöglich sogar kleiner als die 20 µm der Maschenweite des Planktonnetzes. Da bis dahin alle bekannten toxischen Mikroalgen größer als 20 µm waren, war das Standardphytoplanktonnetz das unangefochtene Instrument der Planktologie. Nach diesen Überlegungen wurde entschieden zur Station 374 zurückzukehren, an der zu Beginn der Forschungsfahrt die höchsten AZA Werte gemessen worden waren und dort anstatt eines Planktonnetz-zuges Wasser aus dem Wasserschöpfer zu analysieren. Zehn Liter des Meerwassers wurden sequentiell über eine Reihe von Filtern unterschiedlicher Porenweite (10, 8, 3 und 0,2 µm) filtriert und die Rückstände auf den Filtern auf AZA untersucht. Dabei wurden über 90% des gesamten AZA auf den Filtern mit 8 und 3 µm Porengröße gefunden. Zur Identifizierung des AZA produzierenden Organismus wurde Seewasser der Station über 20 µm filtriert, um das grö-

ßere Mikroplankton und potentielle Fresser zu entfernen und das Filtrat durch serielle Verdünnung in über 240 Mikrotiterkulturen aufgeteilt. Diese wurden nach Anwachsen durch Zellteilung später im Labor auf AZA untersucht und eine Kultur enthielt tatsächlich AZA-1 und eine monoklonale Kultur einer neuen, unbekanntenen Dinoflagellatengattung, die *Azadinium* und die Art *A. spinosum* genannt wurde [7] (Abb.4). Nach der Entdeckung der Gattung *Azadinium* sind in den Folgejahren über 25 weitere Arten dieser Gattung und der nah verwandten Gattung *Amphidoma* beschrieben worden [8,9], von denen drei ebenfalls AZAs produzieren und mit der Anzahl der produzierenden Arten hat sich auch die Anzahl der AZAs, die von Dinoflagellaten produziert werden von anfänglich drei auf 26 erhöht [10], wobei die selben Arten in unterschiedlichen geographischen Regionen unterschiedliche AZA Profile aufweisen können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Entdeckung dieser für die Lebensmittelsicherheit relevanten neuen Gattung, ohne die massenspektrometrischen Vor-Ort-Analytik auf der Forschungsreise nicht möglich gewesen wäre und erklärt warum es trotz intensiver Bemühungen weltweit führender Forschungsgruppen auf dem Thema jahrelang nicht gelungen ist, die Quelle von AZAs aufzudecken.

## KONTAKT |

---

**Dr. Bernd Krock**  
Alfred-Wegener-Institut für  
Polar- und Meeresforschung  
Ökologische Chemie  
Bremerhaven, Germany  
bernd.krock@awi.de