

Project 505.0420

Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van (microbiële)
toxinen.

Projectleider: ir L.G.M.Th. Tuinstra

Rapport 88.41

juni 1988

DIARRHETISCHE EN PARALYTISCHE
SCHELPDIERVERGIFTIGING

R. Hartemink

Afdeling: Organische Contaminanten

Goedgekeurd door: ir L.G.M.Th. Tuinstra

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en
tuinbouwprodukten (RIKILT)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 08370-19110
Telex 75180 RIKIL
Telefax 08370-17717

8841

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

sectorhoofden

produktcoördinator dierlijke produkten

projectleider

afdeling Organische Contaminanten (4x)

projectbeheer

bibliotheek

circulatie

EXTERN:

Landbouwniversiteit Wageningen,

Vakgroep Levensmiddelentechnologie (prof. dr W. Pilnik)

R. Hartemink (5x)

Agralin, Pudoc

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

DANKWOORD

Bij het uitvoeren van deze afstudeeropdracht heb ik veel steun en hulp ontvangen van de volgende mensen van het RIKILT, die ik hierbij dan ook hartelijk wil bedanken :

- Ir. L.G.M.Th. Tuinstra, hoofd afdeling organische contaminanten en mijn begeleider,
- W.A. Traag, lab-assistent afdeling organische contaminanten, die mij met de massaspectrometer heeft geholpen,
- De andere medewerkers van de afdeling organische contaminanten, met name P. Kienhuis, die mij met de PSP bepaling heeft geholpen,
- J. Weseman, lab-assistent afdeling bio-farmaceutische analyse, die mij met de infra-rood spectrofotometer heeft geholpen.

Zonder de hulp en de vele adviezen van deze mensen zou dit verslag niet tot stand zijn gekomen.

Wageningen, juni 1988

SAMENVATTING

Wereldwijd komen er verschillende vormen van schelpdiervergiftiging voor. Voor Nederland geldt dat alleen DSP en PSP van direct belang zijn. Zowel DSP als PSP worden veroorzaakt door verschillende soorten dinoflagellaten (een soort algen), die af en toe tot zeer hoge concentraties in het zeewater voorkomen (een algenbloei).

Schelpdieren eten dan relatief veel van dergelijke algen en concentreren in hun lichaam de door de dinoflagellaten geproduceerde toxines. De schelpdieren hebben zelf geen last van deze toxines, maar worden voor menselijke consumptie ongeschikt.

De toxines die DSP veroorzaken zijn betrekkelijk onschuldig, dodelijke slachtoffers zijn er niet gemeld. Voor PSP ligt dat anders, jaarlijks sterven er een aantal mensen door het eten van met PSP toxines vergiftigde schelpdieren.

Voor beide methodes bestaan er in de praktijk toegepaste dierproeven om schelpdierpartijen routinematig te onderzoeken.

Door de bezwaren die hierbij optreden (ethische bezwaren en weinig selectieve methodes), is er een ontwikkeling gaande om voor de toxinebepaling een betrouwbare en gevoelige chemische methode te ontwikkelen.

Voor beide typen schelpdiervergiftiging zijn er HPLC methodes beschreven. Deze methodes worden uitvoering beschreven en getest en zijn zonnodig aangepast.

Bij de bepaling van de DSP-toxines wordt gebruik gemaakt van een derivatiseringsreagens (het ADAM). De synthese en analyse van dit reagens wordt beschreven.

INHOUDSOPGAVE

	blz
DANKWOORD	1
SAMENVATTING	2
INHOUDSOPGAVE	3
1 INLEIDING	5
2 SCHELPIEDIERVERGIFTIGINGEN	6
2.1 Inleiding	6
2.2 NSP of Neurotoxic Shellfish Poisoning	6
2.3 Ciguatera	7
2.4 Tetrodotoxine	8
3 DSP OF DIARRHETISCHE SCHELPIEDIERVERGIFTIGING	9
3.1 Voorkomen van DSP	9
3.1.1 Symptomen van DSP	9
3.1.2 Oorzaken van DSP	10
3.2 De DSP toxines	11
3.3 Aantonen van de toxines	13
3.3.1 Bio-assay-methodes	13
3.3.1.1 Witte rattentest	13
3.3.1.2 Muistest	14
3.3.1.3 Semi-biologische methode	15
3.3.2 Chemische methodes	15
3.3.2.1 TLC of dunnelaagchromatografie	15
3.3.2.2 Gaschromatografie	16
3.3.2.3 HPLC	16
4 PSP OF PARALYTISCHE SCHELPIEDIERVERGIFTIGING	17
4.1 Voorkomen van PSP	17
4.1.1 Symptomen van PSP	17
4.1.2 Oorzaken van PSP	18
4.2 De PSP toxines	18
4.3 Aantonen van de toxines	20
4.3.1 Muistest	20
4.3.2 Chemische methoden m.u.v. HPLC methoden	21
4.3.3 HPLC methoden	22
5 ADAM OF 9-ANTHRYLDIAZOMETHAAN	24
5.1 Derivatiseren van carboxylgroepen	24
5.2 ADAM-synthese	25
5.3 Stabiliteit van ADAM	26
6 DSP (Practisch)	28
6.1 Inleiding	28
6.1.1 Gebruikte chemicalien en apparatuur	28
6.2 Derivativering	29
6.2.1 Derivativering somstandigheden	29
6.2.2 Derivativeringstijd	30
6.2.3 Derivativering van standaardoplossingen	31
6.2.4 Derivativering met commerciële ADAM	32
6.2.5 Derivativering van monsters	33
6.2.6 Derivativering van andere stoffen	33
6.2.7 Andere derivativeringsreagentia	35

6.3	Interne standaarden	35
6.4	Opwerking van schelpdiermonsters	36
6.5	Clean-Up	38
6.6	HPLC-systeem	38
7	ADAM (Practisch)	40
7.1	Inleiding	40
7.1.1	Gebruikte chemicalien en apparatuur	40
7.2	ADAM synthese	40
7.3	ADAM analyse	42
7.3.1	Infrarood methode	42
7.3.2	Massaspectrometrische methode	43
7.3.3	HPLC methode	43
8	PSP (Practisch)	46
8.1	Inleiding	46
8.1.1	Gebruikte chemicalien en apparatuur	47
8.2	Isolatie en opwerking mosselen	48
8.3	Post-column reactie systeem	49
8.4	HPLC-omstandigheden	50
9	CONCLUSIES EN RICHTLIJNEN VOOR VERDER ONDERZOEK	52
	LITERATUURLIJST	53
	BIJLAGEN EN VOORSCHRIFTEN	59

1 INLEIDING

Dit verslag behandelt de analysemethodes voor twee typen schelpdiervergiftiging, de paralytische en diarrhetische schelpdiervergiftiging (respectievelijk PSP en DSP genaamd). Dit verslag is het resultaat van een 5-maands afstudeervak Levensmiddelenchemie, uitgevoerd op de afdeling Organische Contaminanten (OCON) van het Rijkskwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT) te Wageningen.

De opdracht van dit afstudeervak was tweeledig, enerzijds het optimaliseren en opstarten van een HPLC (hoge prestatie vloeistof chromatografie) methode voor het analyseren van de toxines die DSP veroorzaken, anderzijds het opstarten van een HPLC methode voor het analyseren van PSP toxines en het meewerken aan een ringtest betreffende deze methode. Dat laatste onderdeel, de ringtest, is komen te vervallen doordat de organiserende instantie hiervan (de FDA in Seattle, USA) de test enkele maanden heeft uitgesteld.

Schelpdiervergiftigingen vormen wereldwijd een steeds groter probleem, mede door de (internationale) handel in schelpdieren. Hoewel Nederland tot nu toe betrekkelijk weinig last van schelpdiervergiftigingen heeft gehad is het niet waarschijnlijk dat dat in de toekomst zo zal blijven. Een analysemethode voor het routinematig controleren van schelpdierpartijen is dan ook noodzakelijk. Aan dergelijke analysemethodes is dit verslag gewijd.

Het verslag bestaat uit twee delen, een literatuurstudie en een experimenteel gedeelte.

In het eerste gedeelte zal dieper worden ingegaan op het verschijnsel schelpdiervergiftiging en op DSP en PSP in het bijzonder. In het experimentele gedeelte zullen de bestaande HPLC methodes voor het aantonen van de verschillende DSP en PSP toxines beschreven worden, gevolgd door de experimenten die ik naar aanleiding van deze methodes heb uitgevoerd. Tevens zullen de herziene voorschriften voor het analyseren van DSP en PSP toxines besproken worden.

Een apart karakter dragen de twee hoofdstukken die zich zuiver bezighouden met ADAM (9-anthryldiazomethaan). ADAM is een reagens wat bij de DSP bepaling wordt gebruikt. Om verschillende redenen is beloten dit reagens zelf te gaan synthetiseren. Tevens is er een methode ontwikkeld om dit reagens aan te tonen. De literatuurgegevens betreffende ADAM zijn in het eerste gedeelte onder hoofdstuk 5 opgenomen, de experimentele resultaten in hoofdstuk 7.

2 SCHELDPDIERVERGIFTIGINGEN

2.1 Inleiding

Schelpdierversgiftigingen zijn er in een aantal soorten en worden meestal veroorzaakt door toxines geproduceerd door dinoflagellaten. Deze dinoflagellaten, een soort phytoplankton, worden door schelpdieren uit het zeewater gefiltreerd, waarbij het eventueel in de dinoflagellaten aanwezige toxine zich in de schelpdieren ophoopt tot soms voor de mens toxische concentraties.

Dinoflagellaten vormen in de dieren en plantenwereld een aparte klasse van wezens. Het zijn kleine (enkele microns grote) wezens, noch echt dier, noch echt plant. Sommige soorten zijn in staat fotosynthese uit te voeren, terwijl andere dat niet kunnen. De dinoflagellaten planten zich sexueel voort en sommige soorten vormen clusters van 2-8 cellen. Tijdens de niet-reproductieve periodes komen ze vaak als cysten voor. Voortplanting geschied pas bij bepaalde klimatologische en aquatische omstandigheden. Bij zeer optimale omstandigheden kan de voortplanting uit de hand lopen en een enorme toename van het aantal cellen is het gevolg. Men zegt dat er dan een explosie of 'bloom' optreedt. In het Nederlands spreekt men ook wel over algenbloei. Tijdens zo'n explosie zijn celaantallen van 20.000 cellen per liter zeewater of meer geen uitzondering. Bij dergelijke concentraties krijgt het zeewater een rode tot bruine kleur en spreekt men wel van 'red tides'. Bij sommige soorten wordt het water 's nachts zelfs lichtgevend door zo'n explosie, men spreekt dan van het lichten van de zee.

Dinoflagellaten komen over de hele wereld voor, maar explosies doen zich meestal voor in de gematigde klimaatzones boven of onder de 30^e breedtegraad (noorder- of zuiderbreedte) (1).

Sommige soorten dinoflagellaten kunnen, zoals gezegd, ook voor de mens giftige toxines vormen (zie bijlage 1). De gevolgen van de consumptie van deze toxines staan bekend onder de namen PSP, DSP, NSP (resp. Paralytic, Diarrhetic en Neurotoxic Shellfish Poisoning), tetrodotoxinevergiftiging en ciguatera.

DSP en PSP zullen verder in de hoofdstukken 3 en 4 behandeld worden, NSP en ciguatera zullen hieronder behandeld worden.

2.2 NSP of Neurotoxic Shellfish Poisoning

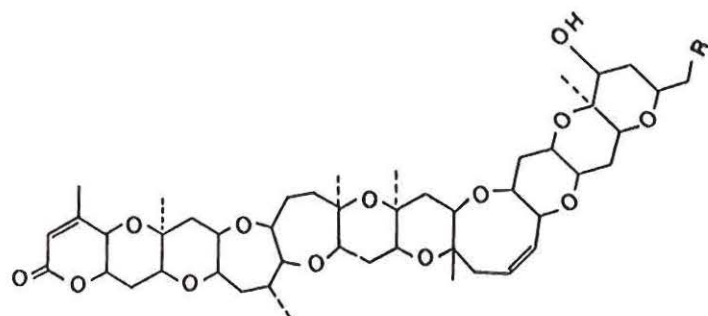
NSP komt hoofdzakelijk voor langs de kust van Florida en het aangrenzende zeegebied. In dit gebied komen met grote regelmaat 'red tides' voor, die veroorzaakt worden door de dinoflagellaat *Ptychodiscus brevis*. Deze dinoflagellaat vormt 6 verschillende toxines, de zogenaamde brevetoxinen (zie fig 1).

Deze brevetoxines zijn endotoxines, die vrijkomen bij lysis van de cel. De fysiologische functie is nog onbekend. De toxiciteit van de schelpdieren tijdens een red tide is ongeveer evenredig met het voorkomen van *P. brevis*. Bij meer

dan 250.000 cellen per liter worden de schelpdieren extreem toxisch en treedt er massale vis- en vogelsterfte op. De toxiciteit van de schelpdieren blijft nog enkele weken na afloop van de explosie aanwezig.

De gevolgen van NSP bij de mens zijn paresthesie van lippen en ledematen, omgekeerde temperatuursensatie, hoofdpijn, maag-darmstoornissen en soms verlammingen. Herstel vindt meestal binnen enkele dagen plaats. De werking van het toxine berust op inwerking op de natriumkanalen van het zenuwstelsel, wat allerlei gevolgen kan hebben.

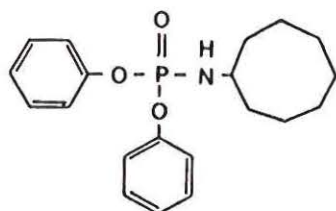
Aantonen van toxiciteit van de schelpdieren gebeurt nu nog met een muistest, maar immunologische technieken zijn in ontwikkeling. Preventie vindt plaats, en dat geldt voor alle schelpdierversoorten, door telling van het aantal dinoflagellaten in het zeewater (2,3).



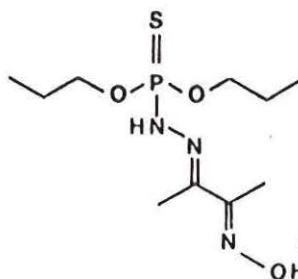
brevetoxin B : R = C(CH₂)CHO

GB-3 : R = COCH₂OH

brevetoxin C : R = COCH₂Cl



PB-1



Gb-4

fig 1 : structuren brevetoxines (uit 3)

2.3 Ciguatera

Hoewel ciguatera geen echte schelpdierversoort is, maar een vergiftiging die op kan treden na het eten van vis, worden de verantwoordelijke toxines, ciguatoxine en maitotoxine (structuren niet geheel bekend), door dinoflagellaten gesynthetiseerd.

Ciguatera is een ziekte die hoofdzakelijk voorkomt bij vissen die rond koraalriffen in (sub-)tropische gebieden

leven. Jaarlijks komen er zo'n 2000 gevallen van ciguatera voor in de Stille Oceaan.

De verantwoordelijke dinoflagellaat, Gambierdiscus toxicus, is inmiddels in een groot aantal gebieden bij ciguatera-vergiftiging aangetoond.

De toxines zijn extreem toxisch en werken in op het zenuwstelsel door interactie met de calciumkanalen (3,4).

2.4 Tetrodotoxine

Van tetrodotoxine (zie fig 2) is bekend dat het voorkomt in een groot aantal organismen, zoals vissen, inktvissen, schelpdieren, krabben en kikkers. De oorsprong is echter nog niet bekend; men vermoedt, door de verscheidenheid aan betrokken organismen, dat de oorzaak een dinoflagellaat is. Het toxine heeft een neurotoxische werking en werkt, evenals de PSP toxines (zie 4.1.1 en 4.2), in op de natriumkanalen van het zenuwstelsel, wat verlammingen veroorzaakt.

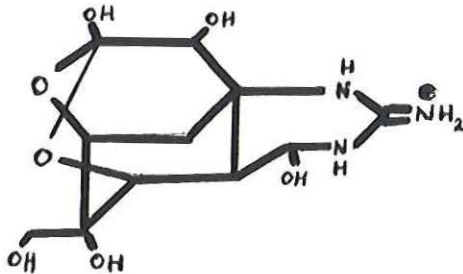


fig 2 : structuur tetrodotoxine (uit 73)

3 DSP OF DIARRHETISCHE SCHELPIEDIERVERGIFTIGING

3.1 Voorkomen van DSP

DSP is over de hele wereld waargenomen, maar de meeste gevallen vinden plaats in de gematigde klimaatzones. De enige tot nu toe beschreven uitzondering hierop is een uitbraak van DSP in 1983 in Thailand (3).

In Europa zijn uitbraken van DSP gemeld in Noorwegen (Oslofjorden en omgeving (5)), Frankrijk (Bretagne, Normandie, Middellandse Zee (6)), Ierland (Bantry Bay en Roaring water Bay (6)), Spanje (Noordwestkust (6)), Zweden (8) en Nederland (Waddenzee, Oosterschelde (7)). Buiten Europa zijn uitbraken gemeld in Chili, Japan en Thailand (3).

DSP is het meest endemisch in Japan. Het is een daar jaarlijks terugkerend verschijnsel met nogal wat slachtoffers per jaar. In de periode 1976-82 zijn er meer dan 1300 gevallen gemeld (9). Ook in Frankrijk en Spanje is het een jaarlijks terugkerend verschijnsel, meestal echter op een wat kleinere schaal. De grootste uitbraak ter wereld tot nu toe heeft zich echter wel in Spanje voorgedaan; in 1981 werden hier meer dan 5000 gevallen gemeld. De grootste uitbraak in Frankrijk was in 1983 met 400 gevallen (10).

In Nederland zijn tot nu toe 6 uitbraken van DSP geweest. De eerste beschreven uitbraak vond in juli 1961 in de Oosterschelde plaats. Tien jaar later (juli 1971) was het eveneens in de Oosterschelde raak, in september 1976 en 1979 was de Waddenzee aan de beurt. In september 1981 werd er zowel in de Oosterschelde als in de Waddenzee DSP geconstateerd (12). In september 1986, tot nu toe de ergste uitbraak, was het weer raak in de Waddenzee, terwijl in 1987 de mosselen in de Waddenzee tijdelijk sterk verdacht waren. In Nederland zijn er tot nu toe nog nooit mensen ziek geworden van legaal verhandelde mosselen, dit omdat het RIVO (Rijksinstituut voor VisserijOnderzoek) in IJmuiden alle mosselpartijen keurt (zie 3.3.1.1). De meeste ziektegevallen kwamen voor uit de verkoop van illegaal opgeviste mosselen, of van mosselen uit proefpercelen. De ergste uitbraak was in juli 1971 met 100 ziektegevallen, in 1976 waren het er 24, in 1979 4 en in 1981 30 (7,12). Hoewel er in 1986 geen slachtoffers vielen, heeft door een ernstige uitbraak in de Waddenzee de mosselhandel eind 1986 volledig stil gelegen.

3.1.1 Symptomen van DSP

DSP dankt zijn naam aan het meest voorkomende symptoom, namelijk diarree. De incubatieperiode voor DSP is erg kort; er worden incubatietijden vermeld van 30 minuten tot 5-6 uur na opname van de toxines (9,12). De incubatietijd blijkt afhankelijk te zijn van de hoeveelheid opgenomen toxine, des te meer toxine er opgenomen is, des te korter is de incubatietijd (12).

De symptomen zijn eigenlijk alleen maagdarfstoornissen. Yasumoto geeft voor 1300 gevallen in Japan de volgende symptomen met het percentage gevallen waarbij die symptomen

voorkwamen : diarree (92 %), overgeven (79 %), misselijkheid (80 %), hevige buikpijn (53 %) en rillingen (10 %) (9). De meest slachtoffers zijn na enkele dagen weer volledig genezen en van enig blijvend letsel is geen sprake.

Zoals uit de symptomen wel af te leiden valt is er nog nooit een dodelijk geval van DSP beschreven.

Gezien de symptomen is het waarschijnlijk dat DSP vaker voorkomt dan de literatuur doet vermoeden. Veel mensen gaan voor dergelijke symptomen niet naar de dokter en deze mensen worden dan ook niet opgemerkt. Het is dus ook niet uitgesloten dat DSP ook in andere landen dan in de boven genoemde landen voorkomt, echter niet op erg grote schaal (grote uitbraken worden op den duur wel opgemerkt).

3.1.2 Oorzaken van DSP

Er zijn verschillende dinoflagellaten die de DSP toxines kunnen produceren, echter altijd van de geslachten *Dinophysis* en *Prorocentrum*. In 1981/82 werden in Japan de soorten *P.lima* en *D.fortii* verdacht van uitbraken van DSP. Beiden soorten bleken in muistesten symptomen van DSP op te kunnen wekken. De toxines uit *D.fortii* en *P.lima* bleken echter niet identiek (11,13) (zie 3.2). Het toxine uit *D.fortii* werd *dinophysistoxine-1* genoemd, terwijl een van de uit *P.lima* geïsoleerde toxines het al eerder uit sponzen geïsoleerde *okadainezuur* bleek te zijn (14).

In Nederland bleek *D.acuminata* (fig 3) de veroorzaker van DSP te zijn. Bij de uitbraken in 1976, '78 en '81 werden in de Noordzee grote cel aantallen van zowel *D.acuminata* als van *P.micans* en *P.minimum* aangetroffen. Door getijdebewegingen en stromingen kwamen deze cellen in de Waddenzee terecht, waar ze door de mosselen uit het water gefiltreerd werden. In de Waddenzee bleken de dinoflagellaten niet te kunnen overleven zodat de explosie daar vanzelf overging (5). Om na te gaan welke van de drie soorten de veroorzaker was van DSP werden *P.micans* en *P.minimum* in aquaria geteeld (dit blijkt niet mogelijk voor *D.acuminata*) en op toxiciteit getest. Beide soorten bleken niet toxisch, waardoor *D.acuminata* als de veroorzaker aangewezen kon worden. Dit resultaat werd later ook nog in vivo bevestigd toen bij een afname van *D.acuminata* de toxiciteit van de mosselen eveneens afnam. Ook bleken er geen giftige mosselen voor te komen bij extreme aantallen van *P.minimum* in 1984.

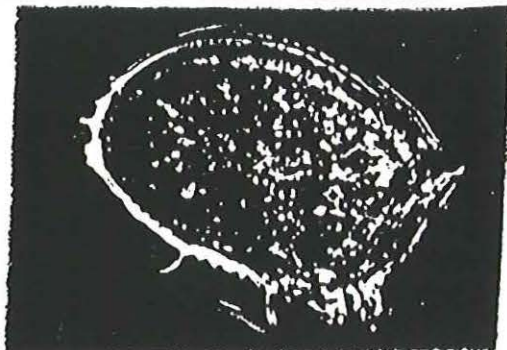


fig 3 : *Dinophysis acuminata* (uit 12).

Andere soorten, zoals *P.triestinum* en *D.acuta*, die langs de Nederlandse kust voorkomen hebben groeiexplosies gegeven, die echter niet tot DSP geleid hebben (6).

Na het uitsterven van een explosie duurt het nog ongeveer 4 weken voordat al het toxine uit de schelpdieren is verdwenen (12).

Andere soorten *Dinophysis* en *Prorocentrum* hebben wel in andere landen DSP veroorzaakt, voor een overzicht zie tabel 1.

Tabel 1 : overzicht DSP veroorzakende dinoflagellaten.

soort	land	bron
<i>Prorocentrum lima</i>	Japan	13
<i>Prorocentrum minimum</i>	Japan *	5
<i>Dinophysis fortii</i>	Noorwegen, Japan	6,11
<i>Dinophysis acuminata</i>	Nederland, Ierland, Zweden, Frankrijk, Spanje	3,5,6
<i>Dinophysis acuta</i>	Noorwegen, Chili	3,6
<i>Dinophysis caudata</i>	Thailand	3

* Alleen bij extreem hoge celgetallen

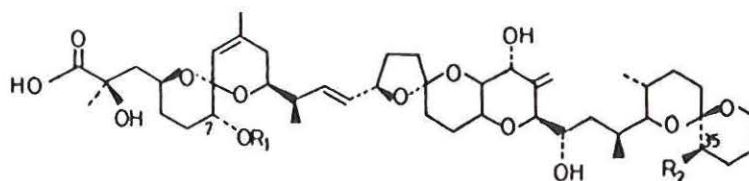
In Europa wordt DSP eigenlijk alleen veroorzaakt door het eten van giftige mosselen (*Mytilus edulis*), in oesters is het nog nooit aangetoond, echter niet onmogelijk (7).

In Japan, waar veel meer schelpdieren worden gegeten, zijn eveneens mosselen, maar ook *Patinopecten yessoensis*; *Tapes japonica*, *Gomphina melanaegis*, *Mytilus coroscum* en *Chlamys nipponensis* wel eens bij DSP uitbraken betrokken geweest (9).

3.2 De DSP toxines

Tot nu toe zijn er 9 verschillende toxines beschreven die DSP kunnen veroorzaken. De toxines kunnen onderverdeeld worden in twee groepen; zure en neutrale toxines. De zure toxines zijn grote polyetherverbindingen, die beschouwd kunnen worden als derivaten van een C38 vetzuur. De neutrale toxines zijn eveneens polyetherverbindingen echter met een volledig andere structuur.

De zure toxines, 4 in totaal, hebben allen dezelfde basisstructuur (fig 3) en worden beschouwd als derivaten van het meest onderzochte toxine, het okadaïnezuur.



okadaïc acid (OA) : $R_1=H, R_2=H$
 dinophysistoxin-1 (DTX1) : $R_1=H, R_2=CH_3$
 dinophysistoxin-3 (DTX3) : $R_1=acyl(C_{14}-C_{22}), R_2=CH_3$

fig 4 : structuur DSP-toxines (uit 3).

Okadainezuur werd voor het eerst geïsoleerd uit 2 sponzen van het geslacht Halichondra, namelijk uit H. okadai (voorkomend langs de kust van Japan) en H. melanodocia (uit het Carraibisch gebied)(14). Aan H. okadai heeft het okadainezuur zijn naam te danken. Later bleek dat niet de sponzen de producenten van het okadainezuur waren maar verschillende dinoflagellaten van de geslachten Dinophysis en Prorocentrum (8,13).

De structuur van okadainezuur is inmiddels door synthese bewezen (16-18).

De andere zure toxines, dinophysistoxine (DTX)-1,2 en 3 zijn derivaten van het okadainezuur. Het DTX-1 is 35(S)methylokadainezuur. De structuur van DTX-2 is nog niet geheel bekend. DTX-3 is het op de 7-OH plaats met vetzuren veresterde DTX-1, waarbij verschillende vetzuren zijn aangetoond, zowel sterk onverzadigde als verzadigde.

DTX-3 is een zeer instabiele verbinding, die onder invloed van zuur, base of lucht al ontleed in de vetzuren en DTX-1 (9).

Bij kamertemperatuur zijn de toxines vaste stoffen, okadainezuur en DTX-3 zijn kleurloos, DTX-1 is wit.

De toxiciteit van de toxines is niet erg hoog; bij een lage dosis treden er wel ziekteverschijnselen op, maar de lethale dosis is erg groot. Voor muizen is vastgesteld dat de lethale dosis (bij inspuiting in het buikvlies) voor okadainezuur, DTX-1 en DTX-3 respectievelijk 200, 160 en 500 ug/kg lichaamsgewicht is (3).

Over de fysiologische werking van de toxines is nog maar weinig bekend. Van okadainezuur is het bekend dat het een zeer sterke vaatvernauwende werking heeft. Deze spiercontractie is extreem stabiel en treedt onder alle mogelijke omstandigheden op (in vitro). Allerlei bekende medicijnen met een vaatverwijderende werking hebben geen invloed op de werking van het okadainezuur. De preciese interactie tussen okadainezuur en toxine is nog niet bekend, wel staat vast dat de contractie alleen bij glad spierweefsel kan optreden (15).

Verder is vastgesteld dat zowel de DTX-toxines als het okadainezuur een sterke vochtophoping in de darmen van muizen veroorzaakt. Dit zou ook voor een groot gedeelte de ziekteverschijnselen bij de mens verklaren. De exacte werking is echter niet bekend.

De neutrale toxines, pectenotoxines (PTX) genaamd, genoemd naar het schelpdiergeslacht waar ze voor het eerst uit geïsoleerd werden, hebben een volledig andere basisstructuur (fig 5). Tot nu toe zijn er 4 toxines geïsoleerd, waarvan van drie de structuur inmiddels is opgehelderd (21).

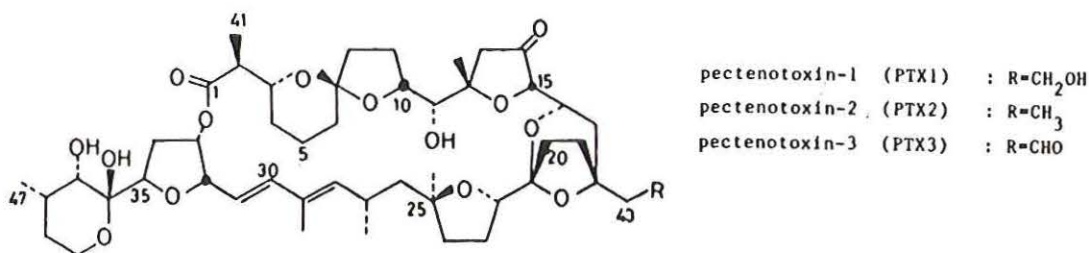


fig 5 : structuren Pectenotoxines (uit 3)

Over de werking van de PTX-toxines is nog weinig bekend, alleen dat orale toediening bij muizen acute leveraandoeningen tot gevolg had, symptomen die niet bekend zijn bij de mens (2).

De toxineverhouding in schelpdieren kan sterk verschillen van plaats tot plaats. Ook hoeven de toxines bij meerdere uitbraken op een plaats niet altijd dezelfde te zijn. In Europese schelpdieren (mosselen) wordt de toxiciteit hoofdzakelijk veroorzaakt door het okadainezuur, terwijl in Japan DTX-1 het meest voorkomt. In Europa zijn DTX-3 en de pectenotoxines zeer weinig aangetoond, terwijl ze in Japan wel degelijk aanwezig zijn (8).

De DSP-toxines blijven betrekkelijk kort in het schelpdier aanwezig. Na een paar weken zijn de toxines weer verdwenen; of dit door uitspoeling of door metabolische omzettingen gaat is nog niet bekend (7).

3.3 Aantonen van de toxines

In Nederland is het zo dat mosselen alleen op toxines gecontroleerd worden als er een bloei van verdachte dinoflagellaten heeft plaatsgevonden. Hiertoe wordt bijna dagelijks het zeewater op dinoflagellaten getest. Tevens is het zo dat in Nederland mosselen pas verhandeld mogen worden na een verwateringsperiode van 4 weken op de Yerseke bank in de Oosterschelde. Voor het keuren van de mosselmonsters en het aantonen van de toxines hierin zijn een aantal methodes beschikbaar, die hieronder besproken zullen worden.

3.3.1 Bio-assay methodes

Er worden voor de bepaling van de toxiciteit van een partij schelpdieren verschillende bio-assay testen gebruikt (dierproeven). In Nederland wordt vooral de witte ratten-test gebruikt, terwijl men in Japan hoofdzakelijk met een muistest werkt. Onlangs is er een derde semi-biologische methode ontwikkeld die werkt met eencelligen. Deze drie methodes zullen hieronder besproken worden.

3.3.1.1 Witte rattentest

In Nederland gebruikt men een bij de keuring van schelpdiermonsters een voedertest met witte ratten (*Rattus norvegicus*). Een etmaal voor het inzetten van de proef krijgt het proefdier geen voedsel meer, alleen nog water. De hepatopancreassen (middendarmklieren, het orgaan waar de mossel het toxine ophoopt, zie fig 6) van 10 mosselen worden uit de mosselen gehaald, grof gesneden en gemengd met 6 gram gemalen rattevoer. Dit te testen mengsel wordt aan de ratten gevoerd. Uit de (gedeeltelijke) weigering van het voer en de aard van de geproduceerde faeces is een toxiciteitsgraad af te lezen, zie tabel 2 (7,12). Deze test is door de jaren heen zeer betrouwbaar gebleken, maar heeft als nadeel dat er niets bekend is over de exacte hoeveelheid toxine in de monsters (5).

Overigens wordt in Nederland te test pas uitgevoerd als metingen van het algenaantal in zeewater hoge concentraties verdachte dinoflagellaten te zien geven.

Tabel 2 : toxiciteitsgraden met de rattentest (7)

Percentage gegeten mosselvoermengsel	Consistentie faeces van het proefdier	Toxiciteitsgraad
100	normaal	negatief
< 100 - 80	normaal - zacht	zwak toxisch +
80 - 50	zacht - diarree	matig toxisch ++
< 50	diarree	ernstig toxisch +++

3.3.1.2 Muistest

De procedure van de in Japan gebruikte muistest is als volgt: Ongeveer 10 gram hepatopancreassen van de schelpdieren worden 3x bij kamertemperatuur met aceton geextraheerd. De aceton wordt verdampt en het residu wordt in water opgelost. Deze oplossing wordt 3x met ether geextraheerd. De etherlaag wordt 2x met water gespoeld en drooggedampt. Het residu wordt opgelost in 2 ml 1% Tween 60 oplossing en in verschillende mate verdund. Met deze verdunningsreeks worden muizen van 17-20 gram intraperitoneaal geïnjecteerd. De muizen worden gedurende 24 uur geobserveerd en de minimale dosis die nodig is om binnen die 24 uur een muis te doden wordt een muis-eenheid (mouse-unit, MU) genoemd. De minimale, voor de mens toxische dosis is 12 MU. Het in Japan maximaal toegestane besmettingsniveau is 5 MU/100 g vlees (9).

Deze methode geeft een betere kwantificering van de hoeveelheid aanwezig toxine, maar heeft als groot nadeel dat vrije onverzadigde vetzuren vals-positieve resultaten kunnen geven. Vrije vetzuren komen eveneens in het te injecteren mengsel voor en zijn erg moeilijk van de toxines te scheiden (19).

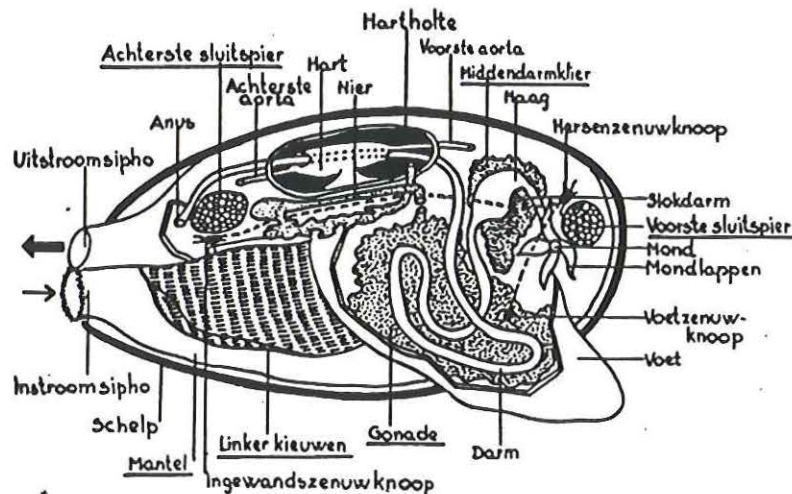


fig 6 : doorsnede van een mossel

3.3.1.3 Semi-biologische methode

In plaats van de muistest is er nu een semi-biologische methode ontwikkeld die gebruik maakt van de zure fosfatase-activiteit van *Tetrahymena pyriformis*. De methode gaat als volgt :

Hepatopancreassen van schelpdieren worden geëxtraheerd met aceton en ether. Deze fracties worden op een kiezelzuurkolom gebracht. Deze kolom wordt geelueerd met ether-methanol (40:1) en ether-methanol (1:1). In de tweede fractie zitten de toxines. Vanuit deze tweede fractie wordt een verdunningsreeks gemaakt. Deze verdunningen worden toegevoegd aan een groeimedium voor *T. pyriformis*. Het medium wordt geïnoculeerd met ongeveer 4000 cellen en gedurende 24 uur vindt groei plaats. Hierna worden de cellen vernietigd en wordt enzymatisch de zure-fosfatase activiteit bepaald. De concentratie waarbij 50 % vermindering van die activiteit optreedt wordt de APIC 50 (50 % Acid Phosphatase Inhibitory Concentration) genoemd en is equivalent aan 1 MU (20). Een nadeel bij deze methode is de lange groeiperiode, de hoeveelheid toxine kan wel nauwkeurig bepaald worden.

3.3.2 Chemische methodes

Aangezien er wereldwijd nogal wat ethische bezwaren bestaan tegen het gebruik van dierproeven, zijn er in de loop der jaren een aantal chemische methodes ontwikkeld. Bovendien kunnen de biologische methodes geen onderscheid maken tussen de verschillende toxines, iets wat met chemische methodes wel te realiseren is.

Als chemische methodes bestaan er drie verschillende chromatografische technieken om de toxines aan te kunnen tonen. De oudste is de dunnelaagchromatografie, gevolgd door gaschromatografie en HPLC (hoge prestatie vloeistof chromatografie). De verschillende methodes zullen hieronder kort besproken worden. Bij deze methodes is het echter wel nodig om uit de schelpieren door middel van extractie met verschillende vloeistoffen de toxines te isoleren.

3.3.2.1 TLC of dunnelaagchromatografie

Voor de dunnelaagchromatografie wordt gebruik gemaakt van silicagel platen, waarop het te onderzoeken mengsel wordt gebracht. Deze platen worden in een loopvloeistof gezet, die loopvloeistof gaat omhoog en trekt de verschillende componenten uit het extract met verschillende snelheid mee omhoog.

Voor de DSP-toxines zijn er twee TLC-methodes beschikbaar, de ene gaat uit van twee loopvloeistoffen, de andere maar van een loopvloeistof. De detectie is bij beide methodes hetzelfde, namelijk besproeien met 50 % zwavelzuur in methanol. Dit reagens kleurt vele organische stoffen zwart, zo ook de DSP-toxines. Met behulp van standaard toxines kunnen de toxinevlekken geïdentificeerd worden (9,13).

Met standaard toxines gaat de methode goed, maar na het sproeien van een plaat met mosselextract ontstaat er een groot aantal vlekken. Nu is het mogelijk een patroon van

dergelijke vlekken met een zgn TLC-scanner op te nemen. Een TLC-scanner is een apparaat dat de kleurintensiteit opmeet en deze in een grafiek uitzet (een zgn densitogram). Door nu een densitogram van een blanco mossel in een computer op te slaan is het mogelijk om andere densitogrammen hiermee te vergelijken. Het idee is dan dat giftige mosselen een significant ander patroon vertonen en zo dus afwijken van het standaard densitogram. Door nu een partij mosselen op te werken en de densitogrammen te vergelijken zouden giftige mosselen dus herkend kunnen worden. Deze methode, patroonherkenning genaamd, is een snelle en eenvoudig uit te voeren test, echter er zijn twee nadelen aan verbonden; een mossel-extract geeft veel stoorvlekken (en dus stoorpieken in een densitogram) en de detectiegrens ligt te hoog. Hierdoor zou het mogelijk kunnen zijn dat giftige mosselen met een lage concentratie toxine veilig worden bevonden. Deze nadelen zijn misschien te verhelpen door een andere opwerkingsmethode, zodat er minder stoorpieken ontstaan en door gebruik te maken van een selectiever sproeireagens (72).

3.3.2.2 Gaschromatografie

Voor de gaschromatografie moeten de DSP-toxines uit het extract eerst vluchtig gemaakt worden om door de kolom gevoerd te kunnen worden. Dit vluchtig maken gebeurt door een reactie van de zuurgroep met diazomethaan, waarna de methaangroep gesylileerd wordt met Trisil 'Z' (of een ander sylileringsreagens). Het reactieproduct is nu vluchtig genoeg om op een OV 101 kolom bij 320 °C gescheiden te worden van de mosselmatrix (10).

Behalve dat de gaschromatografische methode een stuk gevoeliger is dan de TLC-methode is het grote voordeel dat met deze methode de hoeveelheid toxine ook kwantitatief bepaald kan worden. De detectielimiet van de gaschromatografie is echter nog steeds betrekkelijk hoog, zodat er gezocht is naar een wat gevoeliger kwantitatieve methode. Dit leidde tot onderstaande HPLC-methode.

3.3.2.3 HPLC

Voor de bepaling van de DSP-toxines is er in Japan een HPLC-methode ontwikkeld. Deze methode gaat uit van hetzelfde principe als de gaschromatografische methode, namelijk derivatisering van de toxines in het extract met een diazoverbinding.

Het principe van de methode is als volgt: vanuit de mossel worden de toxines geextraheerd en in chloroform opgelost. Aan deze chloroformoplossing wordt een derivatiseringsreagens toegevoegd, in dit geval 9-anthryldiazomethaan (ADAM, zie Hoofdstuk 5), waarna het geheel 1 uur in het donker moet derivatiseren. Hierna wordt het mengsel op een reversed-phase kolom gebracht en geelueerd met een acetonitril/methanol/water-mengsel. De detectie vindt plaats met een fluorescentiedetector (3,8,25).

Aangezien ik in dit onderzoek uit ben gegaan van deze methode staat de exacte methode beschreven in Hoofdstuk 6.

4 PSP OF PARALYTISCHE SCHELPIEDIERVERGIFTIGING.

4.1 Voorkomen van PSP

PSP komt over de gehele wereld voor, zowel in tropische als in gematigde gebieden. De meeste uitbraken komen voor langs de westkust van de VS en Canada. Ook de Noordzee is een gebied met hoge incidentie. Incidentele gevallen zijn gemeld over de gehele wereld. Per jaar worden ongeveer 1600 mensen ziek, waarvan er meer dan 300 sterven. Preciese cijfers echter ontbreken. Een van de grootste uitbraken vond in 1977 in Venezuela plaats. Bij deze uitbraak waren 326 mensen betrokken, waarvan er 18 overleden (39).

Aan de andere kant van de Noordzee, in Noordoost Engeland en Schotland is PSP een jaarlijks terugkerend verschijnsel, ieder jaar worden er wel giftige mosselen gevonden (24).

Ook in Duitsland (Wilhelmshaven), Noorwegen (Oslofjord), Frankrijk (Calais) en België zijn gevallen beschreven (24). De meest wijdverspreide uitbraak van PSP vond plaats in oktober/november 1976 in Spanje, Frankrijk, Zwitserland, Duitsland en Italië. Deze uitbraak vond zijn oorsprong in Vigo (Spanje). Giftige mosselen werden van daaruit naar genoemde landen geëxporteerd, met alle gevolgen van dien (24).

Hoewel PSP tot nu toe nog niet onder Nederlandse schelpdieren is voorgekomen is het absoluut niet ondenkbaar dat het niet voor zou kunnen komen. Ook zou het mogelijk kunnen zijn dat er buitenlandse, vergiftigde, mosselen in Nederland uitgezet worden, waardoor de ziekte hier ook regelmatig voor kan gaan komen.

4.1.1 Symptomen van PSP

De symptomen van PSP zijn van neurotoxische aard. De eerst optredende symptomen zijn een tintelend en brandend gevoel in lippen, tong en gezicht. Dit gaat over op de nek en de ledematen. Deze symptomen verergeren langzaam tot er verlammingen van de ledematen ontstaan. Verdere symptomen (kunnen) zijn : moeilijkheden met spreken en slikken, zwakte, duizeligheid, hoofdpijn, speekselproductie, dorst en blindheid. Maagdarmlaasten of mentale problemen zijn afwezig. Dood kan optreden als de ademhalingspijpen verlamd raken. De symptomen treden erg vlug op, al na zo'n 30 minuten na consumptie van het schelpdier. Behandeling is (nog) niet mogelijk, wel kan er kunstmatige ademhaling e.d. toegepast worden.

Aangenomen kan worden dat als een patient de eerste 12 uur van zijn ziekte overleeft, hij goed zal herstellen. Bij PSP patienten is, na genezing, nog nooit enig blijvend letsel aangetoond.

De symptomen van PSP komen sterk overeen met de symptomen van botulisme en tetrodotoxinevergiftiging. Dit is het gevolg van de overeenkomstige werking op de natriumkanalen van het zenuwstelsel. De PSP-toxines en tetrodotoxine werken in op dezelfde receptor, de receptor van de botulisme toxines is nog niet bekend, maar zal gezien de structuur van deze toxines (grote eiwitstructuren), niet dezelfde zijn (40).

4.1.2 Oorzaken van PSP

PSP wordt veroorzaakt door een aantal (18) toxines, geproduceerd door dinoflagellaten van de geslachten *Gonyaulax* en *Pyrodinium*. De meeste uitbraken worden veroorzaakt door leden van het geslacht *Gonyaulax* (het geslacht *Gonyaulax* wordt door sommige taxonomen inmiddels onderverdeeld in een aantal andere geslachten, zoals *Protogonyaulax*. De meeste literatuur over PSP gebruikt nog de oudere namen, zodat in dit verslag ook de oude naamgeving wordt gehanteerd), waarbij *G. catenella* verantwoordelijk is voor de uitbraken in Amerika en Japan. *G. tamarensis* zorgt in Europa voor de problemen, terwijl *G. tamarensis* var. *excavata* in Japan uitbraken veroorzaakt.

P. bahamense var. *compressa* zorgt voor uitbraken in Indonesië en omstreken en *P. phoneus* is in Europa verdacht.

Er zijn vele soorten schelpdieren bekend, die PSP-toxines kunnen bevatten, hieronder vallen ook leden van de in Nederland gekweekte en gegeten schelpdiergeslachten *Mytilus* (mossel), *Cardium* (kokkel) en *Ostrea* (oester) (28).

Evenals bij tetrodotoxine zijn de PSP-toxines aangetoond in andere diergroepen, zoals slakken (28), krabben (22) en vissen, vooral de in Japan veel gegeten koffervissen (26,27) en makrelen (22).

Het is niet zeker of de toxines in vissen terecht komen door consumptie van dinoflagellaten of van schelpdieren, er zijn in koffervissen zowel resten van schelpdieren als van dinoflagellaten aangetroffen (26).

4.2 De PSP toxines

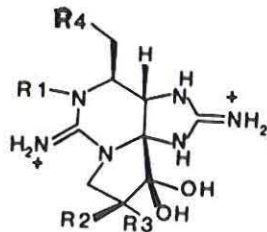
Inmiddels zijn er 18 verschillende PSP toxines bekend, waarvan de structuur ook is opgehelderd. De structuur van de toxines staat in fig 7. Het meest bekende toxine, het saxitoxine, werd als eerste geïsoleerd uit de, aan de westkust van Noord-Amerika veel gegeten, schelp *Saxidomus giganteus*. De ontdekking van saxitoxine uit *S. giganteus* is zeer toevallig, daar *S. giganteus* een van de weinige schelpdieren is die maar een type toxine bevatten. Door deze eigenschap van *S. giganteus* was de structuuropheldering van de toxines een stuk eenvoudiger (29).

De structuur van de toxines is inmiddels door synthese bevestigd (30,32). Tevens is inmiddels de biosynthese van de toxines grotendeels opgehelderd. Het uitgangspunt van de toxines bleek het aminozuur arginine te zijn. De opheldering van de biosynthese was een moeizaam proces, aangezien de synthese op een aantal ongewone reacties berust (31).

Zoals in 4.1.1 al is vermeld werken de PSP-toxines (en het tetrodotoxine) in op de natriumkanalen van het zenuwstelsel. Deze kanalen transporteren natrium-ionen in en uit de zenuwvezel en verzorgen zo de impulsoverdracht. Zowel de PSP-toxines als het tetrodotoxine bevatten een reactieve guanido-groep ($(\text{NH}_2)\text{-C}=\text{NH}_2$) (zie ook fig 2 en 7), die een competitie aangaat met de natrium-ionen met een negatieve groep aan het natriumkanal. Daar de binding van de guanido-groep sterker is dan die van het natrium, is het gevolg dat de toxines het natrium verdringen en daardoor het

natriumtransport verhinderen. Hierdoor kan er geen (zenuw)impulsgeleiding meer plaatsvinden en wordt de zenuw geïnactiveerd (73).

De toxines hebben overigens geen invloed op de schelpdieren of vissen waarin ze gevonden worden (26,42). Andere dieren, zoals vogels en zoogdieren ondervinden daarentegen wel degelijk last (22).



R1	R2	R3	Carbamate Toxins	N-Sullocarbamoyl Toxins	Decarbamoyl Toxins
H	H	H	STX	B1	dc-STX
OH	H	H	NEO	B2	dc-NEO
OH	H	OSO ₃ ⁻	GTX I	C3	dc-GTX I
H	H	OSO ₃ ⁻	GTX II	C1	dc-GTX II
H	OSO ₃ ⁻	H	GTX III	C2	dc-GTX III
OH	OSO ₃ ⁻	H	GTX IV	C4	dc-GTX IV
			R4: 	R4: H 	R4: HO-

STX = saxitoxine, GTX = Gonyautoxine, NEO = Neosaxitoxine

fig 7 : structuren van de PSP-toxines (uit 56)

De toxines zijn uitermate toxisch; de lethale dosis saxitoxine varieert voor een mens van 0,5 tot 4 mg na orale opname, deze hoeveelheid kan in een giftige mossel gemakkelijk aanwezig zijn.. De LD 50 (lethale dosis) voor in het buikvlies geïnjecteerde muizen is ongeveer 10 ug/kg lichaamsgewicht (35,40).

De maximale concentratie PSP-toxines (uitgedrukt in saxitoxine-eenheden) mag dan ook ten hoogste 80 ug/100 gram (0,8 ppm) schelpdiervlees bedragen (dit komt overeen met ongeveer 400 MU, zie 3.3.1).

Uitgaande van een toxiciteit van 100 voor saxitoxine kunnen voor de andere toxines waarden voor de toxiciteit berekend worden. Deze worden dan uitgedrukt in saxitoxine-eenheden, zie onderstaande tabel).

Tabel 3 Specifieke toxiciteit van de PSP-toxines

toxine	Saxitoxine-eenheden
STX (saxitoxine)	100
NEO (neosaxitoxine)	100
GTX-I (gonyautoxine 1)	73
GTX-II	42
GTX-III	67
GTX-IV	27
B1	<5
B2	9
C1	6
C2	2

Voor de overige toxines (C3-4 en de dc-toxines), worden geen waarden vermeld.(33,54)

De toxines zijn tevens zeer hitteresistent. De D 250 waarde (dit is de tijd die nodig is om bij 250 °C de hoeveelheid toxine met 90 % te reduceren) bedraagt 71.4 minuten. Vergeleken met bijvoorbeeld Clostridium botulinum- en Staphylococcus aureus-toxines scheelt dat respectievelijk een factor 700 en 7. Uit deze D 250 waarde volgt dat het ondoenlijk is om de toxines uit levensmiddelen te verwijderen door hittebehandeling, van het voedingsmiddel blijft niet erg veel meer over (52).

4.3 Aantonen van de toxines

In tegenstelling tot de DSP-toxines blijven de PSP-toxines veel langer in het schelpdier aanwezig (enkele maanden). Hierdoor is het niet voldoende om het zeewater te screenen op dinoflagellaten en dan pas de schelpdiermonsters te gaan keuren. Er is dus bijna het gehele jaar door een continue stroom schelpdiermonsters, die gekeurd moeten worden. Een snelle analysemethode voor de bepaling van de toxiciteit is hierdoor gewenst. Daarom zijn er in de loop der jaren een groot aantal methodes ontwikkeld, die hieronder kort behandeld zullen worden.

4.3.1 Muistest

De meest gebruikte manier om de toxiciteit van een monster te bepalen is nog steeds met behulp van de (baby-)muistest. Deze test gaat als volgt :

Was de schelpen eerst grondig van buiten, open dan de sluitspieren en was de schelp ook van binnen om zand en dergelijke te verwijderen. Scheidt het vlees van de schelp. Laat het vlees (100-150 g) uitlekken op een zeef en maal het uitgelekte vlees tot een homogene massa is ontstaan. Weeg 100 gram gehomogeniseerd vlees af en voeg 100 ml 0.1 N HCL toe. Zorg ervoor dat de pH < 4.0 is, liefst rond de 3.0. Laat 5 minuten koken en afkoelen tot kamertemperatuur. Breng de pH tussen 2.0 en 4.0 met 5 N HCL of 0.1 N NaOH. Verdun tot 200 ml. Roer tot de massa homogeen is en laat bezinken. Gebruik helder supernatant (eventueel centrifugeren) om de test uit te voeren. Spuit muizen intraperitoneaal in met 1 ml zuur extract. Noteer injectietijd en overlidestijdstip. Zorg door verdunning dat de doodstijd tussen 5 en 7 minuten ligt. Stel bij verdunnen pH op 2.0-4.0. Bij doodstijden > 7 minuten maak dan van meer muizen gebruik. Bepaal de mediale doodstijd en lees uit bijlage 2 tabel 1 het aantal mouse-units (MU) af. Gebruik alleen standaardmuizen met een gewicht tussen 19 en 21 gram. Voor andere gewichten corrigeren d.m.v. bijlage 2 tabel 2. Reken MU om tot ug/ml met behulp van een conversiefactor, verkregen uit experimenten met standaardoplossingen (hieruit volgt meestal dat een MU rond de 0,2 ug saxitoxine is) en reken om tot ug gif/100 g vlees (34).

Aan deze methode kleven nogal wat bezwaren. Dit zijn enerzijds ethische bezwaren, anderzijds is de test tijdrovend, niet erg nauwkeurig en geeft geen inzicht in de samenstelling en onderlinge verhouding van de toxines in het mengsel. Daarom zijn er in de loop der jaren een hoeveelheid

chemische testen ontwikkeld, die hieronder behandeld zullen worden.

4.3.2. Chemische methoden m.u.v. HPLC methoden

De eerste chemische methodes hielden een koppeling van saxitoxine met een aantal uiteenlopende chemicalien in, zoals picrinezuur en 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeen. Deze methodes gaven geen verbetering ten opzichte van de muistest te zien en waren aldus niet bruikbaar (35).

De eerste methode die een verbetering van de muistest inhield werd in 1975 ontwikkeld door Bates en Rapoport. Zij gingen uit van het enige jaren eerder door Wong et al ontdekte gegeven, dat bij behandeling van saxitoxine met basisch waterstofperoxide er een fluorescerende verbinding ontstaat, het 8-amino-6-hydroxymethyl-2-iminopurine-3(2H)-propionzuur (fig 8a). De fluorescerende eigenschappen bleven bewaard na zuurtoevoeging en ringsluiting (fig 8b).

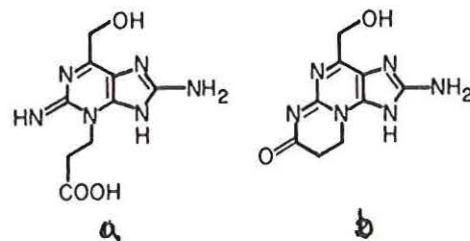


fig 8 fluorescerende afbraakprodukten van saxitoxine (uit 35)

De methode hield dan ook extractie van het toxine uit schelpdieren in, gevolgd door behandeling met waterstofperoxide. Deze oplossing werd in een cuvet gebracht en de fluorescentie werd gemeten. De methode, alleen toegepast voor saxitoxine hield een verbetering van de gevoeligheid ten opzichte van de muistest in met een factor 100 (35). Bovenstaande methode is later nog bijgewerkt, hoofdzakelijk in het opwerkingsgedeelte. De essentiële detectie bleef hetzelfde (36,38,39).

Buckley et al ontwikkelden in 1976 de eerste chromatografische methode. Dit was een dunnelaag chromatografische techniek, met als detectiemethode sproeien met basisch waterstofperoxide, gevolgd door metingen van de fluorescentie (44).

Deze methode is later uitgewerkt tot een HPLC methode (zie 4.3.3), ook bleken andere toxines (de gonyautoxines) met deze methode te detecteren te zijn (38,44)

Oxidatie van saxitoxine onder zure omstandigheden met biacetyl gaf eveneens een meetbaar (colorimetrisch) reactieprodukt, maar was minder gevoelig (55).

Als laatste fluorescentiemethode dient de methode van Mosley et al genoemd te worden. Zij combineerden de Bates en Rapoport detectie met de Folin-Ciocalteu detectie voor polyfenolen. Hierdoor werd de respons van de N-1 hydroxytoxines (NEO, GTX I + IV, B2, C3 en C4) verhoogd, de detectielimiet werd daardoor iets verlaagd (41). De methode was echter

nogal bewerkelijk en dus moeilijk toepasbaar voor routine-analyse.

Een hele andere aanpak kwam in 1984 van Davio en Fontelo. Deze methode is gebaseerd op de competitie tussen saxitoxine (of tetrodotoxine) moleculen op receptoren in ratten-zenuwvezels. Door nu dergelijke vezels te verzadigen met ^3H -saxitoxine, monster toe te voegen, de uitwisseling plaats te laten vinden en het vrije ^3H -saxitoxine te bepalen, kan een indruk verkregen worden van de hoeveelheid saxitoxine in het monster. Deze methode is betrekkelijk gemakkelijk te ijken met een standaardreeks saxitoxine. De methode is zeer gevoelig; 0.5 ng STX/ml monster is goed aantoonbaar.

Interactie met andere typen toxines is vrijwel uitgesloten, gezien de specifieke bindingsplaats van de toxines. Andere PSP-veroorzakende toxines zijn wel aantoonbaar, onderscheid echter niet. Verder dienen de reactieomstandigheden nauwkeurig in stand gehouden te worden (40).

Weer een andere aanpak gaat uit van immunologische technieken. Chu en Fan (1985) ontwikkelden als eersten een goed bruikbare ELISA, reagerend op saxitoxine. Konijnen werden aangezet tot antilichaamproductie, na injectie met een saxitoxine-runder-serum-albumine-complex. Dit complex wordt op een ELISA-plaatje gecoat, waarna toxine en antitoxine worden toegevoegd. De hoeveelheid gebonden antitoxine wordt bepaald door anti-antilichamen, gecomplexeerd met een enzym, toe te voegen. Hierna worden reagentia toegevoegd, die door het enzym in gekleurde produkten worden omgezet. De detectielimiet bij deze test ligt op 25 pg per test (42).

Deze ELISA is inmiddels iets verbeterd, de detectiegrens is verlaagd en men is nu bezig met monoclonale antilichamen in plaats van de polyclonale antilichamen van de oorspronkelijke test (43). Het grote nadeel van deze test is echter dat het alleen werkt op saxitoxine, niet op de andere toxines.

4.3.3 HPLC-methoden

Aangezien bovenstaande chemische methodes of niet erg goed toepasbaar zijn in routineanalyses of geen onderscheid kunnen maken tussen de verschillende toxines (dit is nodig, omdat de toxines een verschillende toxiciteit hebben), werd er naar een methode gezocht die en een lage detectiegrens heeft en goede scheiding teweeg kan brengen. Hiervoor liggen gas- of vloeistofchromatografische methodes voor de hand.

De eerste HPLC-methode voor het aantonen van de PSP-toxines werd in 1978 door Buckley et al (45) toegepast. Deze methode is een voortzetting op de dunnelaag chromatografische methode, eveneens van Buckley et al (44). De methode gaat uit van een gelpermeatiekolom gevolgd door een post-column derivatisering. Deze derivatisering behelst basische oxidatie van de toxines met waterstofperoxide, gevolgd door zuurtoevoeging en fluorescentiedetectie. De toxines kwamen allemaal rond dezelfde tijd uit de kolom, zodat er geen scheiding tussen de toxines gemeten werd. Wel kon de in monsters verkregen piek gebruikt worden om de toxiciteit te bepalen, daar de verschillende piekbijdragen opgeteld konden

worden. Hoewel dus nog verre van ideaal, was de methode minder intensief dan de muistest (45).

Uitgaande van bovenstaande methode ontwikkelden Sullivan en Iwaoka in 1983 een HPLC-methode, waarin de volgende veranderingen waren aangebracht; zij gebruikten een andere kolom (cyano- of aminokolommen) en een gradientelutiesysteem, zodat de toxines van elkaar gescheiden konden worden. Ook oxideerden zij met perjoodzuur in plaats van met waterstofperoxide, waardoor er minder storende gasbellen (door ontleding van het waterstofperoxide ontstaan er zuurstofbelletjes) ontstonden. De verschillende eluentia waren bovendien verschillend gebufferd, zodat de verschillen in retentietijd voor een groot gedeelte door pH-verschillen veroorzaakt werden (46).

Hoewel de methode niet voor alle toxines goede detectiemogelijkheden bood, werd er goede scheiding verkregen en was de correlatie met de muistest goed, alleen bij hoge toxiciteit was de correlatie slechter (47).

Tegelijkertijd ontwikkelden Oshima et al (51) in Japan een vergelijkbare methode, die op een aantal punten afweek van de methode van Sullivan en Iwaoka: de oxidatie vond plaats met tert-butyl-hydroperoxide en er werd geen zuur toegevoegd. De kolom was ook geen cyanokolom maar een kationenwisselaar. Ook bij deze methode werd een goede scheiding en respons verkregen. Het grote nadeel van deze methode was echter de bewerkelijke opwerking van schelpdiermonsters (51).

De methode van Sullivan en Iwaoka is later verbeterd door gebruik te maken van een ion-pair-kolom. Dit is een soort rephersed phase kolom, die een aantal speciale eisen aan de loopvloeistoffen (aanwezigheid van zogenaamde ion-pair reagentia) stelt. Voor het principe van ion-pair HPLC zie o.a. de artikelen van Iskandarani en Pietrzyk en van Smith en Pietrzyk (74,75). Als ion-pair reagentia werden hexaan- en heptaansulfonzuur gebruikt. Verder werden de mobiele fases iets veranderd. Het geheel had tot gevolg dat de gevoeligheid van de methode sterk omhoog ging en een factor 400 gevoeliger is dan de muistest (48). De methode is later niet noemenswaardig veranderd, de correlatie met de muistest is goed (56) en kan gekoppeld worden aan een autoanalyser voor continue analyse (33,49).

Ook is de methode gebruikt om de toxineproductie van (Proto)gonyaulax-soorten in vitro aan te tonen (50).

Als onderdeel van deze afstudeeropdracht heb ik getracht deze laatste methode ook in Nederland op te starten. De resultaten hiervan en de preciese beschrijving staan beschreven in hoofdstuk 8.

5 ADAM OF 9-ANTHRYLDIAZOMETHAAN

Bij de HPLC-methode voor de bepaling van de DSP-toxines wordt gebruik gemaakt van een derivatisering om het molecuul zichtbaar te maken voor een fluorescentiedetector. De enige groep in de toxines die zich daar in principe goed voor leent is de zuurgroep. In dit hoofdstuk worden dan ook de verschillende mogelijkheden en eigenschappen van het derivatiseringsreagens besproken.

5.1 Derivatiseren van carboxylgroepen

Voor het maken van fluorescerende derivaten van zuurgroepen in het algemeen en vetzuren in het bijzonder, zijn vele reacties bekend. Gebruikt zijn en worden o.a. de volgende derivatiseringsreagentia: 4-bromomethyl-7-methoxycoumarine (Brmmc), 4-bromomethyl-7-acetoxycoumarine (Brac), 4-bromomethyl-6,7-dimethoxycoumarine (Brmdc), dansyl-ethanolamine (Dns-ea), 9- en 9,10-(di)-aminophenanthreen (9-AP en 9,10-DAP), 9-hydroxy-methylantraceen (HMA), 9-chloromethylantraceen (CMA), 9-anthryldiazomethaan (ADAM) en 1-bromoacetopyreen (BAP) (76-84).

De reactieomstandigheden, reactietijden en -temperaturen en het wel of niet aanwezig zijn van activator of katalysator (resp nodig om de te derivatiseren stof om te zetten tot een beter derivatiseerbaar produkt en om de reactie te laten verlopen) zijn voor de verschillende reagentia nogal verschillend; in onderstaande tabel worden enkele eigenschappen besproken.

Tabel 4 Eigenschappen derivatiseringsreagentia

reagens	acti- vator	kataly- sator	tijd/temp combinatie	c.v.')	opmerkingen
Br-mmc	-	+		+	absoluut water- vrije condities
Br-ac	-	+	1 uur 80 °C	?	
Br-mdc	-	+		?	veel storende pieken
Dns-ea	+	-	kT') > 3 uur	-	
HMA	+	+		+	
BAP	-	+	30 min 40 °C	?	veel storende pieken
9-AP	+	-	45 min 70 °C	+	
9,10-DAP	+	-	3-6 min 80 °C	+	geen -OH in molecuul
ADAM	-	-	kT > 30 min	+	veel storende pieken
9-CMA	+	-	15 min 75 °C	+	

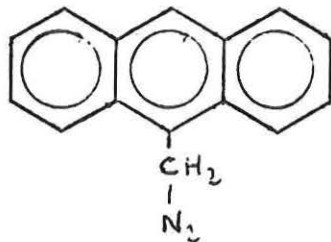
') c.v. = commercieel verkrijgbaar, kT = kamertemperatuur

Voor de snelle derivatisering van okadainezuur als routineanalyse gaat de voorkeur uit naar een eenvoudige derivatisering met een simpel te maken of commercieel verkrijgbaar reagens. Hierbij is gekozen voor het reagens

9-anthryldiazomethaan (ADAM) wat bij kamertemperatuur met zuurgroepen reageert met een derivatiseringstijd van enkele minuten tot enkele uren. Bij de reactie zijn geen activatoren of katalysatoren nodig en tevens is dit reagens commercieel verkrijgbaar bij Funakoshi Chemical Company te Tokyo.

Hierdoor is de reactie geschikt voor routineanalyses in een laboratorium (simpel, goedkoop, snel).

ADAM (zie fig 9) bestaat uit een zeer reactieve diazogroep gekoppeld aan een sterk fluorescerende anthraceengroep. De diazogroep reageert sterk op (vet-)zuren (vergelijk het in de gaschromatografie veel gebruikte reagens diazomethaan), zodat deze verbinding uitermate geschikt is voor het derivatiseren van zuren tot fluorescerende verbindingen.



rode vaste stof
ontleding 64-66 °C
IR abs. 2070 cm⁻¹ voor diazogroep

fig 9 : structuur en gegevens ADAM (uit 58)

ADAM werd in 1966 voor het eerst gesynthetiseerd door Nakaya et al (57), zij gaven echter geen directe toepassingen voor ADAM aan.

De eersten die gebruik maakten van ADAM als derivatiseringsreagens waren Barker et al (58) en Nimura en Kinoshita (59) in 1980. Beide groepen onderzoekers derivatiseerden vetzuren, met een ketenlengte variërend van C8 tot C 20. Later is ADAM nog gebruikt voor de derivatisering van vetzuren in bloedserum (60) en -plasma (61), voor vetzuren in bloed gebonden aan albumine (62), voor de scheiding van een meervoudig onverzadigd vetzuur uit de vetzuurfractie van het bloed van eskimos (63), voor diergeneesmiddelen (monensin, salinomycine, narasin en lasalocid) (64-66), voor prostaglandines (67), voor oxaalzuur in urine (68), voor aminozuren (69) en voor okadaïnezuur en verwante toxines (3,8,25)

5.2 ADAM-synthese

Hoewel ADAM tegenwoordig commercieel verkrijgbaar is verdient het uit praktische overwegingen de voorkeur om de ADAM zelf te synthetiseren. De levertijd van het ADAM uit Japan bedraagt enkele maanden, terwijl de zuiverheid van het Japanse mengsel te wensen overlaat (61,66).

De synthese is een tweestaps synthese uitgaande van 9-anthraldehyde (zie fig 10). De eerste stap is de omzetting van het aldehyde in een hydrazon, wat in de tweede stap geoxideerd wordt tot een diazoverbinding (57). Na de eerste stap worden gele naaldvormige kristallen van het hydrazon verkregen. De tweede stap behelst de oxidatie van het hydrazon tot de corresponderende diazoverbinding. Hierbij zijn twee manieren in de literatuur beschreven, namelijk de oorspronkelijke versie met geel kwik(1)oxide van Nakaya et

al (57) en de versie met geactiveerd mangaandioxide door Barker et al (58). De beide methodes verschillen niet veel in het uiteindelijke reactieproduct, de methode met mangaandioxide is echter veel sneller (ongeveer 6x zo snel), bovendien is mangaandioxide gebruikersvriendelijker dan kwikoxide.

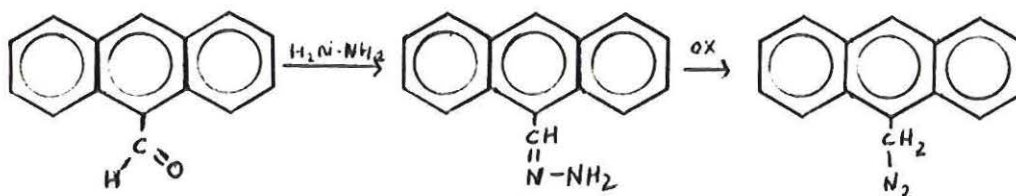


fig 10 : synthese ADAM (uit 57/58)

Bij beide methodes wordt een rood-gele etheroplossing verkregen, waaruit na droogdampen rode kristallen of een rode pasta van ADAM verkregen wordt. Dit ADAM kan in een met aluminiumfolie bekleed flesje in de vriezer bewaard worden. Hoewel het geactiveerde mangaandioxide commercieel verkrijgbaar is, maken de meeste onderzoekers het mangaandioxide zelf volgens de methode van Attenburrow et al (70) uit mangaansulfaat en kaliumpermanganaat. Het commerciële product is waarschijnlijk niet zuiver of sterk genoeg voor de ADAM-synthese. Bij de synthese wordt een zwart-bruine vaste stof verkregen die goed gebruikt kan worden bij de oxidatie van het hydrazon.

5.3 Stabiliteit van ADAM

Over de stabiliteit van ADAM lopen de meningen sterk uiteen. Men is er in ieder geval van overtuigd dat het ADAM in de tijd niet stabiel is en dat de stabiliteit bij oplopende temperatuur afneemt. Tevens is ADAM gevoelig voor U.V.-straling, zodat in licht ook sneller afbraak plaatsvindt. Nakaya et al (57) geven geen enkele informatie over de stabiliteit van ADAM, alleen geven ze aan dat ADAM bij 63-64 °C ontleedt onder afstoting van stikstof.

Barker et al (58) zijn de eersten die gegevens leveren over de stabiliteit van hun ADAM. Zij bewaarden hun ADAM als vaste stof bij twee verschillende temperaturen, namelijk bij 25 °C (in licht) en -76 °C. Bij de eerste temperatuur vonden zij een halfwaardetijd van ongeveer een week, terwijl ze bij -76 °C geen afname van ADAM zagen na een maand.

Martinez en Shimoda (64,65) geven aan dat ADAM in de koelkast ongeveer 30 dagen houdbaar is, hierbij wordt niet vermeld of het gaat om de vaste stof of om een oplossing.

Takatsuki et al (66) geven aan dat bij kamertemperatuur in licht een oplossing van ADAM in ether na een dag een groot deel van zijn werking heeft verloren. Hierbij geven ze geen percentage aan. Tevens hebben zij kristallen en een etheroplossing bij -20 °C bewaard en vonden bij de kristallen een halfwaardetijd van een maand, terwijl bij de etheroplossing na meer dan 5 maanden geen verlies was opgetreden.

Lee et al (25) vonden echter dat ADAM bij -25 °C als vaste stof maar enkele maanden stabiel was. Een oplossing van 0.1 % ADAM in methanol was bij -20 °C maar een week houdbaar.

Ichinose et al (63) tenslotte vonden dat een oplossing van 0.05 % van ADAM in methanol bij -10 °C ongeveer 10 uur houdbaar was. Zie ook tabel 5.

Tabel 5 : Stabiliteit van ADAM onder verschillende bewaarcondities.

<u>ADAM als :</u>	<u>temperatuur</u>	<u>houdbaarheid</u>	<u>bron</u>
vaste stof (in licht)	20 °C	7 dagen	58
vaste stof	-76 °C	>> 1 maand	58
onbekend	5 °C	1 maand	64,65
etheroplossing (in licht)	20 °C	1 dag	66
vaste stof	-20 °C	1 maand	66
etheroplossing	-20 °C	>> 5 maanden	66
vaste stof	-25 °C	enkele maanden	25
methanoloplossing (0.1%)	-20 °C	1 week	25
methanoloplossing (0.05%)	-10 °C	10 uur	63

Hoewel de gegevens niet geheel in overeenstemming met elkaar zijn, geven ze wel aan dat ADAM niet onbeperkt houdbaar is en er dus regelmatige controle van de ADAM nodig is. De moeilijkheid hierbij is echter het ontbreken van een bepalingsmethode voor de hoeveelheid ADAM in het mengsel van ADAM met bij- en vervalprodukten. Geen van de auteurs geeft aan hoe zij de halfwaardetijd of de stabiliteit van hun ADAM of -oplossingen bepaald hebben.

Waarschijnlijk is de afnametijd van ADAM iedere keer bepaald door te kijken naar het derivatiserend vermogen van de oplossing; goede derivatisering en weinig stoorpieken geeft dan een goed werkende ADAM-oplossing. Hoewel een dergelijke methode een beeld kan geven van de hoeveelheid aanwezige ADAM is er over de absolute hoeveelheid ADAM weinig te zeggen. Bovendien kan een ADAM-oplossing voor het ene doel nog wel geschikt zijn, terwijl de oplossing voor een ander doel inmiddels ongeschikt is. De ene stof reageert namelijk veel gemakkelijker met ADAM dan de andere, variërend van direct (met azijnzuur) tot een derivatiseringstijd van enkele uren voor monensin. Hoe meer bij- of vervalprodukten van ADAM in het mengsel aanwezig zijn, des te minder kans op een goede reactie en dus een langere derivatiseringstijd. Hierdoor kan een vertekend beeld van de stabiliteit ontstaan.

In dit onderzoek heb ik dan ook getracht een methode te ontwikkelen waarbij ADAM wel kwantitatief bepaald kan worden (zie hiervoor par. 7.2).

6 DSP (PRACTISCH)

6.1. Inleiding

Zoals in de Inleiding al is vermeld, is de opdracht van dit afstudeervak onder andere het in de praktijk brengen van een methode voor het aantonen van de DSP-toxines.

De meest toegepaste methode hiervoor is de methode, zoals die is beschreven door Lee et al (25). Deze methode gaat uit van de isolatie van middendarmklieren uit de mossel en de extractie van de toxines uit die middendarmklieren. Het resultaat hiervan is een chloroformextract van de toxines. Dit extract wordt drooggedampt en met ADAM gederivatiseerd. Het derivaat wordt vervolgens weer drooggedampt en, opgelost in hexaan-chloroform (1:1), op een Sep-Pak silicakolom opgebracht. Dit kolommetje wordt vervolgens gespoeld met hexaan-chloroform en chloroform. De toxine-derivaten worden vervolgens met chloroform-methanol (95:5) van de kolom gespoeld. Deze laatste fractie wordt opnieuw drooggedampt en het residu wordt opgelost in methanol, waarna injectie op het HPLC-systeem plaats kan vinden. De HPLC-condities zijn de volgende :

- kolom : Develosil ODS-5 (4,6 x 250 mm)
- eluens : acetonitril-methanol-water 8:1:1
- flowrate : 1.1 ml/min
- fluorescentiedetector met emissie bij 365 nm en excitatie bij 410 nm

Aan deze methode bleken in de praktijk nogal wat problemen vast te zitten, derhalve heb ik door middel van een aantal experimenten getracht de methode te optimaliseren.

In de volgende paragrafen zullen de verschillende stappen uit deze methode beschreven worden. Per stap zal eerst het voorschrift van Lee worden besproken, vervolgens de experimenten die ik bij de desbetreffende stap heb uitgevoerd, waarna het herziene voorschrift voor de gehele methode als bijlage is bijgevoegd.

6.1.1. Gebruikte chemicalien en apparatuur

aceton p.a.	(Merck no 14)
acetonitril p.a.	(Merck no 3)
ascorbinezuur	(Merck no 127)
chloroform p.a.	(Merck no 2442)
diethylether p.a.	(Merck no 921)
fosforzuur	(Merck no 573)
heptaanzuur p.a.	(Merck no 7579)
hexaan p.a.	(Merck no 4367)
hexaanzuur p.a.	(Merck no 197)
kaliumwaterstofcarbonaat	(Merck no 4854)
lasalocid-natriumzout	(Sigma L 9127)
methanol p.a.	(Merck no 6009)
monensin-natriumzout	(Sigma no M 5273)
narasin	-
nonaanzuur p.a.	(Merck no 818791)
octaanzuur p.a.	(Merck no 193)
okadainezuurstandaard	(Fujisawa Pharm Co)
oxaalzuur	(Merck no 495)
petroleumether kp 40-60 C	(Merck no 1775)
salinomycine	-
stikstofgas	-

water
ijs

(Millipore)

Apparatuur :

afzuigerlenmeyer 1000 ml
bekerglazen (div. maten)
maatcilinders (div. maten)
scheitrechters 25 ml
waterfiltratieglaswerk (Millipore)
WISP buisjes 4 ml (Waters)
WISP insertbuisjes 400 ul (Waters)
bovenweger
centrifuge
fluorescentiedetector (Waters 410 E en Aminco)
HPLC injectiekraan
HPLC injectiespuit (Hamilton)
HPLC kolom (Chrompack Lichrosorb RP-18 en Spherisorb ODS-2
kolommen, 100 x 3 mm)
HPLC pomp (ACS)
HPLC tubing (teflon en roestvrijstaal)
microliterpipetten (Gilson en Finnpipetten)
plastic wegwerpspuiten
Ultra-turrax mixer
vacuumpomp
wegwerpkolommetjes (Sep-Pak C18 en silica; Baker silica)
WISP injectieautomaat (Waters)

6.2 Derivatisering

Derivatisering van de DSP-toxines kan eigenlijk alleen maar aan de zuurgroep plaatsvinden. Zoals in Hoofdstuk 4 is beschreven is het derivatiseringsreagens ADAM hiervoor zeer geschikt.

Daar de derivatisering een van de moeilijkste stappen in de methode schijnt te zijn, dit bleek na contacten met andere onderzoekers die aan DSP onderzoek hebben doen in Frankrijk (IFREMER), Nederland (RIVO) en Denemarken, heb ik de volgende punten van de derivatisering onderzocht :

- derivatiseringsomstandigheden (6.2.1)
- derivatiseringstijd (6.2.2)
- derivatisering van standaardoplossingen (6.2.3)
- derivatisering met commerciële ADAM (6.2.4)
- derivatisering van monsters (6.2.5)
- derivatisering van andere stoffen (6.2.6)
- andere derivatiseringsreagentia (6.2.7)

6.2.1 Derivatiseringsomstandigheden

Onder derivatiseringsomstandigheden versta ik zuurtegraad, licht, aanwezigheid van andere chemicalien. Behalve over derivatisering in het donker wordt er in het voorschrift niet gesproken over bepaalde omstandigheden.

Ik heb een aantal mogelijke factoren onderzocht en gekeken wat het resultaat was.

Als eerste heb ik de zuurtegraad onderzocht. Het bleek dat bij toevoeging aan een mengsel van ADAM, heptaanzuur en

methanol (samen 295 ul) van 5 ul 0.75 M fosforzuur er geen derivatisering meer optrad. Er is hierbij gekozen om voor de derivatisering aan te vullen met methanol en dan pas zuur toe te voegen, omdat anders de concentratie zuur te hoog zou zijn. Zonder toevoeging had derivatiseren na aanvullen met methanol geen effect op het resultaat. Bij toevoeging van 5 ul 0.75 M kaliumwaterstofcarbonaat was hetzelfde resultaat waarneembaar. Waarom de derivatisering niet lukt en of de derivatisering niet lukt weet ik niet zeker. Er zijn twee mogelijke verklaringen voor te geven. De eerste is dat het ADAM onder dergelijke condities ontleedt, de tweede is dat het derivaat wel gevormd wordt, maar onder invloed van zuur of base direct weer uiteen valt.

Als tweede heb ik de invloed van licht onderzocht. Hieruit volgde dat de derivatiseringstijd in het licht iets langer is en dat er meer ADAM toegevoegd moet worden. Dit is allemaal volgens verwachting, daar ADAM onder invloed van licht ontleedt. De invloed van licht is echter sterk afhankelijk van de derivatiseringstijd, als de derivatiseringstijd lang is, is de invloed groter (de afname van de ADAM-concentratie

Als derde heb ik onderzocht of organische oplosmiddelen invloed hebben op de derivatisering. Het resultaat hiervan was dat de meeste oplosmiddelen of combinaties hiervan geen invloed hebben. Er is wel iets verschil in opbrengst, maar die verschillen zijn minimaal. Alleen een hoog waterpercentage (> 60 %) heeft duidelijk invloed; er vindt geen derivatisering meer plaats, daar ADAM niet in water oplosbaar is. Bij deze proeven werd ADAM als etheroplossing toegevoegd en bij waterige oplossingen was de etheroplossing niet mengbaar. Na droogdampen van de etheroplossing, gevolgd door toevoeging van een waterige oplossing, vond evenmin goede derivatisering plaats, waarschijnlijk omdat het ADAM niet oplost en dus aan het glas blijft zitten.

Tenslotte is het nodig dat de te derivatiseren stof als ongedissocieerd zuur aanwezig is. Is dit niet het geval dan werkt ADAM niet. ADAM werkt dan ook waarschijnlijk niet of niet goed bij sterke zuren, tenzij er in erg aprotisch milieu gewerkt wordt, waarbij deze zuren niet gedissocieerd zijn. Aangezien zowel okadainezuur als vetzuren in methanol voor het grootste deel ongedissocieerd voor zullen komen, zijn hierdoor geen problemen te verwachten.

6.2.2 Derivatiseringstijd

Volgens het voorschrift bedraagt de derivatiseringstijd voor okadainezuur en voor schelpdiermonsters 1 uur. Gebleken is echter bij mijn experimenten dat 1 uur eigenlijk te kort is. Een derivatiseringstijd van 1 1/2 uur gaf iets hogere respons. Het verschil was klein en verschilde van buis tot buis, maar het was voor mij reden genoeg om de derivatiseringstijd op 1 1/2 uur te houden. Het verschil van buis tot buis weet ik niet goed te verklaren. Het kan uitmaken of een buis langere of kortere tijd in het licht staat tijdens het toevoegen van de reagentia en ook de niet altijd gelijke kamertemperatuur kan hierbij een rol spelen.

Voor schelpdiermonsters is eveneens een derivatiseringstijd van 1 1/2 uur aangehouden, zodat al het eventueel aanwezige okadainezuur gederivatiseerd zal zijn.

De derivatiseringstijd van andere stoffen kan geheel anders zijn; zo reageren vetzuren aanmerkelijk sneller met ADAM, zodat daar met een kortere derivatiseringstijd volstaan kan worden. Vetzuren met korte ketens (zoals azijnzuur) schijnen zelfs vrijwel direct en heftig te reageren (58). Langere vetzuren doen er wat langer over. Voor heptaanzuur vond ik dat een derivatiseringstijd van 20 minuten nodig was.

6.2.3 Derivativering van standaardoplossingen

Het voorschrift van Lee vermeldt geen aparte methode voor het derivatiseren van standaardoplossingen, zodat de blanco standaardoplossingen als volgt werden gederivatiseerd :

X ul te derivatiseren standaardoplossing in methanol wordt met een overmaat ADAM in ether gedurende een bepaalde tijd (zie 6.2.1) bij kamertemperatuur in het donker geplaatst. Hierna wordt er eventueel interne standaard toegevoegd (zie 6.3) en aangevuld tot 300 ul met methanol. Deze oplossingen kunnen direct in de HPLC geïnjecteerd worden.

Deze manier van derivatiseren wijkt dus sterk af van het voorschrift met betrekking tot de derivatisering van monsters. Dit is voornamelijk gedaan om de derivatisering te vereenvoudigen.

De eerste opmerking geldt de omschrijving overmaat ADAM. Aangezien bij standaarden de hoeveelheid te derivatiseren stof bekend is , is een overmaat ADAM gemakkelijk te berekenen, mits de concentratie ADAM ongeveer bekend is. In principe is een molverhouding standaard/ADAM 1/1 voldoende, maar zeker bij langere derivatiseringstijd (achteruitgang van ADAM) is een overmaat zeker aan te raden. Hoe groot een overmaat moet zijn, heb ik niet onderzocht. Echter bij gebruik van een grote overmaat heb ik geen problemen onderzocht, dat wil zeggen geen hinderlijke ADAM-stoorpieken en, ongeacht welke ADAM er werd gebruikt, reproduceerbare resultaten

Bij de methode van Lee is de ADAM opgelost in methanol. ADAM blijkt echter niet zo goed oplosbaar te zijn in methanol, zodat toevoegen van grote hoeveelheden ADAM problemen op kan leveren (bijv. door te grote verdunning van de standaard). ADAM is echter wel goed oplosbaar in aceton of in ether. Tevens is het eindproduct van de ADAM-synthese (zie 7.1) een etheroplossing, zodat gekozen is voor het werken met een oplossing van ADAM in ether. Het enige nadeel van ether ten opzichte van methanol is dat waterrijke oplossingen niet gederivatiseerd kunnen worden (geen menging). De gebruikte standaarden zijn echter allemaal opgelost in methanol, zodat daar geen problemen te verwachten zijn.

Het volume van 300 ul is gekozen om zuiver praktische redenen; de gebruikte buisjes voor de WISP-injectieautomaat hebben een inhoud van ongeveer 400 ul. Bij grotere volumina dan 300 ul neemt de kans op overstromen van het buisje toe,

als de injectienaald er bij komt. Aanvullen tot 300 μ l gebeurt met methanol omdat dit enerzijds een stof is die goed mengbaar is met de meeste organische oplosmiddelen, niet aantoonbaar reageert met de componenten in het mengsel en bovendien niet al te vluchtig is. Bij aanvullen met ether bestaat er een risico dat door verdamping van de ether de concentratie aan opgeloste stoffen verandert, wat verkeerde resultaten oplevert.

Indien gewenst kan er bovendien nog voor aanvullen met methanol een interne standaard toegevoegd worden, hierover meer bij 6.3.

6.2.4 Derivativering met commerciële ADAM

In het begin was er alleen commercieel verkrijgbare vaste ADAM beschikbaar. Hiermee en met standaardoplossingen van okadainezuur en vetzuren (als teststoffen) werden de eerste experimenten uitgevoerd.

Al gauw bleek dat de derivativering niet reproduceerbaar was, er veel stoornissen ontstonden en de ADAM slecht oplosbaar was in methanol.

Om de reproduceerbaarheid van de derivativering te testen, werd er allereerst getracht de hoeveelheid ADAM te vergroten. Dit kan door toevoegen van meer ADAM-oplossing of door toevoegen van een geconcentreerdere ADAM-oplossing. Hierbij bleek dat er op beide manieren een grote hoeveelheid stoornissen ontstond, en dat 0,1 % ADAM in methanol een bijna verzadigde oplossing was. ADAM bleek echter veel beter oplosbaar in aceton of ether. Een bijkomend voordeel was dat bij derivatiseren in ether er een hogere piek verkregen werd. Hoewel niet erg veel hoger ben ik toch verdergegaan met ADAM als etheroplossing.

De stoornissen namen echter alleen maar toe bij grotere hoeveelheden ADAM, zodat er gekeken werd of de zuiverheid verbeterd kon worden. Er bleek dat de ADAM al ongeveer 1 jaar oud was en gezien de literatuurgegevens (zie 5.3) was te verwachten dat een groot gedeelte van de ADAM inmiddels ontleed was. De kristallen hadden daardoor een inhomogene samenstelling, waardoor ook de ADAM-oplossingen niet gelijk in concentratie waren. Het gevolg hiervan was dat er bij iedere ADAM-oplossing voor gebruik eerst getest moest worden of er wel derivativering plaats zou vinden. Dit testen werd gedaan door vetzuren te derivatiseren. Vetzuren reageren namelijk snel en vrijwel volledig met ADAM en zijn bovendien gemakkelijk te verkrijgen.

Aangezien deze methode gezien de resultaten erg onbetrouwbaar was werd er besloten, mede ook door de hoge prijs van het ADAM, om zelf ADAM te synthetiseren. De synthese zoals die is uitgevoerd, staat beschreven in 7.1. Alle verdere experimenten zijn vervolgens uitgevoerd met zelf gesynthetiseerde ADAM.

6.2.5 Derivatisering van monsters

Het voorschrift voor de derivatisering van monsters luidt volgens Lee als volgt :

Het bij de opwerking van monsters verkregen chloroform-extract (zie 6.4) wordt door middel van een stikstofstroom drooggedampt. Hierna wordt er 100 ul 0.1 % ADAM in methanol toegevoegd en gedurende 1 uur in het donker bij kamertemperatuur geplaatst om de reactie te doen verlopen. Hierna wordt het derivaat drooggedampt en verder opgewerkt (zie par. 6.5).

Bij de derivatisering van de monsters zijn niet zoveel afwijkingen van het voorschrift getest. De voorgeschreven hoeveelheid ADAM is erg veel, maar aangezien niet bekend is hoeveel te derivatiseren materiaal in een monster aanwezig is, is een ruime hoeveelheid noodzakelijk. Uiteraard kan volstaan worden met een kleinere hoeveelheid ADAM-oplossing met een hogere concentratie.

De derivatisering van het chloroformextract is zowel droog (eerst droogdampen, dan ADAM toevoegen) als nat (niet droogdampen) getest. Hierbij werd met natte derivatisering een hogere opbrengst verkregen, bij gebruik van blanco monsters, waaraan okadainezuur was toegevoegd.

Verder werd hier eveneens gewerkt met een etheroplossing van ADAM en werd de derivatiseringstijd van okadainezuur aangehouden.

Bij de monsters werd afhankelijk van het al dan niet uitvoeren van een clean-up procedure aangevuld tot 300 ul met interne standaard en methanol. Werd er wel een clean-up procedure uitgevoerd, dan werd verder volgens het voorschrift van Lee gewerkt.

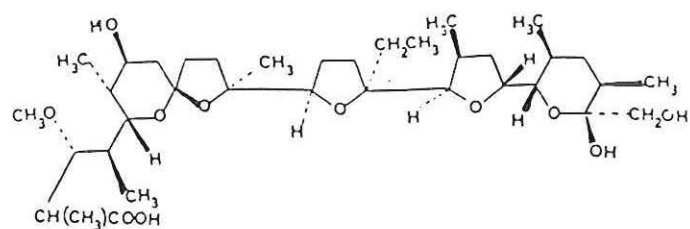
6.2.6 Derivatisering andere stoffen

Behalve met okadainezuur heb ik ook getracht andere stoffen te derivatiseren. Hieronder vallen de al eerder genoemde teststoffen, heptaanzuur en andere vetzuren, maar ook diergeneesmiddelen, zoals lasalocid, monensin, salinomycin en narasin. Deze verbindingen hebben een structuur met een aantal dezelfde structuurkenmerken als het okadainezuur (zie fig 11 a-d). Verder zijn nog getest ascorbinezuur, oxaalzuur en fumaarzuur.

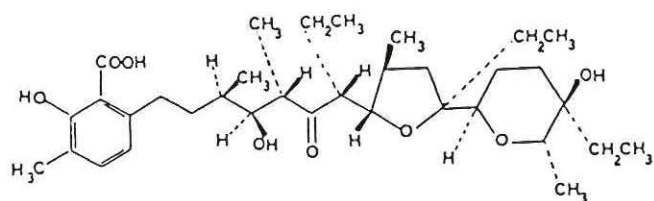
Alle geteste vetzuren, met ketenlengtes variërend van 6 tot 13 C-atomen, bleken goed te derivatiseren. Het enige probleem wat ik hierbij ondervond was de lange retentietijd in het door mij gebruikte HPLC-systeem, dit was echter wel te verwachten.

De derivatisering van de diergeneesmiddelen had geen enkel resultaat, waarschijnlijk veroorzaakt door het feit dat het geen vrije zuren bleken te zijn maar natriumzouten. Deze stoffen werden getest omdat ze misschien als interne standaard (zie 6.3) dienst zouden kunnen doen. Om hiervoor in aanmerking te komen zouden de stoffen eerst in de zuurvorm gebracht moeten worden. Aangezien dat erg bewerkelijk is en niet direct van toepassing ben ik niet verder gegaan met deze verbindingen. Alleen lasalocid zou nog als interne standaard dienst kunnen doen, omdat het van

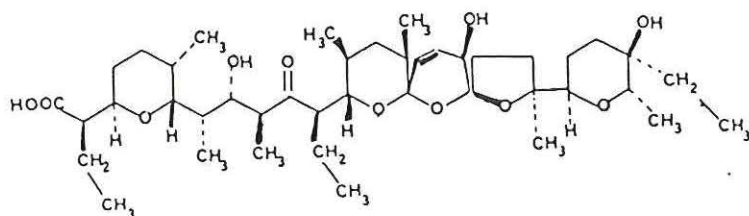
nature al fluorescentie vertoont. De piek van het lasalocid was echter erg klein en viel samen met een ADAM-piek. Het gebruik van lasalocid is hierna eveneens opgegeven. Experimenten met oxaalzuur, fumaarzuur en ascorbinezuur (eveneens als mogelijke interne standaard) hadden geen resultaat, tenzij de pieken samenvallen met ADAM-pieken. Aangezien ik inmiddels een goede interne standaard had gevonden (zie 6.4) ben ik niet verder gegaan met experimenten met andere zuren.



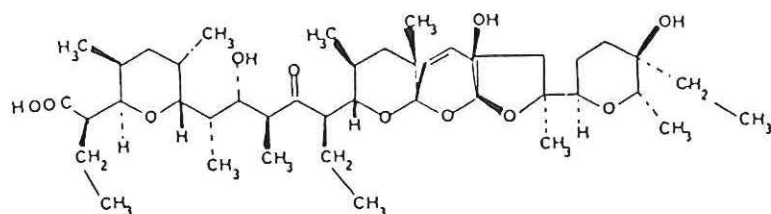
MONENSIN



LASALOCID



SALINOMYCIN



NARASIN

fig 11 : structuren overige verbindingen

6.2.7 Andere derivatiseringsreagentia

Om de problemen die er zijn bij derivatisering met ADAM (veel stoorpieken en niet constante concentratie) zou voor de derivatisering van okadainezuur ook gebruik gemaakt kunnen worden van andere derivatiseringsreagentia. Zoals in hoofdstuk 4 al is vermeld zijn er voor derivatisering van zuren een groot aantal reagentia beschikbaar. Enkele daarvan vereisen katalysatoren en/of activatoren. Dit gaat vaak gepaard met een basisch milieu. Over de stabiliteit van het okadainezuur in basisch milieu zijn geen gegevens voorhanden. Wanneer okadainezuur stabiel is onder basische omstandigheden, zijn er weinig problemen bij dergelijke reagentia te verwachten.

Ik heb dergelijke reagentia niet getest, omdat ik weinig problemen had met ADAM bij het door mij gebruikte HPLC-systeem.

Een ander mogelijk derivatiseringsreagens zou het dansyl-hydrazine (dns-h) kunnen zijn. Dit is een reagens wat normaal alleen op ketogroepen reageert (en voor suikers wordt toegepast), maar het zou misschien ook met etherische zesringen kunnen reageren. Enkele proeven met dit reagens gaven slechte resultaten en ik ben er niet mee verder gegaan (zie bijlage 3)

Bij mijn systeem had ik geen problemen met het gebruik van ADAM, maar het testen van andere reagentia kan wel zinvol zijn als er problemen bij de bepaling zijn.

6.3 Interne standaarden

Bij de gebruikte HPLC-methode kan het om twee redenen handig zijn om een interne standaard te gebruiken. Deze redenen zijn :

1) om verschillen in piekhoogte, veroorzaakt door (injectie-) volumeverschillen teniet te doen en

2) om te kijken of de derivatisering werkt.

ad 1) Normaal wordt de piekhoogte gebruikt als maat voor de hoeveelheid aanwezige stof. Echter bij een HPLC-methode kunnen altijd afwijkingen ontstaan door niet geheel gelijke (injectie-)volumina, hierdoor ontstaan er pieken die of te hoog of te laag zijn, waardoor verkeerde hoeveelheden berekend worden. Om die afwijkingen te elimineren kan een bekende hoeveelheid interne standaard toegevoegd worden. De piekhoogte van de interne standaard varieert evenredig mee met de piek van de bepale stof. Door nu in plaats van de piekhoogte de verhouding van de piekhoogte van de interne standaard en de te detecteren piek te meten, wordt de variatie geelimineerd.

ad 2) Als niet zeker is of de derivatisering werkt kan er een interne standaard toegevoegd worden, die ook gederivatieerd moet worden. Door de piekhoogte van de interne standaard te meten kan gekeken worden of de derivatisering gelukt is. De taak van de interne standaard is hier dus een andere dan bij 1).

Bij mijn experimenten is gebleken dat de derivatisering goed verloopt, mits er een grote overmaat ADAM aanwezig is. Ook

is de derivatisering reproduceerbaar. Hierdoor is een interne standaard van het tweede type niet nodig.

De eerste reden voor een interne standaard blijft echter nog wel aanwezig. Bij de te injecteren volumina (10-20 μ l) kunnen kleine verschillen in injectievolume al grote verschillen in piekhoogte te zien geven. Hierdoor is een interne standaard gewenst. De voorwaarden waaraan zo'n interne standaard moet voldoen zijn :

- hij moet fluoresceren bij dezelfde golflengtes als de ADAM-derivaten;
- hij moet een retentietijd hebben die ligt in de buurt van de derivaten;
- de piek mag niet samenvallen met andere pieken in het chromatogram en
- hij mag niet reageren met de componenten in het mengsel.

Gezien de eerste eis, de fluorescentieeigenschappen, kwam ik al snel terecht bij verbindingen met dezelfde functionele groep, namelijk de polycyclische aromatische koolwaterstoffen. De uiteindelijke keuze is gevallen op dibenz(a,h)anthraceen (zie fig 12), die aan alle voorwaarden voldoet (zie ook bijlage 3).

Waar verder in dit verslag over interne standaard gesproken wordt, wordt dibenz(a,h)anthraceen bedoeld.

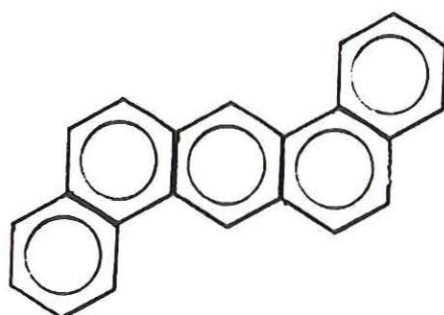


fig 12 : dibenz(a,h)anthraceen

6.4 Opwerking van schelpdiermonsters

In de mossel hopen de DSP-toxines zich op in de zogenaamde middendarmklier (zie fig). Deze middendarmklier is een klein groen-bruin orgaan rechtsboven in de mossel, als de punt van de mossel zich links bevindt. De isolatieprocedure is eenvoudig; met een scalpel worden de sluitspieren voorzichtig doorgesneden. Hierna kan de mossel geopend worden en kan de middendarmklier betrekkelijk eenvoudig van de omliggende organen losgesneden worden.

Deze middendarmklieren moeten vervolgens opgewerkt worden, waarbij de toxines uit de middendarmklier in een extractievloeistof terecht komen. Hiervoor zijn twee methodes beschreven :

Opwerkingsmethode 1 (9) :

De middendarmklieren worden geextraheerd met aceton bij kamertemperatuur. De aceton wordt hierna verdampt en de

overgebleven waterige oplossing wordt geëxtraheerd met diethylether. Hierna wordt het etherextract over een silicakolommetje geleid dat gespoeld wordt met benzeen en benzeen/methanol (9/1) de tweede fractie wordt opgevangen en opnieuw over een silicakolommetje geleid, ditmaal wordt er gespoeld met ether en ether/methanol (1/1). De hierbij verkregen tweede fractie kan nu gebruikt worden voor derivatisering of voor verdere opzuivering van de toxines.

Bovenstaande, bewerkelijke, methode is later veranderd tot de volgende, veel snellere, methode :

Opwerkingsmethode 2 (25) :

Voeg aan 1 gram middendarmklieren 4 ml methanol/water 80/20 toe. Meng gedurende 1 minuut in een omni-mixer, waardoor de toxines door het methanol/water-mengsel geëxtraheerd worden. Neem van deze vloeistof 2.5 ml en voeg 1 ml water toe. Extraheer deze oplossing twee maal met 2.5 ml petroleumether 40-60. Extraheer de waterige fase twee maal met 4 ml chloroform. Voeg deze chloroformextracten samen en vul aan tot 10 ml.

De op beide manieren verkregen oplossingen kunnen worden gebruikt voor de derivatisering en de HPLC-bepaling. Beide oplossingen kunnen volgens de literatuur in de vriezer worden bewaard.

Aangezien de tweede opwerkingsmethode beter schijnt te zijn dan de eerste, heb ik alleen met de tweede methode gewerkt. Als de methode uitgevoerd wordt zoals beschreven, ontstaan er twee problemen, namelijk : 1) het uitschudden met petroleum-ether gaat erg slecht door de aanwezige mosselmatrixdeeltjes en 2) de toxines worden aan het eind erg verdund.

Het voorkomen van matrixdeeltjes in de waterige fase levert problemen op bij het uitschudden, omdat de deeltjes in het grensvlak gaan zitten en het scheidingsvlak dus niet te zien is. Hierdoor kan het voorkomen dat er een gedeelte van het petroleum-ether extract in de waterfase blijft zitten. Na derivatiseren geeft dit een groot aantal extra pieken, die erg laat in het chromatogram elueren (tot 5-8 uur na injectie), zodat volgende bepalingen worden gestoord. Dit probleem is op twee manieren opgelost, namelijk door aanpassing van het HPLC-systeem (zie 5.8) en door aanpassing van de opwerking. Die laatste aanpassing bestaat uit het invoeren van een centrifugestap voor het uitschudden met petroleum-ether. Hierdoor worden de matrixdeeltjes op de bodem van de buis geconcentreerd, waarna de vloeistof in een scheidrechtter gebracht wordt en het uitschudden plaats kan vinden. Het tweede probleem, de verdunning, is gemakkelijk op te lossen, door in plaats van het chloroformextract aan te vullen tot 10 ml juist het extract in te dampen tot 1 ml. Het bleek dat er hierdoor geen extra pieken ontstonden (er ontstaan overigens geen stoorpieken in het chromatogram door het chloroformextract), zodat indampen probleemloos

toegepast kan worden. De detectielimiet wordt hierdoor theoretisch een factor 10 lager.

Na deze aanpassingen heb ik weinig gedaan om de opwerkingsmethode te verbeteren, mede doordat er maar weinig okadainezuur standaard beschikbaar was.

6.5 Clean-up procedures

Na de derivatisering wordt in het voorschrift een clean-up procedure toegepast, enerzijds om storende pieken van het ADAM-mengsel kwijt te raken, anderzijds om storende bestanddelen uit de mosselmatrix te verwijderen.

In het voorschrift van Lee et al (25) wordt het gederivatiseerde mengsel onder stikstof drooggedampt en opgelost in 1 ml hexaan-chloroform 1:1 en opgebracht op een Sep-pak disposable silica kolom. Dit kolommetje wordt vervolgens gespoeld met 5 ml hexaan-chloroform 1:1 en 5 ml chloroform. De derivaten worden hierna geelueerd met 5 ml chloroform-methanol 95:5. Het eluaat wordt drooggedampt en opgelost in 100 µl methanol. Deze oplossing kan in de HPLC geïnjecteerd worden.

Bij experimenten met standaardoplossingen is het mij niet gelukt om de derivaten in de derde fractie geelueerd te krijgen. Wat voor omstandigheden ik ook gebruikte (extra druk, voorbehandelen van het kolommetje), altijd kwam alle stof in de eerste fractie terecht. Dezelfde resultaten werden verkregen bij gebruik van een iets groter kolommetje (van Baker).

Hierdoor heb ik getracht het HPLC-systeem zodanig te veranderen dat er geen storende ADAM-pieken meer aanwezig zijn. Toen dit gelukt is heb ik dan ook besloten om de gehele clean-up achterwege te laten.

Een ander probleem is dat bij de clean-up er een aantal stappen zijn, waarbij verlies van het okadainezuur op zou kunnen treden (droogdampen, achterblijven op de kolom), indien een clean-up voorkomen kan worden, is dit probleem dus niet meer van belang.

6.6 HPLC-systeem

Het voorschrift van Lee (25) vermeldt de volgende HPLC-condities (zie ook 5.1) :

kolom : Develosil ODS-5 (250 x 4,6 mm) RP-kolom

eluens : acetonitril:methanol:water 8:1:1

flow : 1.1 ml/min

De eerste experimenten heb ik uitgevoerd met een Lichrosorb RP-18 cartridge kolom (Chrompack) van 100 x 3 mm. Met deze kolom vond er wel scheiding plaats, maar de piek van okadainezuur viel gedeeltelijk samen met een ADAM-(stoor)-piek. Dit heb ik trachten op te lossen door de eluenssamenstelling en de flowsnelheid te variëren. Getest zijn acetonitril/water in de verhoudingen 1:1; 7:3; 3:1; 8:2 en 9:1. Alleen bij de verhouding 1:1 werd een goede scheiding verkregen, maar de retentietijd werd zo sterk verlengd (1-2 uur voor alle pieken van de kolom afgekomen waren), dat dit niet geschikt was. Bij een verhouding van 3:1 en een flowsnelheid van 0.4 ml/min werd nog het best acceptabele

resultaat verkregen, echter geen volledige scheiding. Vervolgens heb ik de kolom vervangen door een Spherisorb ODS-2 kolom (Chrompack) van 100 x 3 mm. Deze kolom gaf echter vrijwel hetzelfde resultaat, alleen de retentietijden waren iets korter.

Tenslotte heb ik de beide kolommen gecombineerd, waardoor er dus een kolom van 20 cm ontstond. Met een flowsnelheid van 0.8 ml/min en de verhouding acetonitril:water 3:1 wordt er een goede scheiding verkregen (zie bijlage 3) van okadaïnezuur en de stoorpieken. Voor de meeste experimenten is dit systeem dan ook gebruikt.

Het enige probleem dat bij dit systeem ontstond, was de lange retentietijd van stoorpieken uit de mosselmonsters. Die kwamen pas na een zeer lange tijd uit de kolom (enkele uren), waardoor latere experimenten gestoord werden. Dit werd uiteindelijk opgelost door de kolom nadat de interne standaard is geelueerd te spoelen met 25% tetrahydrofuran in water met 1 ml/min. Hiermee werden alle pieken betrekkelijk snel geelueerd, zodat de totale analyse tijd ongeveer 1 uur werd. Deze methode (solvent switching) was later niet meer nodig, nadat de opwerking werd verbeterd, maar het is wel aan te raden om na het analyseren van een aantal mosselmonsters de kolom enkele uren te spoelen met 25% tetrahydrofuran om vervuiling tegen te gaan.

7 ADAM (PRACTISCH)

7.1 Inleiding

Om verschillende redenen is in de loop van het onderzoek besloten om ADAM zelf te gaan synthetiseren. Deze redenen zijn: de hoge prijs van het commerciële ADAM (f 2600,= per gram), de lange levertijd (> 3 maanden), en de niet al te grote zuiverheid van het commerciële mengsel. Om de opbrengst en de zuiverheid van de synthese te testen is tevens een methode ontwikkeld om ADAM kwantitatief aan te bepalen.

7.1.1 Gebruikte chemicalien en apparatuur

9-anthraldehyde	(Aldrich no 27.868-6)
9-anthryldiazomethaan	(Funakoshi Chem co)
diethylether watervrij	(Merck no 929)
ethanol (absoluut)	(Merck no 983)
hydrazinehydraat 80%	(Aldrich no 22.581-9)
kaliumhydroxide	(Merck no 5033)
kaliumpermanganaat	(Aldrich no 23.851-1)
mangaandioxide (geactiveerd)	(Aldrich no 21.764-6)
mangaansulfaat monohydraat	(Aldrich no 22.128-7)
natriumsulfaat (watervrij)	(Merck no 6649)
water	(Millipore)
stikstofgas	
beker glazen (div.maten)	
erlenmeyers (div.maten)	
pipetten 1, 5 en 10 ml	
rondbodem 200 ml	
scheitrechter 250 ml	
aluminiumfolie	
Buchnertrechter (diameter 5 cm)	
filterpapier (Whatman nrs 5 en GF/A, 5 cm diameter)	
magneetroerder	
mortier en -schaaltje	
oven	

7.2 ADAM-synthese

Zoals in hoofdstuk 5 al is aangegeven berust de synthese op 2 stappen; de omzetting van 9-anthraldehyde tot het bijbehorende hydrazon gevolgd door de oxidatie van dit hydrazon tot ADAM. De tweede stap, de oxidatie, kan op twee manieren geschieden, met kwik(I)oxide of met geactiveerd mangaandioxide. Aangezien kwik(I)oxide nogal giftig is en omdat de vorming met geactiveerd mangaandioxide sneller gaat is besloten de oxidatie met geactiveerd mangaandioxide uit te voeren.

De synthese is dientengevolge uitgevoerd volgens de voorschriften van Nakaya et al (57) en Barker et al (58).

Eerste stap (van 9-anthraldehyde naar 9-anthraldehydehydrazon)

Weeg op een bovenweger 8.8 gram 9-anthraldehyde af in een erlenmeyer van 250 ml. Voeg hieraan 150 ml absolute ethanol toe. Los de kristallen op en voeg 9 ml hydrazinehydraat toe.

Roer bij kamertemperatuur gedurende drie uur. Filtreer onder vacuum met behulp van een Whatmanfilter type 5 de vaste stof af. Bewaar deze vaste stof, gele naaldvormige kristallen van 9-anthraldehyde-hydrazon, in een afgesloten potje in de vriezer.

Tweede stap (van 9-anthraldehydehydrazon naar ADAM)
Weeg 0.22 gram 9-anthraldehyde-hydrazon af in een met aluminiumfolie beklede erlenmeyer van 300 ml. Voeg hieraan 100 ml water vrije ether toe en los de kristallen op. Voeg vervolgens 0.8 gram geactiveerd mangaandioxide en 0.6 ml met KOH verzadigde ethanol toe. Plaats de erlenmeyer in een ijsbad en roer gedurende een half uur met maximale snelheid. Filtreer onder vacuum het mangaandioxide af met een Whatman filter type GF/A en vang het filtraat op in een met aluminiumfolie beklede afzuigerlenmeyer. Was het filter met 40 ml water vrije ether en reduceer het ethervolume door verdamping onder een stikstofstroom. Bewaar de geconcentreerde rood-gele vloeistof (ADAM-oplossing) in een met aluminiumfolie bekleed flesje in de vriezer. Eventueel kan de verkregen ADAM oplossing iets gezuiverd worden door wassen met ijswater en drogen van de etheroplossing mbv natriumsulfaat (66). Dit is echter niet noodzakelijk.

Daar de ADAM zoals die met commercieel geactiveerd mangaandioxide werd verkregen niet bleek te werken werd besloten om ook dit zelf te gaan synthetiseren. Dit gebeurde volgens het voorschrift van Attenburrow et al (70).

Vorming geactiveerd mangaandioxide

Voeg gedurende 1 uur gelijktijdig een oplossing van 111 gram mangaansulfaat-tetrahydraat in 150 ml water en 117 ml 40 % natronloog oplossing toe aan een warme (ongeveer 60 C), geroerde oplossing van 96 gram kaliumpermanganaat in 600 ml water. Roer hierna nog een uur door en verzamel de vaste stof door vacuumfiltratie met een Whatmanfilter type GF/A. Was het residu met Milliporewater tot het waswater kleurloos blijft. Droog de vaste stof hierna gedurende enkele uren in een oven bij 100-120 C en maal tot een fijn poeder voor gebruik. Het poeder kan in een donker flesje bij kamertemperatuur bewaard worden.

Het op deze manier gesynthetiseerde geactiveerde mangaandioxide bleek goed te werken en is dan ook voor verschillende ADAM-syntheses gebruikt. De verkregen hoeveelheid is genoeg voor zeker 200 ADAM-syntheses.

De ADAM-synthese werd gevolgd door af en toe een hoeveelheid reactiemengsel te nemen en in de HPLC te injecteren. Hierbij was in het begin een grote piek aanwezig, afkomstig van het hydrazine. Deze piek verdween langzamerhand (in ongeveer 1 uur). Een andere piek, afkomstig van het 9-anthraldehyde, nam eveneens af en was aan het eind van de reactie (na 3 uur) nauwelijks meer aanwezig (zie ook bijlage 4). De reactietijd van 3 uur is dan ook aangehouden.

Opvallend was dat er geen duidelijke piek van het hydrazon waarneembaar was. De gebruikte golflengtes (365 en 410 nm)

wijken blijkbaar af van de ideale golflengtes van het hydrazon.

7.3 ADAM-analyse

De bepaling van de concentratie ADAM in een mengsel van ADAM met bij- en vervalprodukten (in het vervolg ADAM-oplossing genoemd) is belangrijk om te weten bij:

- de bepaling van de opbrengst van een ADAM-synthese en
- de bepaling van de derivatiseringskracht van een ADAM-oplossing.

Aangezien ADAM in oplossing niet stabiel is (zie hoofdstuk 4), neemt de concentratie ADAM in een ADAM-oplossing af, en dientengevolge ook het derivatiserend vermogen van die oplossing. Een regelmatige bepaling van het ADAM-gehalte kan dan noodzakelijk zijn.

In de literatuur is geen enkele methode beschreven om het ADAM-gehalte te bepalen, zodat ik getracht heb zelf een methode te ontwikkelen. Voor zo'n methode stonden er 3 mogelijke invalshoeken ter beschikking, namelijk via infra-rood metingen, met behulp van massaspectrometrie of via een HPLC-methode. De resultaten van de verschillende technieken zullen hieronder besproken worden.

7.3.1. Infra-rood methode

Een infra-roodspectrum van een ADAM-oplossing (zie bijl 5) laat een groot aantal pieken zien met als grootste piek een piek bij 733 cm^{-1} . Een andere duidelijke piek verschijnt bij 2057 cm^{-1} . Deze twee pieken zijn, op grond van tabellen, toe te wijzen aan respectievelijk de aromatische protonen (C-H-binding) en de diazogroep. De piek van de diazogroep is ten opzichte van de literatuur iets verschoven, Nakaya et al en Barker et al vermelden respectievelijk 2080 en 2065 cm^{-1} (57,58). Dit verschil is waarschijnlijk te wijten aan verschillen in de meetapparatuur.

Met behulp van deze twee pieken (2057 en 733 cm^{-1}) heb ik getracht een analysemethode voor ADAM te ontwikkelen. Uitgangspunt hierbij was dat in vrijwel alle bij- en vervalprodukten van ADAM het aromatische systeem (nog) aanwezig is, en die band dus in principe constant is, ondanks de samenstelling van het mengsel. De band bij 2057 cm^{-1} is echter specifiek voor de diazogroep en dus variabel.

In principe zou de verhouding tussen beide pieken dus een maat kunnen zijn voor de hoeveelheid ADAM. Dit bleek inderdaad het geval (zie verder), maar voor een goede kwantitatieve analyse is het nodig om of de emissiecoëfficiënt van beide groepen te weten, zodat met de wet van Lambert-Beer de concentratie te berekenen is, of om met bekende concentraties een ijklijn te maken.

De methode is eveneens geschikt voor stabiliteitsmetingen en halfwaardetijdberekeningen van ADAM. Hierbij zijn exacte concentraties niet nodig. Op tijdstip $t=0$ wordt van een ADAM-oplossing (of van kristallen) de piekverhouding bepaald. De oplossing of de kristallen worden hierna onder bepaalde condities bewaard (licht, temperatuur e.d.), waarna op regelmatige tijden er een spectrum opgenomen wordt. Door de gevonden verhoudingen tegen de tijd uit te zetten kunnen grafieken met vervalcurves verkregen worden waaruit de halfwaardetijden te berekenen zijn. Met behulp van bovenstaande methode vond ik de volgende halfwaardetijden :

- voor ADAM in licht bij kamertemperatuur als etheroplossing 1 uur en 6 minuten
- voor ADAM in donker bij kamertemperatuur als etheroplossing 1 uur en 23 minuten
- voor ADAM in donker bij kamertemperatuur als vaste stof 14 uur en 51 minuten

Deze waardes zijn lager dan de literatuur aangeeft. De oorzaak hiervan is niet bekend, misschien werkt infra-rode straling destructief op ADAM, waardoor de tijden zo kort uitvallen.

7.3.2. Massaspectrometrie (MS)

Massaspectrometrie was eveneens een mogelijke methode om ADAM aan te tonen. Getracht is om zowel met solid-probe MS als met GC-MS technieken ADAM aan te tonen. Bij beide methodes echter bleek de werkt temperatuur zodanig hoog te zijn ($> 65 \text{ }^\circ\text{C}$) dat ADAM ontleedt onder uitstoting van stikstof.

Waar GC-MS echter wel geschikt voor bleek te zijn, was om een indicatie te krijgen van de aard van de verschillende bij- en vervalprodukten. Op grond van MS-spectra zouden de volgende verbindingen aanwezig kunnen zijn (hierbij dient te worden aangemerkt, dat, behalve voor 9-anthraldehyde, er geen pogingen zijn gedaan de gegevens te bevestigen, er kan dus niets met zekerheid gezegd worden over het voorkomen van deze stoffen in een ADAM-oplossing.), zie bijlage 5. De conclusie luidt dan ook dat MS-technieken niet geschikt zijn voor een goede bepalingmethode voor ADAM.

7.3.3. HPLC-methode

Bij de HPLC-methode wordt gekeken naar het derivatiserend vermogen van een ADAM-oplossing door meting van de piekhoogte van het derivaat op de HPLC. Bij deze methode wordt uitgegaan van de volgende irreversibele reactie :



Gekozen werd voor de derivatisering van vetzuren, aangezien vetzuren vrijwel volledig en snel met ADAM reageren (58). Er werd gekozen voor heptaanzuur, omdat dit geen interferentie met ADAM-pieken vertoont en bij het gebruikte systeem na een redelijke tijd van de kolom kwam. In principe is ieder

vetzuur bruikbaar, maar per HPLC-systeem moet gekeken worden welke het beste voldoet.

Het principe van de methode is als volgt:

Allereerst wordt aan een reeks heptaanzuuroplossingen met bekende concentraties een, waarschijnlijke, overmaat ADAM-oplossing toegevoegd. Deze mengsels worden gedurende een half uur in het donker bij kamertemperatuur bewaard om te derivatiseren. Daarna worden ze op een geschikt HPLC-systeem geïnjecteerd. Hierna worden de piekhoogtes van het derivaat opgemeten en uitgezet tegen de geïnjecteerde hoeveelheid heptaanzuurderivaat. Op deze manier dient een lineaire grafiek verkregen te worden. Is dit niet het geval (de grafiek gaat bij hogere concentraties horizontaal lopen) dan was er geen overmaat ADAM aanwezig en dient het experiment met een grotere hoeveelheid ADAM herhaald te worden.

Deze grafiek van piekhoogte versus vetzuurconcentratie fungeert verder, voor het gebruikte HPLC-systeem, als ijklijn voor de ADAM-bepaling.

Voor de bepaling van ADAM in een onbekend mengsel wordt aan een bekende hoeveelheid vetzuur een hoeveelheid ADAM toegevoegd. Dit wordt eveneens gedurende een half uur in het donker bij kamertemperatuur bewaard om te derivatiseren en daarna geïnjecteerd. De verkregen piekhoogte wordt opgemeten en de bijbehorende concentratie vetzuur wordt afgelezen met behulp van de ijklijn.

Aangezien er 1 mol ADAM nodig is voor de derivatisering van 1 mol vetzuur, is de gevormde hoeveelheid vetzuurderivaat gelijk aan de hoeveelheid aanwezige ADAM. Daar de hoeveelheid toegevoegde ADAM-oplossing bekend is kan de concentratie ADAM daarin op deze manier eenvoudig bepaald worden.

Voorwaarden voor een goede bepaling zijn echter wel :

- 1) De ijklijn dient een groot concentratiegebied te beslaan, en in dat concentratiegebied lineair te zijn;
- 2) De bij de onbekende ADAM-oplossing verkregen concentratie vetzuur dient minder te zijn dan de maximaal aanwezige hoeveelheid, dat wil zeggen er dient een overmaat vetzuur aanwezig te zijn;
- 3) De bij de onbekende ADAM-oplossing verkregen piek dient goed te meten te zijn en niet gestoord te worden door andere pieken;
- 4) Een ijklijn is alleen toepasbaar als de meting met de onbekende ADAM-oplossing onder exact dezelfde HPLC-condities heeft plaatsgevonden (kolom, eluens, detector, recorder).

Wordt aan deze voorwaarden voldaan dan kan betrekkelijk snel de hoeveelheid ADAM in een ADAM-oplossing bepaald worden. De resultaten van bovenstaande methode voor mijn systeem (ijklijn en diverse ADAM-concentraties) staan vermeld in bijlage 5.

Deze methode kan gecombineerd worden met de infrarood methode. Hiervoor dienen er een aantal ADAM-oplossingen met verschillende concentraties beschikbaar te zijn. Deze concentraties worden met de bovenstaande HPLC-methode bepaald. Voordat de ADAM aan het heptaanzuur wordt toegevoegd wordt de infrarood absorptie gemeten. Nadat dit

voor alle oplossingen is gedaan kunnen de concentraties uitgezet worden tegen de adsorptie. Aangezien er een lineair verband bestaat tussen de concentratie en de absorptie dient er een rechte lijn te ontstaan. Er geldt namelijk :

$$A = e \times c \times l \quad (\text{Wet van Lambert-Beer})$$

waarin : A= Absorptie (-)
e= extinctiecoefficient (1/mol x cm)
l= weglengte van de cel (cm)

Door tijd- en ADAMgebrek heb ik dit experiment maar 1 x uit kunnen voeren, de verkregen grafiek gaf echter goede verwachtingen (zie bijlage 5).

Met behulp van deze grafiek kan door meting van de absorptie direct de ADAM-concentratie bepaald worden. Ook kan hiermee de extinctiecoefficient van ADAM bepaald worden.

Op zich biedt deze methode dus een mogelijkheid om snel een indruk te krijgen van een ADAM-concentratie. Als de extinctiecoefficient eenmaal reproduceerbaar te bepalen is, wordt de gehele HPLC-methode overbodig en kan worden volstaan met een infrarood meting.

8 PSP (PRACTISCH)

8.1 Inleiding

Het tweede gedeelte van deze afstudeeropdracht was het opstarten van een HPLC methode voor de bepaling van PSP-toxines. De hiervoor gebruikte methode is de methode, zoals die is beschreven in het artikel van Sullivan et al (56) uit 1985.

Het betreft hier een HPLC methode met een post-column reactie systeem (PCRS).

Het overzichtsschema staat in fig 13a.

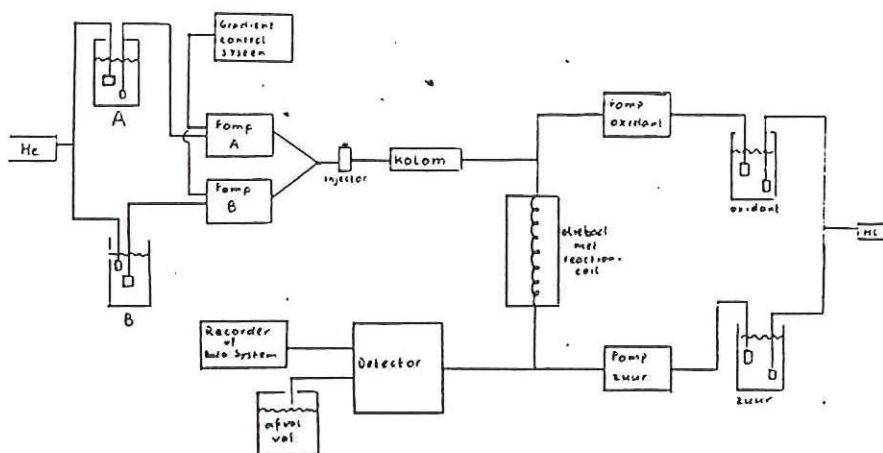


fig 13a : HPLC-schema PSP-toxinebepaling (uit : 56)

tijd (min)	%A	%B
0	100	0
4	100	0
11	70	30
17	10	90
17,5	0	100
18.5	0	100
19	100	0
26	100	0

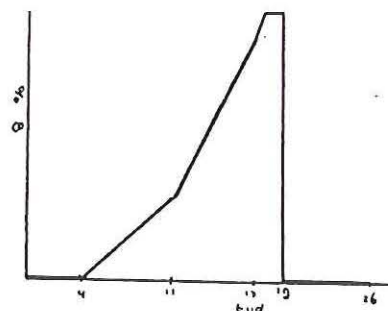


fig 13b : Gradientsysteem PSP-toxinebepaling (uit : 56)

De gebruikte kolom is een PRP-1 reversed phasekolom. De toxines worden op de kolom gebracht en geelueerd met een gradientprogramma (fig 13b). Hierna vindt er respectievelijk toevoeging van oxidatiereagens en zuur plaats, waarna het geheel met een fluorescentiedetector gemeten wordt.

De verdere chromatografische condities staan vermeld in onderstaande tabel :

Tabel 6 HPLC-condities voor de PSP bepalingsmethode volgens Sullivan et al (56) : (zie ook fig 13)

kolom : PRP-1 kolom, 150 x 4,1 mm. deeltjes 10 μ m
eluens : gradient met mobiele fase A : 1,5 mM ammonium-
sulfaatbuffer in water, bevattend 1,5 mM van
hexaan- en heptaansulfonzuur, pH=6.70 en mobiele
fase B : 25 % acetonitril en 75 % 6,25 mM
ammoniumfosfaatbuffer en 1,5 mM hexaan- en
heptaansulfonzuur in water, pH 7.0.
gradient : zie fig 13b
flow rate : 1,3 ml/min
inj.volume : 10 μ l
PCRS : oxidant : 5,0 mM perjoodzuur in 100mM natrium-
fosfaatbuffer (pH 7,8) in water.
flow : 0,5 ml/min
zuur : 0,75 M salpeterzuur in water
flow : 0,3 ml/min
eind pH : <2,0
reactiecoil : volume : 1 ml
temperatuur : 90 °C
detector : fluorescentie : excitatie : 340 nm
emissie : 400 nm

Daar de methode niet direct lukte heb ik een aantal experi-
menten gedaan om te kijken of de methode te verbeteren valt.

8.1.1 Gebruikte chemicalien en apparatuur

Chemicalien :

acetonitril p.a.
ammoniakoplossing 28%
fosforzuur
heptaansulfonzuur
hexaansulfonzuur
natriumhydroxide
perjoodzuur
pH bufferoplossingen pH 4,0; 7,0 en 10,0
salpeterzuur
saxitoxine standaarden
water
zoutzuur

Apparatuur :

oliebad
gradientpompen
HPLC pompen
detector
slangenpomp
recorder
bekerglazen
maatcilinders
magneetroerder
pH meter
HPLC injectiespuit

pipetten
finnpipetten
kolom PRP-1
roervlooiën
ultra-turrax
blendercentrifuges
ultrafiltratiebuisjes
spatel
bovenweger
vacuumpomp
centrifuges

8.2 Opwerking van mosselen

De opwerking van mosselen voor de PSP-bepaling volgens Sullivan is vrij eenvoudig. De mosselen worden eerst gescheiden van de schelp. Het vlees wordt hierna vermalen en kan in de diepvriezer bewaard worden. Voor de extractie van de toxines wordt aan een bepaalde gewichtshoeveelheid gemalen mosselen een gelijk gewicht aan 0.1 N HCl toegevoegd en goed geroerd. Dit mengsel wordt dan 5 minuten bij 2000 rpm gecentrifugeerd. Het supernatant wordt verzameld en 1 ml daarvan wordt in een ultra-filtratie buisje gebracht en 30-60 minuten bij 2000 rpm gecentrifugeerd. De gefiltreerde oplossing kan direct in de HPLC geïnjecteerd worden.

Het bovenstaande voorschrift is erg onduidelijk met betrekking tot de centrifugatiestap. De hierbij benodigde tijd wordt nogal grof uitgedrukt (30-60 min), maar blijkt sterk van de samenstelling van het monster en de centrifuge-rotor af te hangen. Het is namelijk nodig dat er een hoeveelheid vloeistof door het filter geperst wordt (zodanig veel dat er een paar keer 15 µl uit geïnjecteerd kan worden) en de omstandigheden daarvoor verschillen per centrifuge en per monster. In het monster zitten namelijk bestanddelen die het filter kunnen verstoppen. Om er dan nog genoeg vloeistof doorheen te krijgen moet de tijd aangepast worden, of een andere rotor gebruikt worden. Voor iedere centrifuge moeten de omstandigheden dus aangepast worden. Het bleek dat in ons systeem (MSE centrifuge) 45 minuten bij 2500 rpm minimaal noodzakelijk was voor monsters. Werd er een blanco gecentrifugeerd (alleen saxitoxine in HCl), dan was 30 minuten ruim voldoende.

Aan de opwerkingsmethode is verder niets veranderd.

Voor mosselen waaraan een bekende hoeveelheid saxitoxine is toegevoegd bleek er geen verlies op te treden bij de opwerking, de recovery bedroeg 105 %. Voor standaardoplossingen was dat iets minder, namelijk 94 % (zie bijlage 6).

Bij de opwerking is nog gekeken of de verschillende mosselfracties ook verschillende (stoor) pieken te zien geven. Sullivan vermeldt nergens iets over stoorpieken, maar bij de drie geteste mosselfracties (hele mosselen, mosselen zonder middendarmklieren en alleen middendarmklieren) werden een aantal pieken verkregen. Hoewel niet exact gelijk, waren de hoeveelheid, de retentietijden en de intensiteit van de pieken vergelijkbaar (zie bijlage 6).

Deze pieken storen niet voor de bepaling van saxitoxine, of dit ook geldt voor de andere PSP-toxines is niet bekend en heb ik niet kunnen onderzoeken, aangezien er geen standaardoplossingen van die toxines beschikbaar zijn. De verschillende fracties zijn vergeleken om de detectielimiet (in ppm voor gehele mosselen) te verlagen. Indien de PSP-toxines, net als de DSP-toxines zich ophopen in de middendarmklier is het gunstiger om alleen de middendarmklieren op te werken; de concentratie hierin is dan hoger dan in hele mosselen. Hierdoor zou de detectielimiet in ppm gehele mossel omlaag gaan, mits bekend is hoe groot het gewichtspercentage middendarmklier in een mossel is. Of het saxitoxine zich inderdaad ophoopt in de middendarmklieren is niet onderzocht, aangezien er geen giftige mosselen beschikbaar zijn.

8.3 Post-column reactie systeem (PCRS)

Het PCRS bestaat bij Sullivan uit toevoegen van 0.5 ml/min perijoodzuur (5 mM, pH 7.8) aan de vloeistofstroom uit de kolom. Dit geheel wordt gedurende een halve minuut bij 90 °C verhit, waarna er 0.3 ml/min 0.75 N salpeterzuur aan wordt toegevoegd. Dit systeem is gebaseerd op de reacties zoals die zijn beschreven door Bates en Rapoport (4.3.2 en lit 35).

Bij de omstandigheden zoals Sullivan die voorschrijft rezen er twee problemen, namelijk : er ontstonden een groot aantal gasbellen (deze geven sterk storende pieken in een chromatogram) en saxitoxine bleek niet of nauwelijks te detecteren te zijn.

Het probleem van de gasbellen wordt veroorzaakt door de hoge reactietemperatuur. Het in mobiele fase B aanwezige acetonitril is bij 90 °C gasvormig en vormt belletjes.

Op verschillende manieren is getracht dit probleem op te lossen. Als eerste werd een debubbler (luchtbelvanger) geïnstalleerd. Dit leverde wel een grote vermindering van het aantal luchtbellen op maar er bleven luchtbellen door de detector komen. Deze methode was dus niet geschikt.

Als tweede werd geprobeerd om het reactiemengsel na het oliebad door middel van een waterbad te koelen; er treedt dan condensatie van de acetonitrildamp op. Ook dit leverde grote vermindering op (ong. 80 %) maar door de hoge temperatuur van het oliebad was een zeer koud waterbad of een lange koeling noodzakelijk. Daar dit uit praktische overwegingen niet handig was en er bovendien nog steeds gasbellen doorkwamen, werd van deze methode afgezien.

Als derde mogelijkheid werd koeling met tegendruk na de detector geprobeerd. Door de hogere druk werd het moeilijker om gasbellen te krijgen en de gasbellen die alsnog ontstonden werden door koeling grotendels verwijderd. Deze methode gaf vrijwel volledige verwijdering, maar gaf problemen bij de zuurtoevoeging. De gebruikte pomp (een slangenpomp) kon niet tegen de ontstane druk in pompen. Na vervanging van deze pomp door een HPLC-pomp ontstonden er nog maar zelden gasbellen. Opmerkelijk is dat Sullivan negens iets zegt over dit probleem.

Het tweede probleem, het niet detecteren van saxitoxine, was een groter probleem. Bij 90 °C was er dus niets te zien. Dit is waarschijnlijk te wijten aan overoxidatie en niet door ontleding van saxitoxine door hitte, daar saxitoxine op zich zeer hittebestendig is. Er werd dan ook getracht dit probleem op te lossen door de reactietemperatuur te verlagen. Bij verschillende temperaturen werd de respons bekeken en er bleek dat bij 40-50 °C de respons optimaal was. Bovendien ontstonden er bij deze temperatuur ook geen gasbellen meer, zodat dat probleem niet meer speelt. De respons was echter veel lager dan volgens Sullivan te verwachten was en bovendien niet goed reproduceerbaar. Aangezien dat waarschijnlijk beide te wijten is aan een niet goed verlopende oxidatiestap, werd er gekeken of die stap te verbeteren zou zijn.

Allereerst werd de concentratie perjoodzuur verhoogd van 5.0 mM tot 7.5 mM. Dit leverde een verhoging van de respons op met een factor 1.5-2, zodat in het vervolg met deze concentratie is gewerkt.

Als tweede werd de flow van de oxidant verhoogd van 0.5 tot 0.8 ml/min. Ook hierdoor werd de respons met een factor 1.5-2 verbeterd. Hogere flows geven weer een afname van de respons te zien, waarschijnlijk veroorzaakt door de kortere verblijftijd in de reactiecoil.

Hoewel de respons door deze twee maatregelen met een factor 3-4 verdeterd was, was de respons ten opzichte van Sullivan nog te laag. Als derde werd daarom de pH van de oxidant gevarieerd van 7.3 tot 13.8. Bates en Rapoport gaven al aan dat de oxidatie onder basische omstandigheden plaats moet vinden. De verwachting was dan ook dat de respons onder sterkere basische omstandigheden beter zou zijn. Dit was inderdaad het geval, bij pH 12.8 werd de hoogste respons gevonden, die maar liefst een factor 100 boven de respons bij pH 7.8 lag (hierbij is wel met verhoogde flow en concentratie van de oxidant gewerkt), zie bijlage 6.

Voor de bepaling van de recovery en de detectielimiet voor saxitoxine is dan ook bij deze pH gewerkt.

Hoewel deze pH voor saxitoxine een zeer goede respons oplevert, is het mogelijk dat deze pH voor de andere toxines te hoog is en er dus mogelijk overoxidatie (en dus lagere respons) op kan treden. Aangezien er geen standaardoplossingen van andere toxines beschikbaar zijn, heb ik dit niet kunnen testen.

8.4 HPLC omstandigheden

Het HPLC-systeem bestaat uit een gradientsysteem zoals is genoemd in 8.1. Deze gradient is wel een aantal keren veranderd, maar voor het bepalen van de toxische componenten in mosselen is de gradient van Sullivan onontbeerlijk. De toxiciteit van mosselen wordt bepaald door verschillende toxines en zonder standaardoplossingen van deze toxines zijn de eventuele pieken niet te identificeren. Alleen door vergelijken met de door Sullivan genoemde retentietijden voor de standaarden kan gekeken worden welke andere toxines eventueel aanwezig zouden kunnen zijn. Voor de meeste experimenten is dan ook gebruik gemaakt van deze gradient.

Voor snelle experimenten (invloed van pH, temperatuur en oxidantconcentraties) is echter gewerkt met een testgradient. Deze gradient is een zgn blokgradient volgens onderstaand schema :

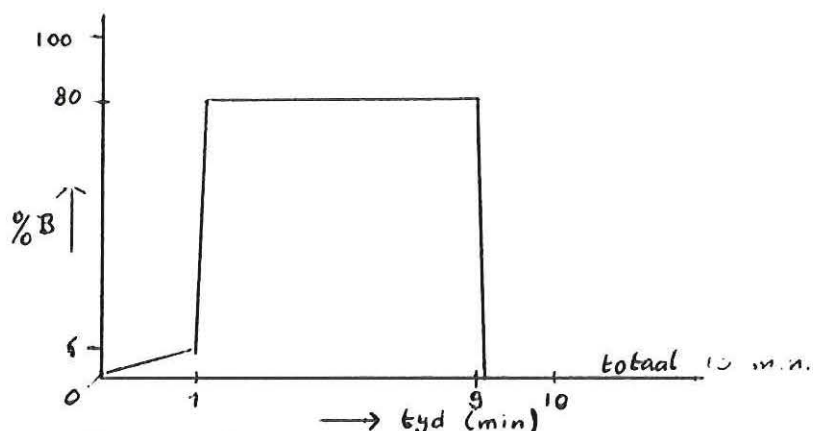


fig 14 : Testgradient saxitoxine

Gekeken is of het voor saxitoxine mogelijk is om zonder gradient (isocratisch) te werken. De hierbij verkregen respons was echter zodanig slecht (bij de gebruikte kolommen), dat hiermee niet verder gegaan is (zie ook bijlage 6). Bij isocratisch werken met meer dan 75 % eluens B werden dergelijke pieken verkregen. Hoe minder eluens B hoe breder de piek werd, terwijl bij minder dan 70 % eluens B saxitoxine niet meer te detecteren was.

Een nadeel bij het werken met de Sullivan gradient is de stijging van de basislijn bij hogere concentraties eluens B. Saxitoxine elueert net op het begin van de helling. Dit kan problemen opleveren bij de bepaling van de piekhoogte. Bij hogere oxidantflow wordt de stijging echter wat verminderd, zodat de saxitoxinepiek beter te bepalen is. Aangezien saxitoxine het laatst eluerende toxine is zijn er niet erg veel problemen door de stijging te verwachten.

De kolom die Sullivan gebruikt is een zogenaamde PRP-1 kolom, een bepaald type rephersed phase kolom. (71,72).

Het bleek echter dat een gewone RP kolom, een Microspher RP-18 kolom, voor saxitoxine precies dezelfde resultaten gaf. Er is met beide kolommen gewerkt, maar het meest met de Microspher kolom, vooral omdat de PRP kolom ging lekken en dus onbruikbaar werd.

9 CONCLUSIES EN RICHTLIJNEN VOOR VERDER ONDERZOEK

DSP

De derivatiseringsstap gaat goed; de derivatisering is reproduceerbaar. De scheiding van okadainezuur met de ADAM-pieken is bereikt. Een clean-up is, zoals het zich laat aanzien, niet nodig.

Het enige probleem wat er bij de DSP-bepaling nog rest is de opwerking van de mosselen. Het grootste probleem, de vele stoorpieken is inmiddels opgelost. Mosselen geven echter geen reproduceerbaar chromatogram en okadainezuur is na de opwerking niet of zeer moeilijk terug te vinden. De opwerking dient dus nog verbeterd te worden.

Eventueel kunnen er nog andere derivatiseringsreagentia getest worden, of de problemen hiermee opgelost zijn is echter maar de vraag.

Bij de standaardoplossing van okadainezuur moet op een of andere manier gekeken worden naar de zuiverheid en de stabiliteit bij bewaren in de vriezer.

ADAM

De ADAM-synthese verloopt goed. De opbrengst is zodanig hoog dat er per synthese voldoende ADAM (van goede kwaliteit) verkregen kan worden om enkele maanden vooruit te kunnen, mits de ADAM in de vriezer wordt bewaard.

De ADAM-analyse lijkt goed te werken, maar dient nog verder uitgewerkt te worden.

PSP

De methode voor de PSP-bepaling verloopt goed voor saxitoxine. Problemen bij de opwerking zijn er niet te verwachten.

Voor de andere toxines dienen er eerst standaardoplossingen beschikbaar te komen, waarna de methode opnieuw geoptimaliseerd dient te worden. Hierbij kan gedacht worden aan een dubbele bepaling, eerst met een hoge oxidant pH om de meeste toxines goed te kunnen detecteren, gevolgd door een bepaling met een lage pH om de andere toxines te bepalen.

Indien er giftige mosselen beschikbaar komen dient de verspreiding van de toxines in de mossel bekeken te worden, waarna de opwerking eventueel aangepast kan worden.

LITERATUURLIJST SCHELPIERVERGIFTIGINGEN

- 1) Schantz, E.J. : "The dinoflagellate poisons." In :
- 2) Ragelis, E.P. : "Seafood toxins." J.A.O.A.C. 69
(1986) 250-253.
- 3) Yasumoto, T. : "Recent progress in the chemistry of dinoflagellate toxins." In : Anderson, D.M. et al.
(eds.) : "Toxic dinoflagellates." Elsevier, New York, 1985, p.259-270.
- 4) Taylor, F.J.R. : "The toxigenic gonyaulacoid dinoflagellates." In: Taylor, D.L. and H.H. Seliger (eds.)
" Toxic dinoflagellate blooms." Elsevier, New York, 1979, p.47-56.
- 5) Kat, M. : "Dinophysis acuminata blooms in the Dutch coastal area related to diarrhetic mussel poisoning in the Dutch Waddensea." Sarsia 68 (1983) 81-84.
- 6) Kat, M. : "Dinophysis acuminata blooms, the distinct cause of Dutch mussel poisoning." In : Anderson, D.M. et al. (eds.) : "Toxic dinoflagellates." Elsevier, New York, 1985, p. 73-77.
- 7) Kat, M. : "Diarrhetische mosselvergiftiging in Nederland, gerelateerd aan het voorkomen van Dinophysis acuminata." De Ware(n) Chemicus 13 (1983) 25-29.
- 8) Kumagai, M. et al. : "Okadaic acid as the causative toxin of diarrhetic shellfish poisoning in Europe." Agric. Biol. Chem. 50 (1986) 2853-2857.
- 9) Yasumoto, T. et al. : "Diarrhetic shellfish poisoning." In : Ragelis, E.P. (ed.) "Seafood toxins." ACS symposium series no 262, American Chemical Society, Washington, 1984, p. 207-216.
- 10) Yasumoto, T. et al. : "Diarrhetic shellfish toxins." Tetrahedron 41 (1985) 1019-1025.
- 11) Murata, M. et al. : "Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning." Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 48 (1982) 549-552.
- 12) Kat, M. : "Diarrhetic mussel poisoning in the Netherlands related to the dinoflagellate Dinophysis acuminata." Anth. Leeuw. 49 (1983) 417-427.
- 13) Murakami, Y. et al. : "Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate Prorocentrum lima." Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 48 (1982) 69-72.
- 14) Tachibana, K. et al. : "Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus Halichondra." J. Am. Chem. Soc. 103 (1981) 2469-2471.
- 15) Shibata, S. et al. : "Contractile effects of okadaic acid, a novel ionophore-like substance from black sponge, on isolated smooth muscles under the condition of Ca deficiency." J.Pharm.Exp.Ther. 223 (1982) 135-143.
- 16) Isobe, M. et al. : "Synthetic studies towards marine polyethers (1) : A stereocontrolled synthesis of the C-segment of okadaic acid." Tetrahedron Letters 25 (1984) 3607-3610.
- 17) Ichikawa, Y. et al. : "Synthetic studies towards marine polyethers (2) : synthesis of the B-segment of okadaic acid and coupling to the C-segment." Tetrahedron Letters 25 (1984) 5049-5052.

- 18) Isobe, M. et al. : "Synthetic studies towards marine polyethers (3) : stereocontrol for segment-A1 of okadaic acid by means of oxymercuration and epoxydation." Tetrahedron Letters 26 (1985) 5199-5202.
- 19) Takagi, T. et al. : "Toxic effect of free unsaturated fatty acids in the mouse assay of diarrhetic shellfish toxins by intraperitoneal injection." Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 50 (1984) 1413-1418.
- 20) Shiraji, K. et al. : "Determination of the diarrhetic shellfish poisoning by measuring 50 % acid phosphatase activity inhibitory concentration (APIC 50)." J. Fd. Hyg. Soc. Jap. 26 (1985) 638-642. In Japans, abstract uit Food Science and Technology Abstracts 1986 abstract 9 R 26.
- 21) Murata, M. et al. : "The structure of Pectenotoxin-3, a new constituent of diarrhetic shellfish toxins." Agr. Biol. Chem. 50 (1986) 2693-2695.
- 22) Halstead, B.W. and E.J. Schantz : "Paralytic shellfish poisoning." WHO offset publication No 79, WHO, Geneva, 1984, 60 p.
- 23) West, P.A. and M.L. Cullum : "Notes on the occurrence of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxin in shellfish from the northeast England and Scotland areas, 1981-1983." Plankton 85-87.
- 24) Luthy, J. : "Epidemic paralytic shellfish poisoning in Western Europe, 1976." In : Taylor, D.L. and H.H. Seliger (eds.) : "Toxic dinoflagellate blooms." Elsevier, New York, 1979, p.15-22.
- 25) Lee, J.S. et al. : "Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high performance liquid chromatography." Agr. Biol. Chem. 51 (1987) 877-881.
- 26) Nakamura, M. et al. : "Occurrence of saxitoxin in puffer fish." Toxicon 22 (1984) 381-385.
- 27) Kodama, M. et al. : "Occurrence of saxitoxin and other toxins in the liver of the pufferfish Takifugu pardalis." Toxicon 21 (1983) 897-900.
- 28) Kotaki, Y. et al. : "Analysis of paralytic shellfish toxins of marine snails." Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 47 (1981) 943-946.
- 29) Shimizu, Y. : "Developments in the study of paralytic shellfish toxins." In : Taylor, D.L. and H.H. Seliger (eds.) "Toxic dinoflagellate blooms." Elsevier, New York, 1979, p.321-326.
- 30) Jacobi, P.A. et al. : "Total synthesis of +/-saxitoxin." J.Am.Chem.Soc. 106 (1984) 5594-5598.
- 31) Shimizu, Y. et al. : "Biosynthesis of saxitoxin analogues : the unexpected pathway." J.Am.Chem.Soc. 106 (1984) 6433-6434.
- 32) Hall, S. et al. : "Dinoflagellate neurotoxins related to saxitoxin : structures of toxins C3 and C4, and confirmation of the structure of neosaxitoxin." Tetrahedron Letters 25 (1984) 3537-3538.
- 33) Jonas-Davies, J. et al. : "Semiautomated method for the analysis of PSP toxins in shellfish." J.Fd.Sci. 49 (1984) 1506-1509,1516.
- 34) anonymus : "Paralytic shellfish poisoning, biological method, final action." A.O.A.C. Official methods of

analysis 1984, p.344-345.

- 35) Bates, H.A. and H. Rapoport : "A chemical assay for saxitoxin, the paralytic shellfish poison." J. Agr. Fd. Chem. 23 (1975) 237-239.
- 36) Bates, H. A. et al. : "A chemical assay for saxitoxin. Improvements and modifications." J.Agr.Fd.Chem. 26 (1978) 252-254.
- 37) Bose, R.J. and J.E. Reid : "Evidence for the heterogeneity of paralytic shellfish toxin in clams and mussel samples gathered near Prince Rupert, British Columbia." In : Taylor, D.L. and H.H. Seliger (eds.) "Toxic dinoflagellate blooms." Elsevier, New York, 1979, p.399-402.
- 38) Shoptaugh, N.H. et al. : "Use of fluorometry for the determination of Gonyaulax tamarensis var excavata toxins in New England shellfish." J. Agr. Fd. Chem. 29 (1981) 198-200.
- 39) Hellwig, E. und F. Petuely : "Bestimmung von Saxitoxin in Muschelkonserven." Z. Lebensm. Forsch. 171 (1980) 165-169.
- 40) Davio, S.R. and P.A. Fontelo : "A competitive displacement assay to detect saxitoxin and tetrodotoxin." Anal.Biochem. 141 (1984) 199-204.
- 41) Mosley, S. et al. : "A combination fluorescence assay and Folin-Ciocalteu phenol reagent assay for the detection of paralytic shellfish poisons." Toxicon 23 (1985) 375-381.
- 42) Chu, F.S. and T.S.L. Fan : "Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for saxitoxin in shellfish." J.A.O.A.C. 68 (1985) 13-16.
- 43) Davio, S.R. et al. : "Progress toward development of monoclonal antibodies to saxitoxin: antigen preparation and antibody detection." In : Anderson, D.M. et al. (eds.) : "Toxic dinoflagellates.", Elsevier, New York, 1985, p.343-348.
- 44) Buckley, L.J. et al. : "Isolation of Gonyaulax tamarensis toxins from soft shell clams (Mya arenaria) and a thin-layer chromatographic-fluorometric method for their detection." J.Agr.Fd.Chem. 24 (1976) 107-111.
- 45) Buckley, L.J. et al. : "Construction of a paralytic shellfish toxin analyzer and its application." Anal. Biochem. 85 (1978) 157-164.
- 46) Sullivan, J.J. and W.T. Iwaoka : "High pressure liquid chromatographic determination of toxins associated with paralytic shellfish poisoning." J.A.O.A.C. 66 (1983) 297-303.
- 47) Sullivan, J.J. et al. : "Comparison of HPLC and mouse bio-assay methods for determining PSP toxins in shellfish." J.Fd.Sci. 48 (1983) 1312-1314
- 48) Sullivan, J.J. and M.M. Wekell : "Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by high pressure liquid chromatography." In : Ragelis, E.P. (ed.) "Seafood toxins.", ACS symposium series no 262, American Chemical Society, Washington, 1984, p. 197-205.
- 49) Sullivan, J.J. et al. : "The determination of PSP

- toxins by HPLC and autoanalyser." In : Anderson, D.M. et al. (eds.) "Toxic dinoflagellates.", Elsevier, New York, 1985, p.275-280.
- 50) Boyer, G.L. et al. : "Use of high-performance liquid chromatography to investigate the production of paralytic shellfish toxins by *Protogonyaulax* spp. in culture." Marine Biology 93 (1986) 361-369.
- 51) Oshima, Y. et al. : "Liquid chromatographic-fluorometric analysis of paralytic shellfish toxins." Agric. Biol. Chem. 48 (1984) 1707-1711.
- 52) Gill, T.A. et al. : "Thermal resistance of paralytic shellfish poison in soft-shell clams." J. Fd. Prot. 48 (1985) 659-662.
- 53) Dale, B. et al. : "Toxicity in resting cysts of the red-tide dinoflagellate *Gonyaulax excavata* from deeper water coastal sediments." Science 201 (1979) 1223-1225.
- 54) Genenah, A.A. and Y. Shimizu : "Specific toxicity of paralytic shellfish poisons." J. Agr. Fd. Chem. 29 (1981) 1289-1291.
- 55) Gershey, R.M. et al. : "A colorimetric method for determination of saxitoxin." J. Fish. Res. Board Can. 34 (1977) 559-563.
- 56) Sullivan J.J. et al. : "Application of HPLC for the determination of PSP toxins in shellfish." J. Fd. Sci. 50 (1985) 26-29.
- 57) Nakaya, T. et al. : "The syntheses and reactions of 9-anthryldiazomethane and a-naphtyldiazomethane." Bull. Chem. Soc. Jap. 40 (1967) 691-692.
- 58) Barker, S.A. et al. : "9-Diazomethylanthracene as a new fluorescence and ultraviolet label for the spectrometric detection of picomole quantities of fatty acids by high-pressure liquid chromatography." Anal. Biochem. 107 (1980) 116-123.
- 59) Nimura, N. and T. Kinoshita : "Fluorescence labelling of fatty acids with 9-anthryldiazomethane (ADAM) for high performance liquid chromatography." Anal.Lett. 13(1980) 191-202.
- 60) Shimomura, Y. et al. : "Quantitative determination of the fatty acid composition of human serum lipids by high-performance liquid chromatography." J. Chrom. 383 (1986) 9-17.
- 61) Hatsumi, M. et al. : "Microanalysis of free fatty acids in plasma of experimental animals and humans by high-performance liquid chromatography." J. Chrom. 380 (1986) 247-255.
- 62) Ghiggeri, G.M. et al. : "Separation of the 9-anthryldiazomethane derivates of fatty acids by high-performance liquid chromatography on a fatty acid analysis column. Application to albumin-bound fatty acid analysis." J. Chrom. 381 (1986) 411-418.
- 63) Ichinose, N. et al. : "High-performance liquid chromatography of 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid in fatty acids (C18 and C20) by labelling with 9-anthryldiazomethane as a fluorescent agent." J. Chrom. 295 (1984) 463-469.
- 64) Martinez, E.E. and W. Shimoda : "Determination of

- monensin sodium residues in beef liver tissue by liquid chromatography of a fluorescent derivative." J.A.O.A.C. 68 (1985) 1149-1153.
- 65) Martinez, E.E. and W. Shimoda : "Liquid chromatographic determination of multiresidue fluorescent derivatives of ionophore compounds, monensin, salinomycin, narasin and lasalocid in beef liver tissue." J.A.O.A.C. 69 (1986) 637-641.
- 66) Takatsuki, K. et al. : "Liquid chromatographic determination of monensin in chicken tissues with fluorescent detection and confirmation by gas-chromatography mass-spectrometry." J.A.O.A.C. 69 (1986) 443-448.
- 67) Hatsumi, M. et al. : "9-anthryldiazomethane derivatives of prostaglandins for high-performance liquid chromatography." J. Chrom. 253 (1982) 271-275.
- 68) Imaoka, S. et al. : "Specific and rapid assay of urinary oxalic acid using high-performance liquid chromatography." Anal. Biochem. 128 (1983) 459-464.
- 69) Yoshida, T. et al. : "Fluorescent labelling of amino acids with 9-anthryldiazomethane and its application to high-performance liquid chromatography." J. Chrom 348 (1985) 425-429.
- 70) Attenburrow, J. et al. : "A synthesis of vitamin A from cyclohexanon." J.Chem.Soc. (1952) 1094-1111.
- 71) Lingeman, H. et al. : "Fluorescence detection in high-performance liquid chromatography." J.Liq.Chrom. 8 (1985) 789-874.
- 72) Tetrode, M. : "Diarrhetische schelpierversgiftiging." Verslag afstudeeropdracht HLO, RIKILT, Wageningen, 1987, 41 p.
- 73) Stryer, L. : "Biochemistry." Freeman and Company, New York, 2^e druk, 1981, 949 p.
- 74) Iskandarani, Z and D.J. Pietrzyk : "Ion interaction chromatography of organic anions on a poly(styrene-divinylbenzene) adsorbent in the presence of tetraalkylammonium salts." Anal. Chem. 54 (1982) 1065-1071.
- 75) Smith, R.L. and D.J. Pietrzyk : "Retention of inorganic and organic cations on a poly(styrene-divinylbenzene) adsorbent in the presence of alkylsulfonate salts." Anal. Chem. 56 (1984) 1572-1577.
- 76) Korte, D.W. : "9-(Chloromethyl)anthracene: a useful derivatizing reagent for enhanced ultraviolet and fluorescence detection of carboxylic acids with liquid chromatography." J.Chrom. 243 (1982) 153-157.
- 77) Lam S. and E. Grushka : "Labeling of fatty acids with 4-bromomethyl-7-methoxy-coumarin via crown ether catalyst for fluorimetric detection in high-performance liquid chromatography." J.Chrom. 158 (1978) 207-214.
- 78) Lloyd, J.B.F. : "Phenanthrimidazoles as fluorescent derivatives in the analysis of fatty acids by high-performance liquid chromatography." J.Chrom. 189 (1980) 359-373.
- 79) Ikeda, M. et al. : "Fluorimetric high-performance liquid chromatography of 9-aminophenanthrene-

- derivatized free fatty acids." J. Chrom. 305 (1984)
261-270.
- 80) Kamada, S. et al. : "Fluorescence high-performance liquid chromatographic determination of free and conjugated bile acids in serum and bile using 1-bromoacetylpyrene as a pre-labeling agent." J. Chrom. 272 (1983) 29-41.
- 81) Ryan, P.J. and T.W. Honeyman : "Determination of fatty acids by high-performance liquid chromatography of dns-ethanolamine derivatives." J. Chrom. 312 (1984) 461-466.
- 82) Lingeman, H. et al. : "Rapid sensitive and specific derivatization methods with 9-(hydroxymethyl)-anthracene for the fluorimetric detection of caboxylic acids prior to reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation." J. Chrom. 290 (1984) 215-222.
- 83) Tsuchiya, H. et al. : "Sensitive high-performance liquid chromatography for prostaglandins using a fluorescence reagent, 4-bromomethyl-7-acetoxy-coumarine." J. Chrom. 231 (1982) 247-254.
- 84) Farinotti, R. et al. : "4-Bromomethyl-6,7-dimethoxycoumarin as a fluorescent label for carboxylic acids in chromatographic detection." J. Chrom. 269 (1983) 81-94

BIJLAGEN

BIJLAGE 1 TOXISCHE DINOFLAGELLATEN

soort	ziekte	land
Amphidium carterae	geen *	-
A. rhyncocephalum	geen	-
Cochlodinium heterolobatum	geen	-
Dinophysis acuminata	DSP	Europa, Japan
D. acuta	DSP	Noorwegen, Zweden, Chili
D. caudata	DSP	Thailand
D. fortii	DSP	Japan
D. mitra	DSP	-
D. tripos	geen	-
Gambierdiscus toxicus	ciguatera	Stille Oceaan
Glenodinium foliaceum	geen	-
Gonyaulax acatenella **	PSP	Atl.Oceaan
G. catenella	PSP	Stille Oceaan
G. fratercula	geen	-
G. grindeyi	geen	-
G. mikimotoi		geen -
G. monilata	geen	-
G. polyedra	geen	-
G. polygramma	geen	-
G. spirale	geen	-
G. splendens	geen	-
G. tamarensis	PSP	Atl.Oceaan, Noordzee
G. veneficum	geen	-
Gyrodinium aureolum	geen	-
Gy. obtusum	geen	-
Noctiluca scintillans	geen	-
Ostreopsis klebsii	geen	-
O. ovata	geen	-
O. siamensis	geen	-
Oxyrrhis marina	geen	-
Prorocentrum balticum	geen	-
P. concavum	geen	-
P. lima	DSP	Japan
P. minimum	DSP	Japan
Protoperidinium depressum	geen	-
Pr. steinii	geen	-
Ptychodiscus brevis	NSP	Florida
Pyrodinium bahamense var compressa	PSP	Trop. Stille Oceaan
Py. phoneus	PSP	Noord Europa

* onder geen wordt verstaan dat de betreffende soort wel toxisch is in een muistest, maar dat er nooit directe aanwijzingen met een bepaalde ziekte bij de mens zijn geweest

** Hoewel er sinds enkele jaren een herindeling van het geslacht Gonyaulax is geweest staan hier nog alle soorten onder Gonyaulax, dus ook de soorten die inmiddels bij andere geslachten zijn ondergebracht.

bron (1,3,22)

BIJLAGE 2 : CORRECTIETABELLEN PSP-MUISTEST

Table 18:03 Sommer's Table

Death time:mouse unit relations for paralytic shellfish poison (acid)

Death Time*	Mouse Units	Death Time*	Mouse Units
1:00	100	5:00	1.92
10	66.2	05	1.89
15	38.3	10	1.86
20	26.4	15	1.83
25	20.7	20	1.80
30	16.5	30	1.74
35	13.9	40	1.69
40	11.9	45	1.67
45	10.4	50	1.64
50	9.33		
55	8.42	6:00	1.60
		15	1.54
2:00	7.67	30	1.48
05	7.04	45	1.43
10	6.52		
15	6.06	7:00	1.39
20	5.66	15	1.35
25	5.32	30	1.31
30	5.00	45	1.28
35	4.73		
40	4.48	8:00	1.25
45	4.26	15	1.22
50	4.06	30	1.20
55	3.88	45	1.18
3:00	3.70	9:00	1.16
05	3.57	30	1.13
10	3.43	10:00	1.11
15	3.31	30	1.09
20	3.19		
25	3.08	11:00	1.075
30	2.98	30	1.06
35	2.88		
40	2.79	12:00	1.05
45	2.71		
50	2.63	13	1.03
55	2.56	14	1.015
		15	1.000
4:00	2.50	16	0.99
05	2.44	17	0.98
10	2.38	18	0.972
15	2.32	19	0.965
20	2.26	20	0.96
25	2.21	21	0.954
30	2.16	22	0.948
35	2.12	23	0.942
40	2.08	24	0.937
45	2.04	25	0.934
50	2.00	30	0.917
55	1.96	40	0.898
		60	0.875

* Minutes:Seconds.

Correction table for weight of mice

Wt of Mice, g	Mouse Units
10	0.50
10.5	0.53
11	0.56
11.5	0.59
12	0.62
12.5	0.65
13	0.675
13.5	0.70
14	0.73
14.5	0.76
15	0.785
15.5	0.81
16	0.84
16.5	0.86
17	0.88
17.5	0.905
18	0.93
18.5	0.95
19	0.97
19.5	0.985
20	1.000
20.5	1.015
21	1.03
21.5	1.04
22	1.05
22.5	1.06
23	1.07

Correctietabel voor het gewicht van de proefmuis

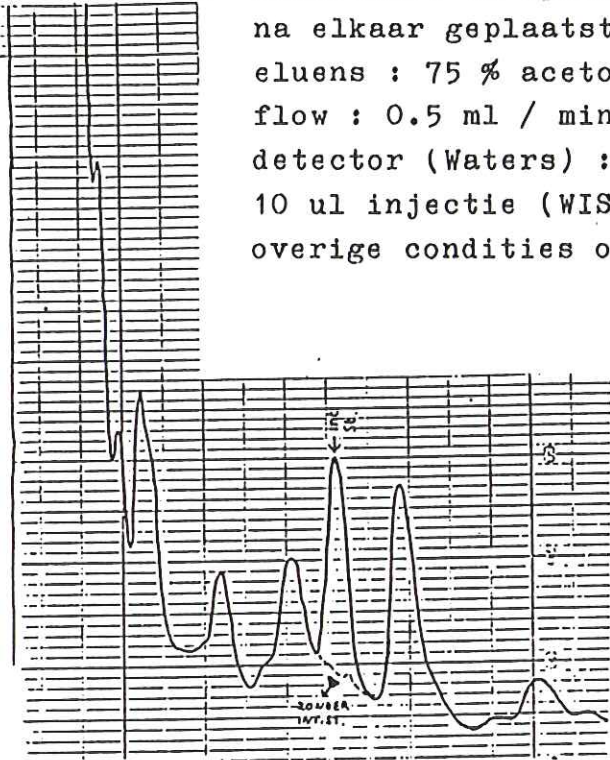
Tabel voor de omrekening van overlijdenstijdstip naar toxische hoeveelheid in Mouse Units (als saxitoxine)

(bron 34)

BIJLAGE 3 : CHROMATOGRAMMEN EN RESULTATEN DSP BEPALING

Chromatogrammen van dibenz(a,h)anthraceen (interne standaard), ADAM met interne standaard, ADAM met okadainezuurderivaat en een chromatogram van een chloroform-extract, verkregen na toevoeging van okadainezuur aan mosselen en opwerking volgens de in 6.4 beschreven methode.

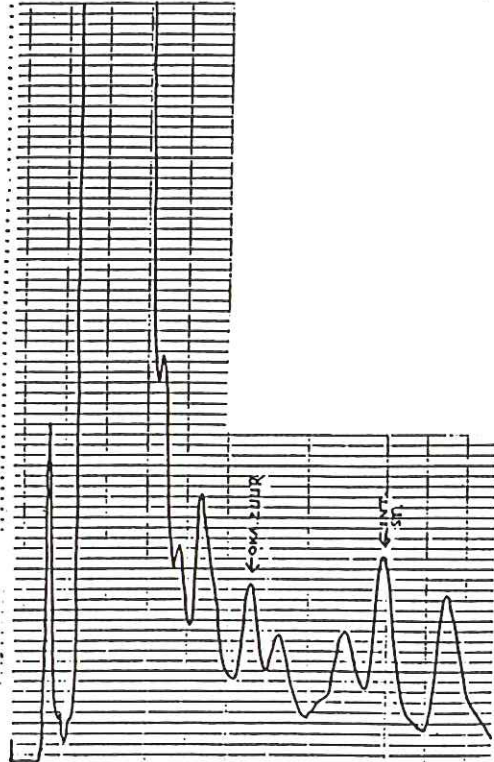
Conditioes : Lichrosorb en Spherisorb kolom,
na elkaar geplaatst (zie 6.6)
eluens : 75 % acetonitril in water
flow : 0.5 ml / min
detector (Waters) : 64
10 ul injectie (WISP)
overige condities onderling gelijk.



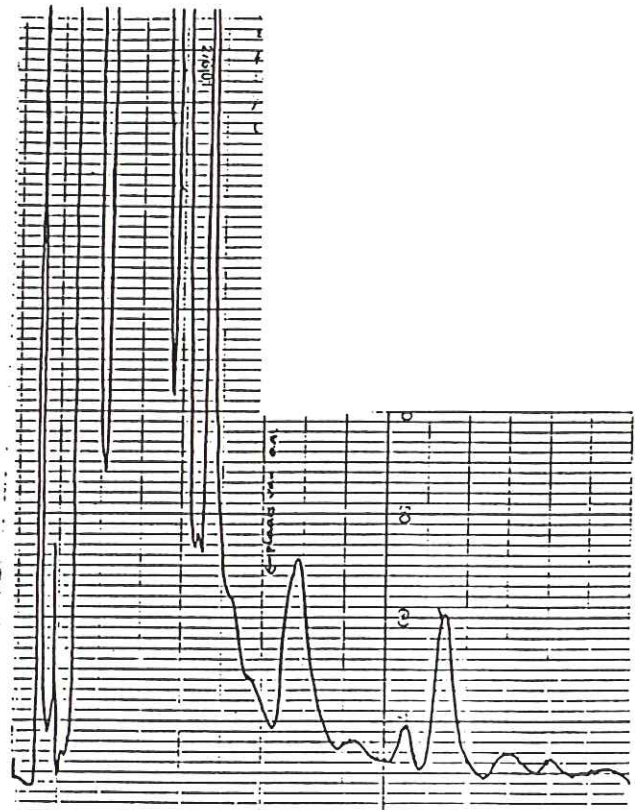
Blanco ADAM met interne standaard



Blanco interne standaard



Okadainezuurderivaat



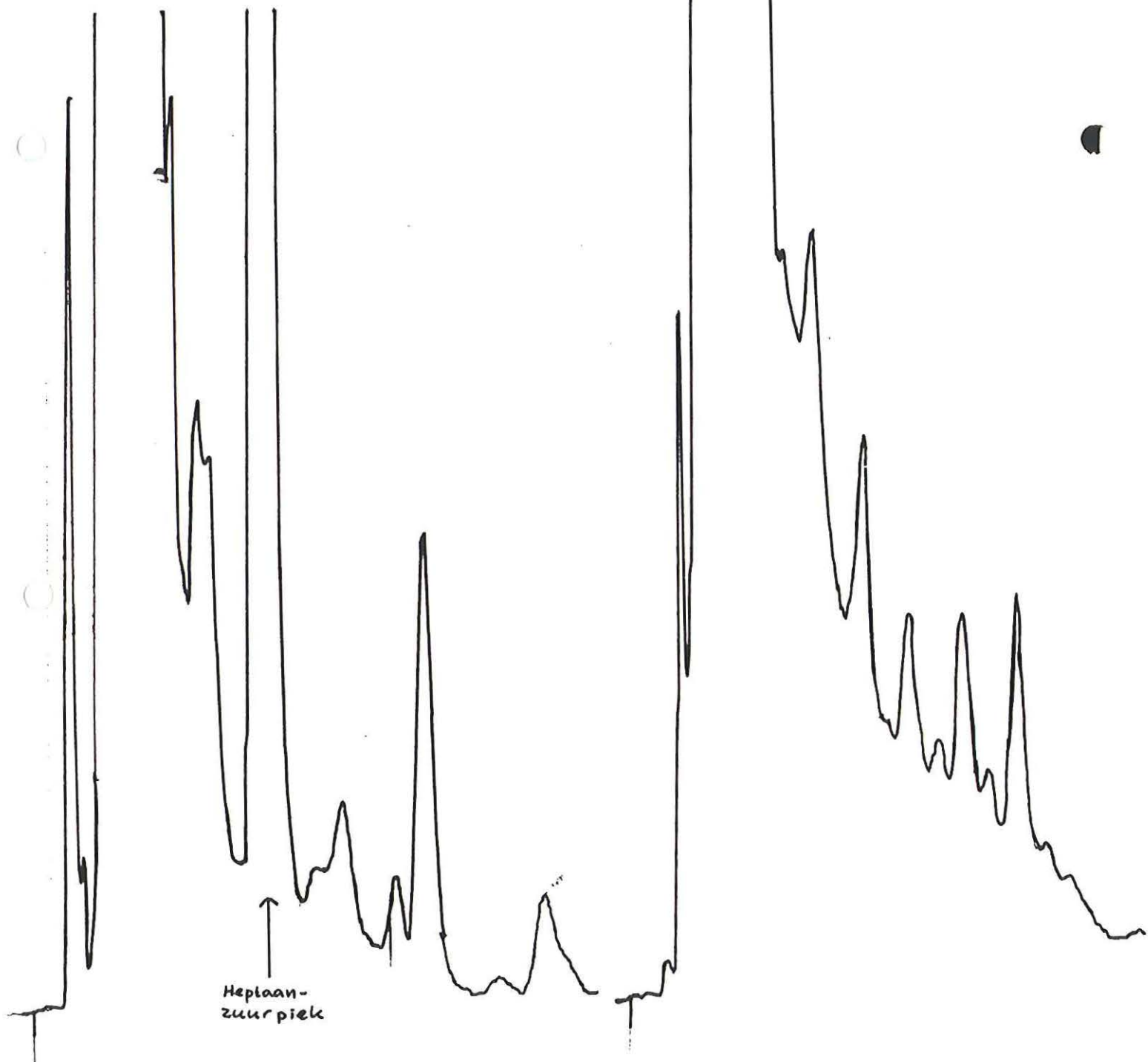
Chloroformextract

Invloed van zuur of base op de derivatisering.

Conditie : kolom : Spherisorb ODS-2
eluens : 80 % acetonitril
flow : 0,4 ml/min
recorder : 5 mV, 5 mm/min
detector : Waters gain 16
injectie : 25 ul
zuur : 0,5 M fosforzuur
base : 44 mM kaliumwaterstofcarbonaat (K_2HCO_3)
totaal eindvolume in buisje : 300 ul
te derivatiseren stof : hexaanzuur

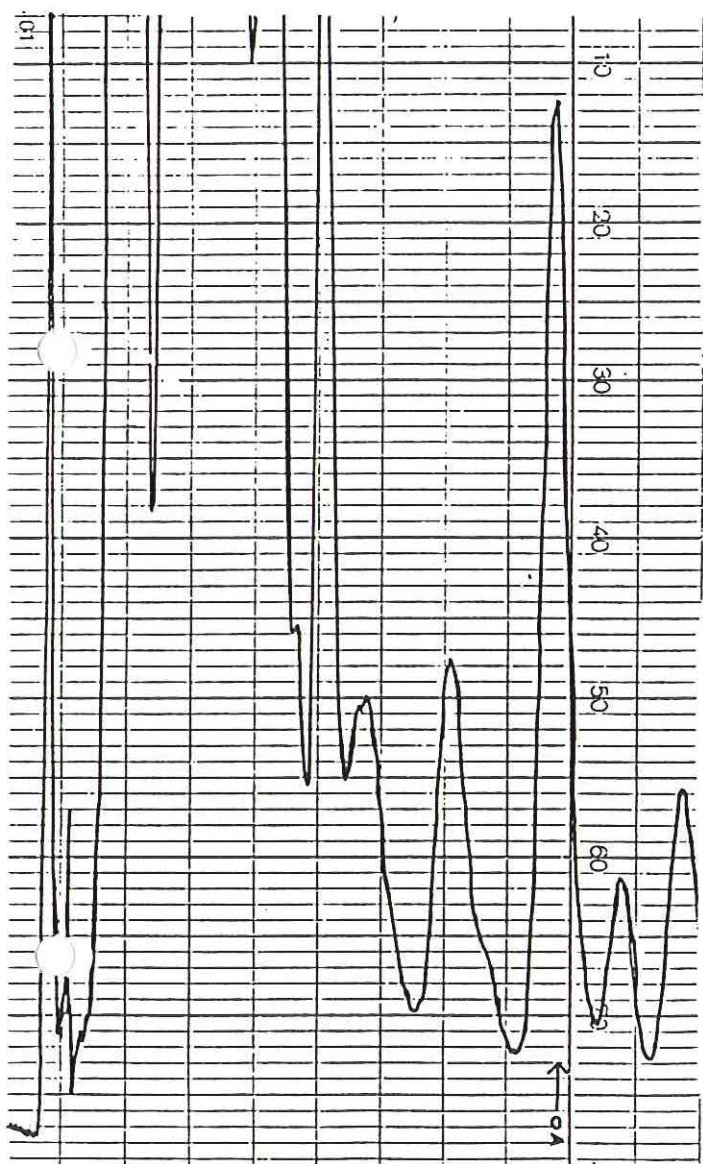
Toegevoegd 0 ul zuur

Toegevoegd 10 ul zuur

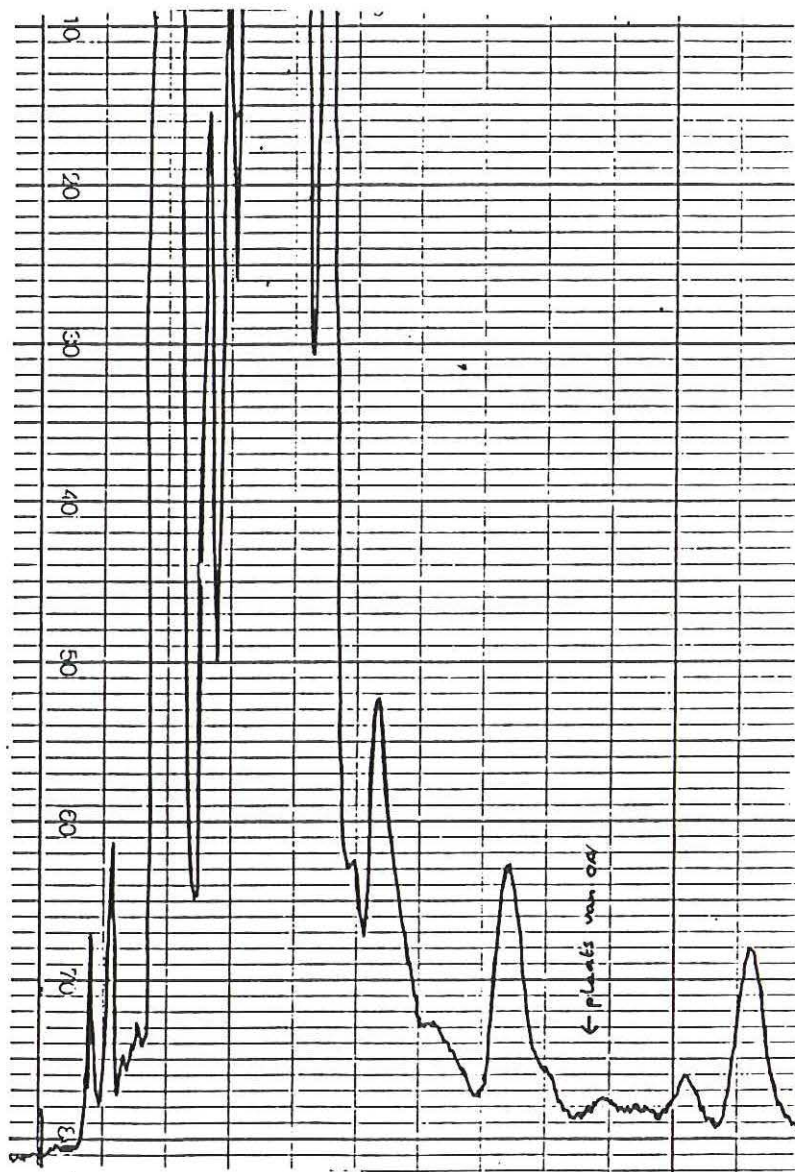


Resultaten voor base gelijk; ook bij 5 ul zuur of base al dit resultaat

Resultaten opwerking van mosselen met daaraan okadainezuur toegevoegd. A= ADAM met okadainezuur (OA) in chloroform gederivatiseerd, B= chloroform extract van mosselen met okadainezuur. Blāco bevat 1000 ug okadainezuur per 300 ul. Monster zou bij 100 % recovery 850 ug/ 300 ul bevatten. Onderlinge chromatografische condities volledig gelijk.

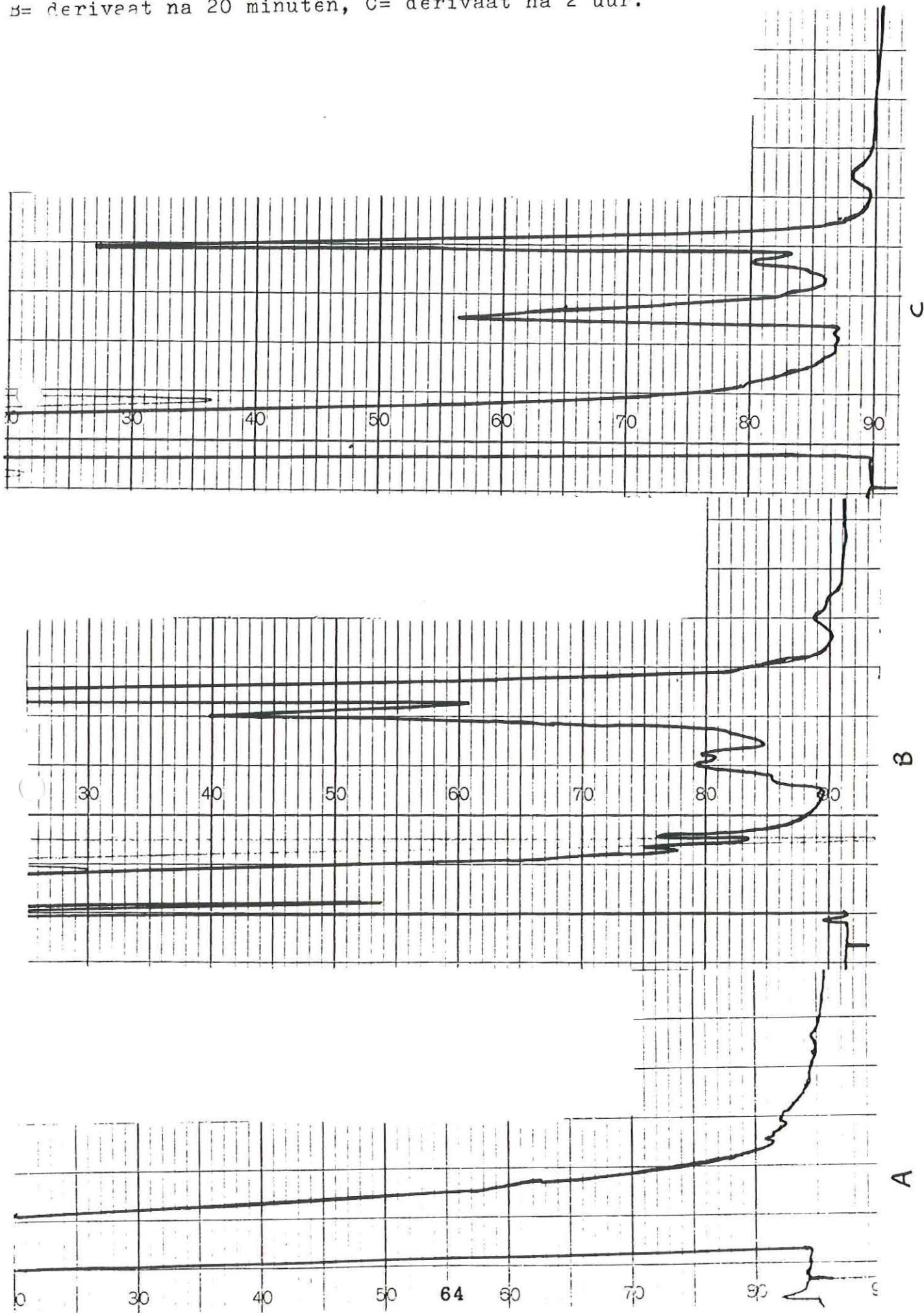


A



B

Chromatogrammen van de derivatisering van monensin met dansylhydrazine. Onderlinge condities gelijk. A= blanco dansylhydrazine, B= derivaat na 20 minuten, C= derivaat na 2 uur.



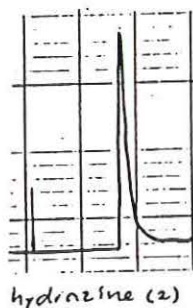
BIJLAGE 4 : CHROMATOGRAMMEN ADAM-SYNTHESE

A= blanco 9-anthraaldehyde (uitgangsstof), B= blanco hydrazine (reagens), C= mengsel na 30 minuten, D= mengsel na de eerste stap (i.e. na 3 uur; 9-anthraaldchydehydrazon oplossing), E= na de tweede stap verkregen ADAM.

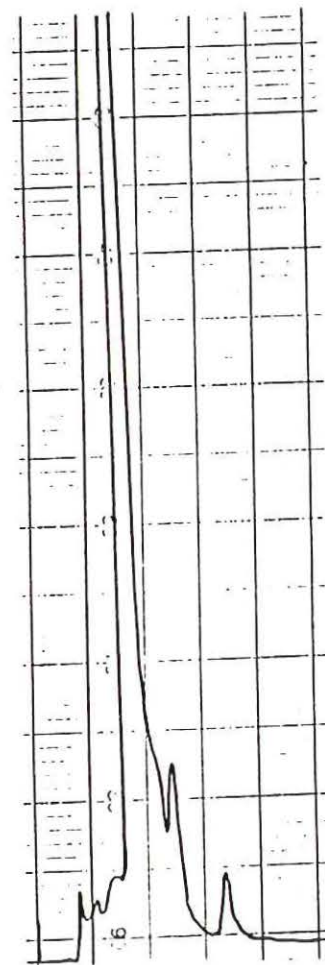
Conditie : kolom : 2-kolomsysteem (zie 6.6)
eluens : 75 % acetonitril
flow : 0,5 ml/min
recorder : 10 mV; 5 mm/min (A-D), 10 mm/min (E)
detector : Waters gain 8 (A,C,D), 2 (B) en 4 (E)
injectie : 20 ul



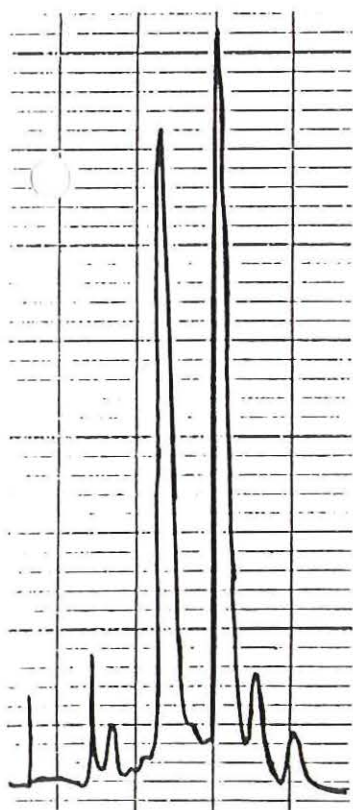
A



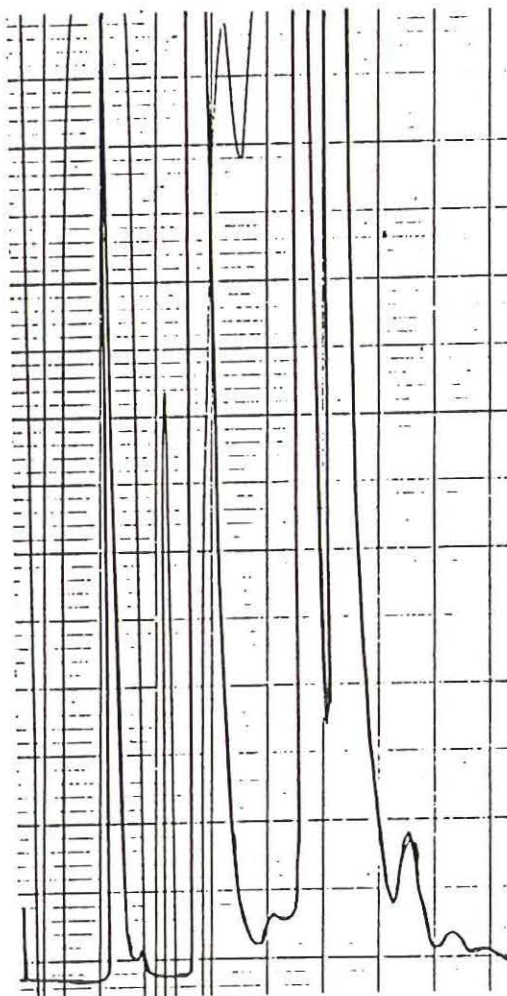
B



C



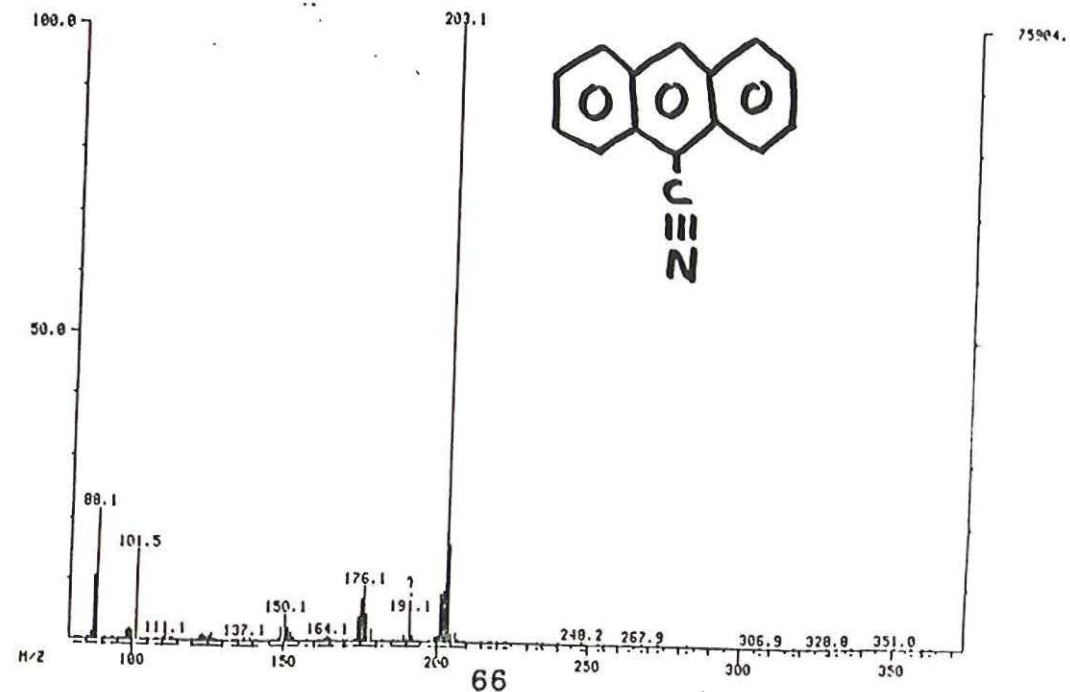
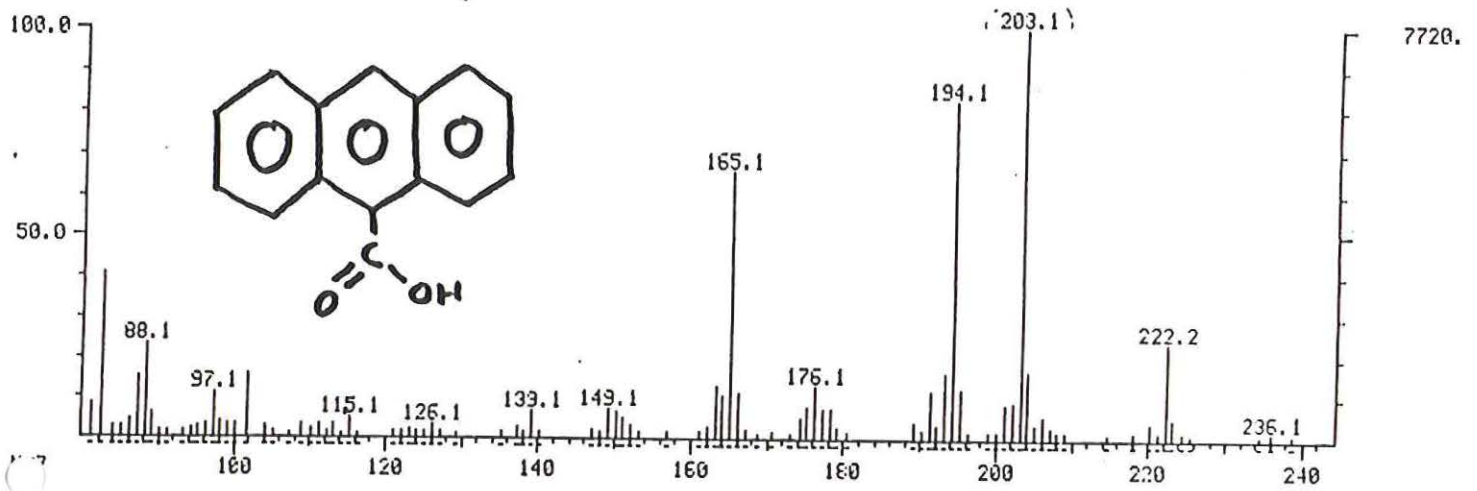
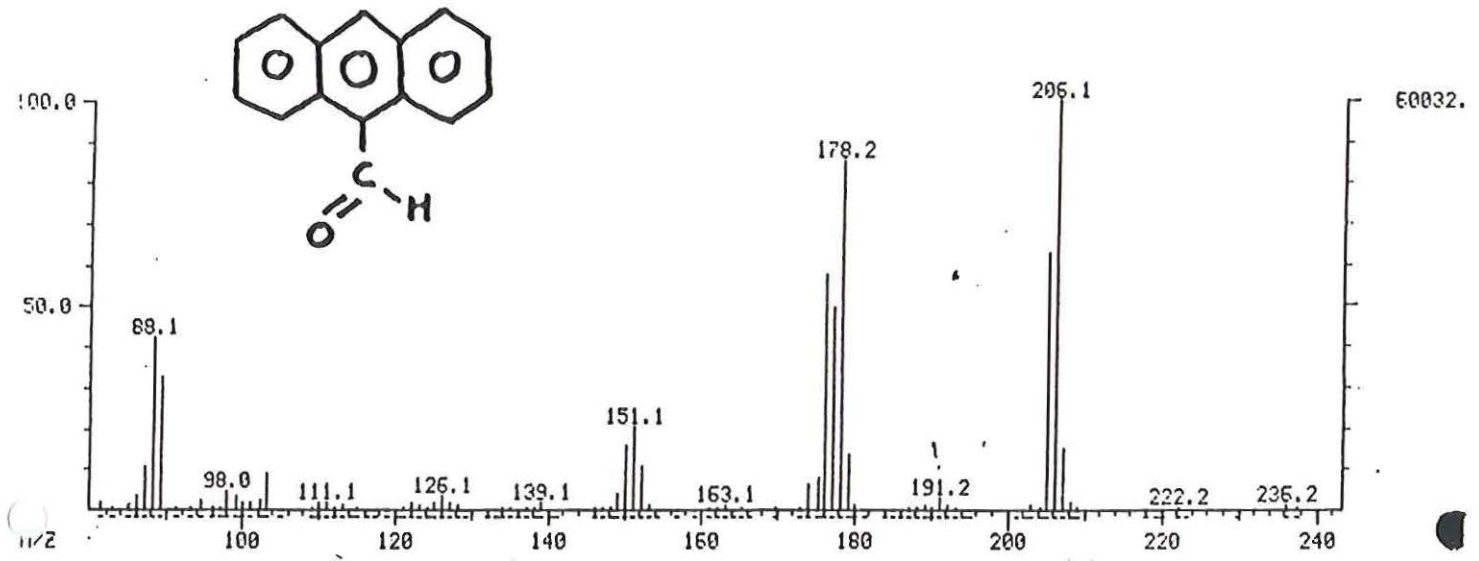
D



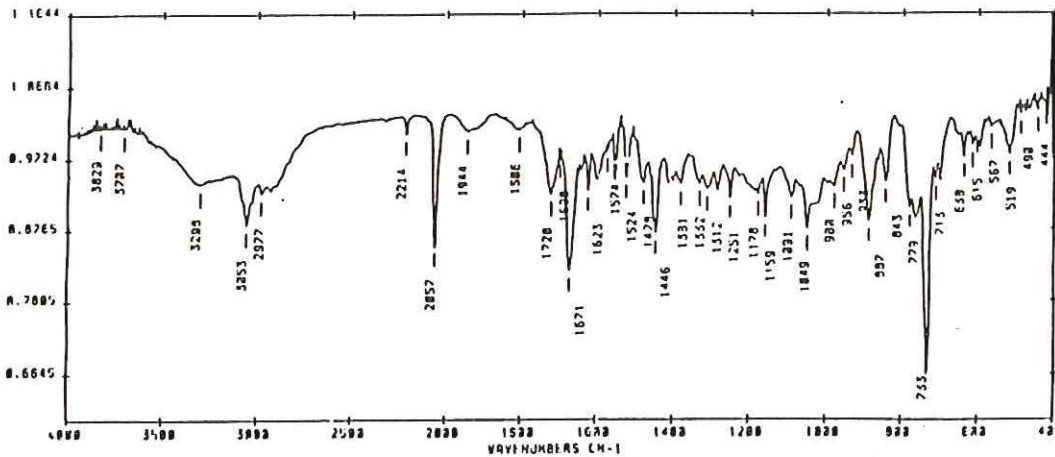
E

BIJLAGE 5 : TABELLEN EN RESULTATEN ADAM ANALYSE

Enkele MS-spectra van componenten in ADAM met de uit deze spectra mogelijke structuren.

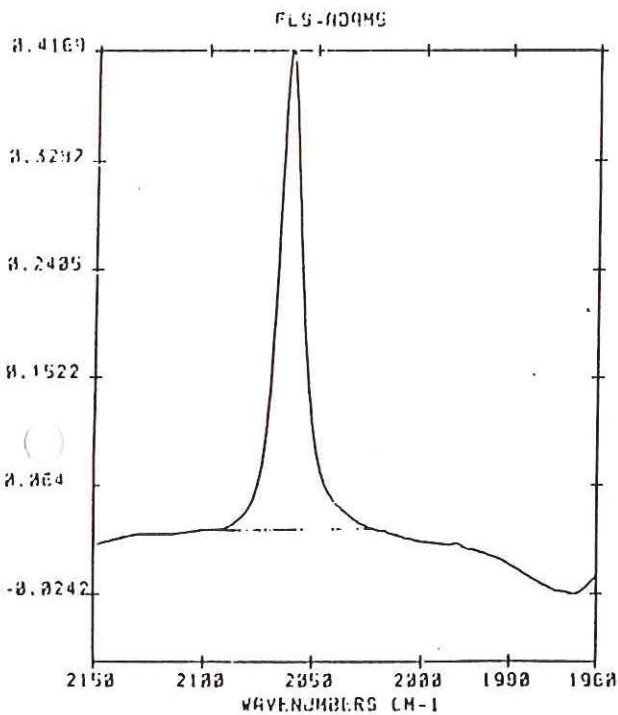


IR-Methode



7-5-8378-5 RSN-1979 REMARKS:
 ADAM-3 NSS-1888
 18-10-87 RES-2 FLS-
 FTIR-TECHNIQUE: DRIFT DATE: 30/10/87 FLR-
 TIME: 13:31:34 ANALYST: J.

IR spectrum van ADAM in ether. Typerende banden bij 2057 cm^{-1} en 733 cm^{-1} , resp. afkomstig van de diazogroep en de aromatische ringen.



OCUN-RALF

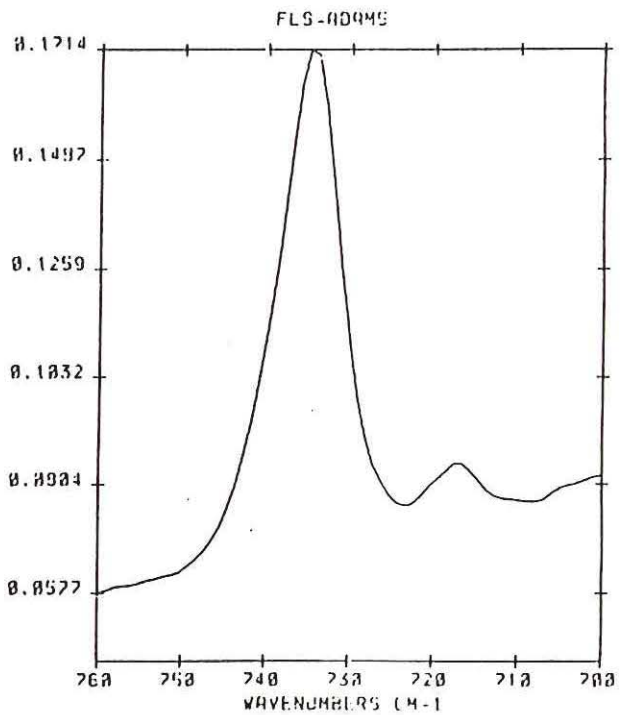
ADAM-4

FTIR-TECHNIQUE: VLSI

RSN=4035

NSS=250
RES=2.0

DATE: 16/02/88
TIME: 10:52:54



REMARKS:

FLS-
FLR-

ANALYST:

Vergrote spectra van de banden bij 2057 cm^{-1} en 733 cm^{-1} te gebruiken bij nauwkeurige berekening van de piekhoogte.

Resultaten HPLC-methode en combinatie met IR methode.

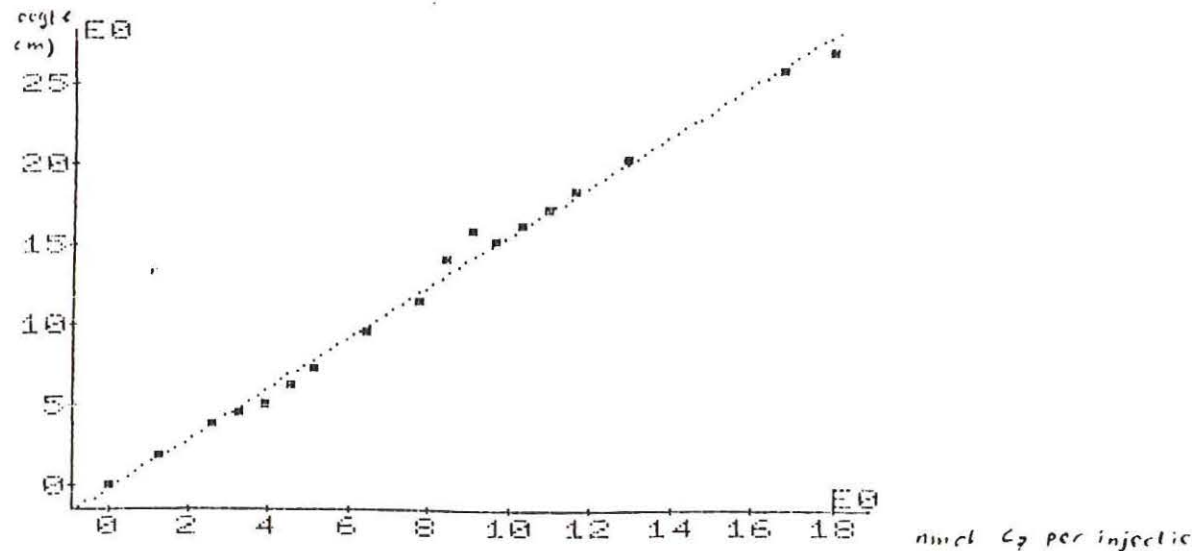
Resultaten ijklijn ADAM.

ul C7	nmol C7	nmol/inj	piho gem	piho/nmol/inj
0	0	0	0	0
10	38.5	1.28	1.85	1.45
20	77.0	2.57	3.90	1.52
25	96.3	3.21	4.50	1.40
30	115.5	3.85	5.10	1.32
35	134.8	4.50	6.30	1.40
40	154.0	5.14	7.20	1.40
50	192.5	6.42	9.50	1.48
60	231.0	7.70	11.45	1.49
65	250.3	8.35	13.90	1.66
70	269.5	8.99	15.80	1.76
75	288.8	9.63	15.05	1.56
80	308.0	10.27	16.05	1.56
85	327.3	10.91	17.10	1.57
90	346.5	11.55	18.20	1.58
100	385.0	12.84	20.20	1.57
130	500.5	16.69	25.75	1.54
140	539.0	17.97	27.00	1.50

injectievolume 10 ul
 gain (Waters) 1
 recorder 5 mm/min
 20 mV (0-100 ul)
 50 mV (130-140 ul)
 piekhoogtes gestandaardiseerd op 20 mV

duplo injecties
 concentratie C7 500 mg/l
 ADAM 100 ul 4-1-C
 totaalvolume per buis 300 ul, aangevuld met methanol

resultaat curve fitter :
 $y = -0.220637818 + 1.57049253x$ waarin $y =$ piekhoogte en
 $x =$ nmol C7 per injectie
 corr.coeff. 0.99642
 stand.afw. 0.69068



Resultaten bepaling ADAM-concentraties :

ADAM 4-1

ul ADAM	ul C7	piho gem	nmol C7 tot
100	130	15.10	293
90	130	14.95	290
80	130	12.7	247
70	130	8.85	173
60	130	8.35	164
50	130	6.65	131
40	130	5.55	110
30	130	4.20	84.4
20	130	2.15	45.3
10	130	1.93	41.1
5	130	0.48	13.4

Hiervan uitgezet ul ADAM tegen gemiddelde piekhoogte voor C7.

Curve fitter waardes ul ADAM/ piho gem : ,
 $y = -0.579596107 + 0.157271274x$, $y = \text{piekhoogte}$
 $x = \text{ul ADAM}$

corr.coeff. 0.9874
 standafw. 0.8621

De richtingscoefficient levert de piekhoogte per ul ADAM. Deze waarde invullen in de vergelijking voor de ijklijn levert de concentratie ADAM in nmol/ml. (je berekent de hoeveelheid omgezet C7 per ml, dit is gelijk aan de concentratie ADAM in nmol/ml)

De volgende waarde werd hierbij gevonden 5.28 nmol/ml

Hetzelfde experiment werd enkele maanden later opnieuw gedaan, hierbij werden de volgende waardes gevonden :

ul ADAM	piho (gem)
0	0
25	4.12
40	11.6
60	17.30

$y = -1.12251376 + 0.125330275x$
 corr.coeff 0.9573
 standafw 1.6137

Deze richtingscoefficient levert een waarde van : 4.65 nmol/ml

infrarood absorptie 0.136

ADAM 4-1-C

ul ADAM	piho gem	nmol C7 tot
100	22.7	438
90	23.5	453
80	23.25	448
70	22.95	443
60	21.65	418
50	18.05	349
40	14.40	279
30	10.35	202
20	6.75	133
10	3.55	72.0
5	1.95	41.5

Curve fitter waardes :
er werd een niet lineaire grafiek verkregen, de grafiek was
lineair tot en met 70 ul ADAM, daarboven was het maximum te
derivatiseren hoeveelheid C7 bereikt. De waardes voor het
lineaire gedeelte zijn :
 $y = 0.184166666 + 0.343833333x$, waarin $y =$ piekhoogte
 $x =$ ul ADAM

corr.coeff. 0.99728
stand. afw. 0.67863

Dit levert een concentratie op van 8.88 nmol/ml
infrarood absorptie 0.427

ADAM 4-2

Deze ADAM werd vanuit vaste ADAM kristallen gemaakt.

ul ADAM	piho gem
0	0
25	5.48
40	13.57
60	22.90
75	28.50

Boven deze waardes ging de grafiek horizontaal lopen.
Curve fitter waardes :

$y = -1.83231885 + .0398057971x$
corr.coeff. 0.9896
standafw. 1.9614

concentratie : 9.93 nmol/ml
infrarood absorptie : mislukt

ADAM 4-3

Synthese idem als 4-2

ul ADAM	piho (gem)
0	0
25	5.38
40	9.33
60	14.92
75	20.40
90	21.82

Curve fitter waardes
 $y = -0.465090358 + 0.257415663x$
corr.coeff. 0.9946
standafw. 1.0014
concentratie : 7.20 nmol/ml
infrarood absorptie : 0.250

ADAM 4-4

synthese idem aan 4-2

ul ADAM	piho (gem)
0	0
25	4.97
40	12.2
60	23.13
75	28.18

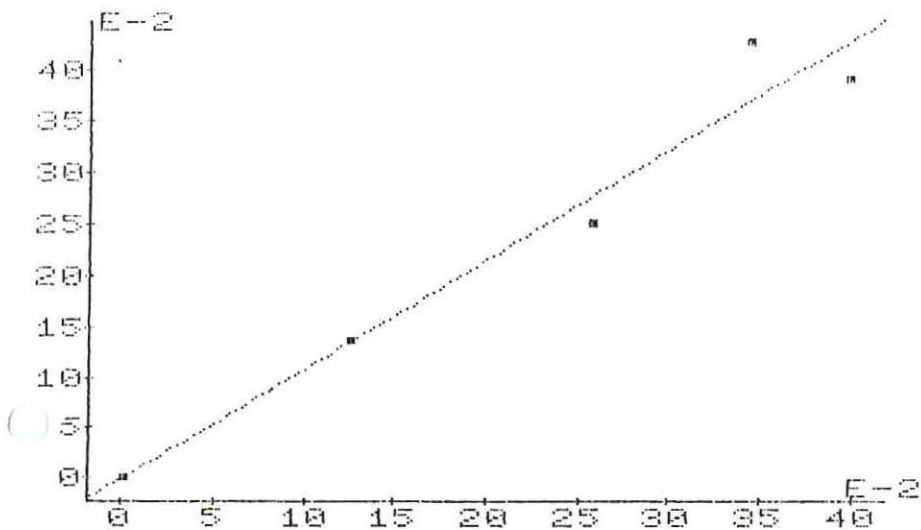
Curve fitter waardes
 $y = -2.23849274 + 0.398362319x$
corr.coeff. 0.9846
standafw. 2.3985
concentratie 9.93 nmol/ml
infrarood absorptie 0.389

Resultaten combinatie richtingscoëfficiënten met IR absorptiemetingen.

X=richtingscoëff. Y=absorptie (IR)

1	0	0
2	.125	.136
3	.257	.25
4	.344	.427
5	.398	.389

curve fitter waarde :
 $y = 6.93384303 \cdot 10^{-4} + 1.06631057x$
 corr.coëff. = 0.978
 stand.afw. = 0.043



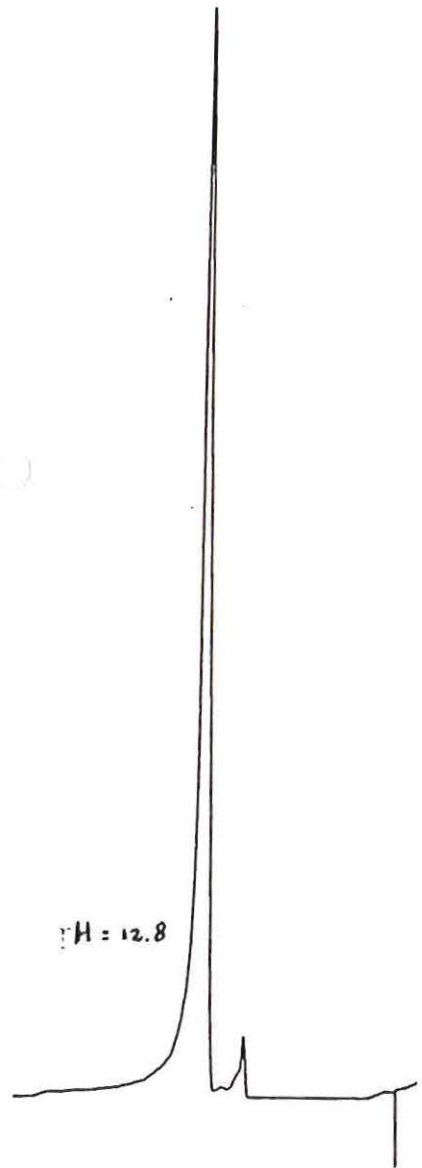
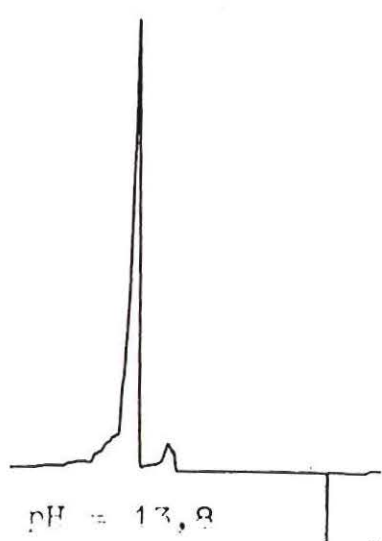
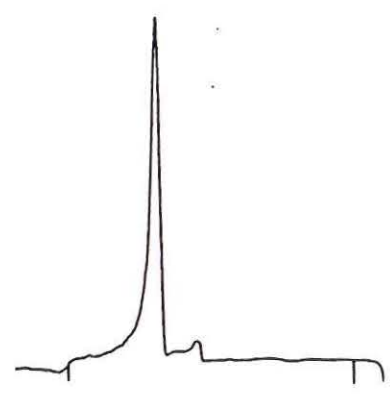
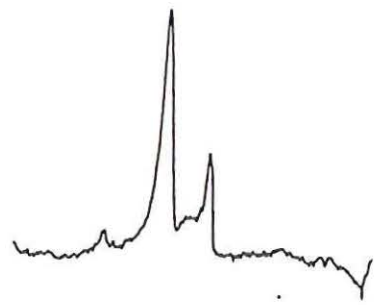
Er bestaat dus waarschijnlijk wel een lineair verband, maar het moet nog verder uitgezocht worden.

BIJLAGE 6 : CHROMATOGRAMMEN EN RESULTATEN PSP BEPALING

Resultaten pH invloed van de oxidant.

Conditie : kolom : Microspher
 eluens : zie tabel 6 blz 46
 flow : zie tabel 6 en fig 13 b
 oxidans : pH variabel; flow 0,8 ml/min; 7,5 mM zuur
 zuur : 0,3 ml/min
 recorder : 5 mm/min; 10 mv
 temperatuur : 40 °C
 injectie : 10 ul (50 ng STX/ inj)

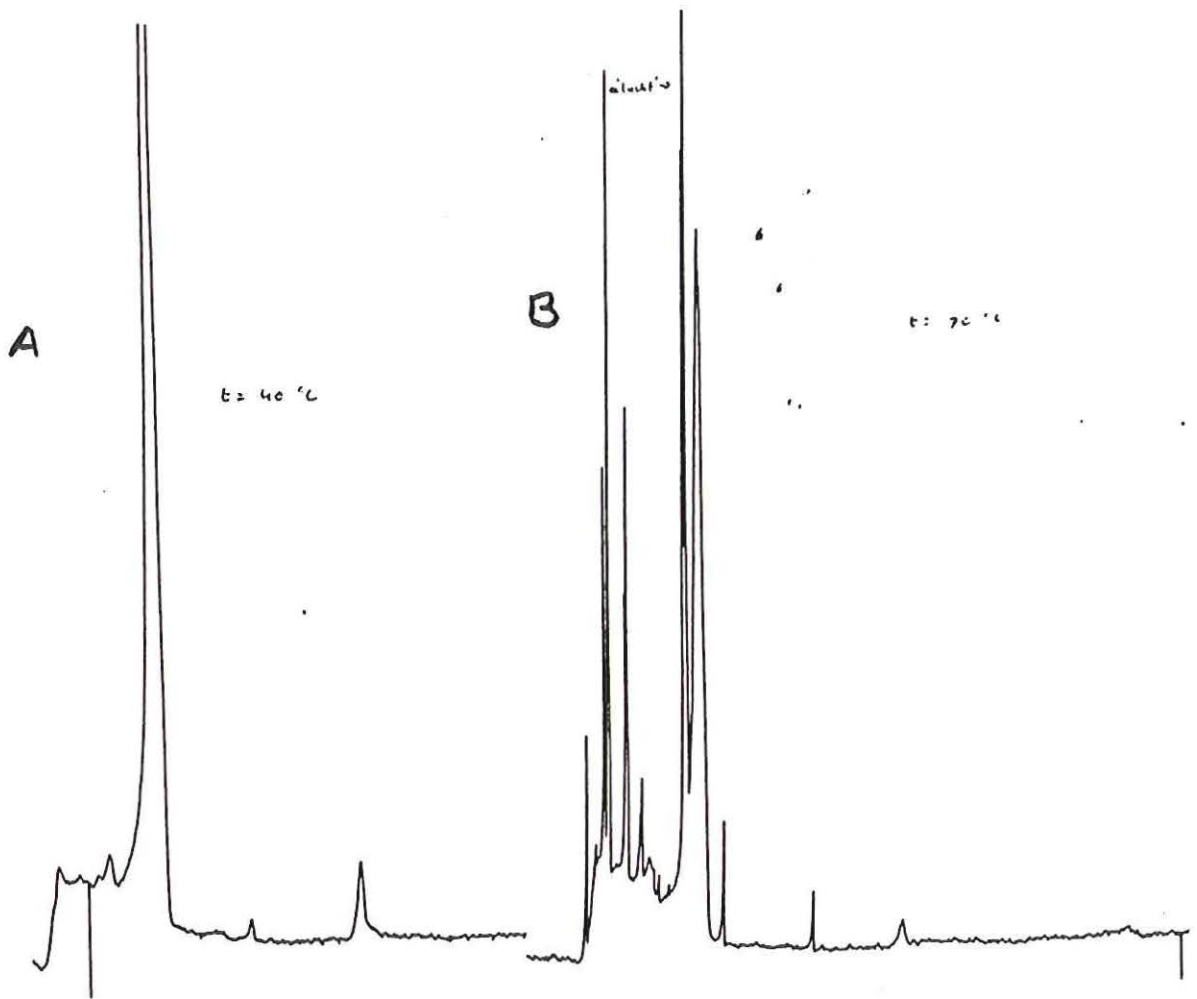
pH	sens	piek cm	piek bij sens = 2
7,8	10	2,9	0,58
8,3	10	7,9	1,58
8,8	5	10,0	4,00
9,8	2	4,4	4,40
10,3	2	12,3	12,30
10,8	1	10,7	21,40
11,8	0,5	9,5	38,00
12,8	0,5	14,1	56,40
13,8	0,5	5,8	23,20



Invloed van de badtemperatuur.

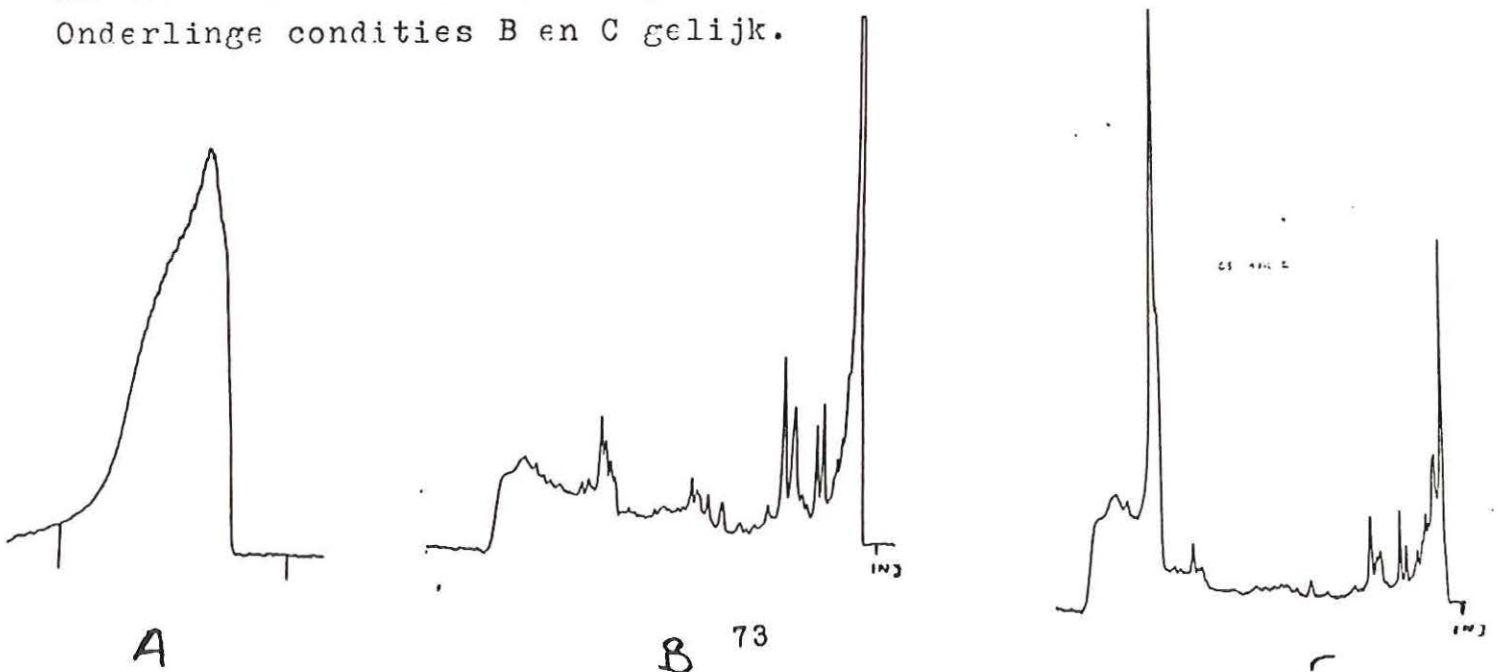
A= badtemperatuur is 40 °C, B= badtemperatuur is 70 °C.

Onderlinge condities gelijk. Injectie 50 ng STX, microspherkolom, pH (oxidant) = 12,8



Resultaten isocratisch en mosselen.

A= 100 ng STX isocratisch bij 95 % eluens B, sensitivity = 10, recorder 5 mm/min; B= blanco opgewerkte middendarmklieren; C= opgewerkte middendarmklieren met 3000 ng STX (resulterend in 5,06 ng STX/inj). Onderlinge condities B en C gelijk.



VOORSCHRIFT DSP BEPALING

MOSSELEN-BEPALING DIARRHETISCH SCHELFDIERGIF-HPLC EN
FLUORESCENTIEDETECTOR

1 DOEL EN TOEPASSINGSGBIED

Het bepalen van diarrhetisch schelpdiergif in mosselen. De detectielimiet van de bepaling is 5 ng, uitgaande van opgewerkte middendarmklieren van mosselen. De middendarmklier beslaat ongeveer 10 % van het totale gewicht van een mossel zonder schelp.

2 PRINCIPE

Uit de mosselen worden de middendarmklieren geprepareerd. Deze middendarmklieren worden gemalen en vervolgens geextraheerd met methanol/water 80/20. Na centrifugeren van dit mengsel wordt de waterfase achtereenvolgens geextraheerd met petroleum-ether en chloroform. De chloroformfractie wordt ingedampt tot 1 ml en gederivatiseerd met 9-anthryldiazomethaan (ADAM). Aan dit mengsel wordt methanol en interne standaard (dibenz(a,h)anthraceen) toegevoegd en geïnjecteerd in het HPLC-systeem met fluorescentiedetectie.

3 REAGENTIA

- 3.1 acetonitril p.a. (Merck no 3)
- 3.2 methanol p.a. (Merck no 6009)
- 3.3 dibenz(a,h)anthraceen 100 mg/l in methanol (interne standaard)
- 3.4 9-anthryldiazomethaan (ADAM), eigen synthese, minimale concentratie 7 nmol/ml in watervrije diethylether
- 3.5 chloroform p.a. (Merck no 2442)
- 3.6 petroleum-ether kp 40-60 (Merck no 1775)
- 3.7 okadainezuurstandaardoplossing 50 ng/ul
- 3.8 water (Millipore)
- 3.9 stikstofgas

4 GLASWERK / APPARATUUR

- 4.1 scalpel
- 4.2 bekersglazen 50, 100 ml
- 4.3 bovenweger
- 4.4 centrifugebuizen 50 ml
- 4.5 ultra-turrax
- 4.6 Gilson pipetten 100, 200, 1000 en 5000 ul
- 4.7 centrifuge (Heraeus)
- 4.8 scheidrechters 25 ml
- 4.9 gecalibreerde reageerbuizen 10 ml
- 4.10 WISP glaswerk (buisjes 4 ml en inserts)
- 4.11 WISP
- 4.12 HPLC-systeem bestaande uit
 - HPLC-pomp
 - kolom, twee achter elkaar geschakelde kolommen, als eerste een Spherisorb ODS-2 en als tweede een Lichro-

sorb RP-18 kolom. Beide 100 x 3 mm van Chrompack.
Tevens een RP guard kolom (Chrompack).
Fluorescentiedetector met een excitatiefilter van 365 nm en een emissiefilter van >410 nm (cut-off filter)

5 WERKWIJZE

5.1 OPWERKING MOSSELEN

Prepareer met behulp van een scalpel uit een groot aantal mosselen (ongeveer 500 gram) de middendarmklieren. Voeg de middendarmklieren samen in een centrifugebuis en meng met een ultra-turrax totdat er een homogene massa is ontstaan. Dit mengsel kan in een afgesloten plastic potje in de vriezer bewaard worden.

Weeg voor de opwerking 1 gram mosselen af in een centrifugebuis op een bovenweger. Voeg hieraan 4.5 ml methanol/water 80/20 toe en meng met de ultra-turrax gedurende een halve minuut. Breng de buis over in de centrifuge en centrifugeer 15 min bij 2500 rpm. Breng hierna 2.5 ml van het supernatant over in een scheidtrechter van 25 ml. Extraheer het supernatant 2 keer met 2.5 ml petroleum-ether 40-60 en gooi de petroleum-ether fase weg. Breng de waterfase over in een andere scheidtrechter van 25 ml en extraheer 2 keer met 4 ml chloroform. Vang de chloroformfracties op in een gecalibreerde reageerbuis van 10 ml en damp onder een stikstofstroom bij kamertemperatuur in tot 1 ml.

Deze oplossing kan gebruikt worden voor de verdere behandeling en kan in de vriezer bewaard worden.

5.2 DERIVATISERING VAN STANDAARDOPLOSSING VAN OKADAINEZUUR

De standaard okadainezuuroplanning wordt als volgt gederivatiseerd : Voeg aan de te derivatiseren hoeveelheid standaard in een WISP insertbuisje 50 ul ADAM-oplossing toe. Laat dit mengsel gedurende anderhalf uur in het donker bij kamertemperatuur staan. Voeg hierna 75 ul interne standaard toe en vul aan met methanol tot 300 ul. Deze oplossing is gereed om in de HPLC geïnjecteerd te kunnen worden.

5.3 DERIVATISERING VAN MOSSELEXTRACT

Voor het mosselextract luidt de derivatisering als volgt : Voeg aan 100 ul chloroformextract (zie 5.1) in een WISP-insertbuisje 50 ul ADAM-oplossing toe. Laat dit mengsel gedurende anderhalf uur in het donker bij kamertemperatuur staan. Voeg hierna 75 ul interne standaard toe en vul aan met methanol tot 300 ul. Deze oplossing kan in de HPLC geïnjecteerd worden.

5.4 HPLC-SYSTEEM

Elueer het bij 4.12 genoemde HPLC-systeem met acetonitril/water 75/25 met een snelheid van 0.8 ml/min.

Stel de detector in op een juiste gevoeligheid, doe hetzelfde voor de recorder. Stel de WISF in op 15 ul/inj rn een run-time van 40 min. Voer de injecties minimaal in duplo uit.

6 BEREKENING

Als berekening voor de hoeveelheid okadainezuur in een monster kan de piekhoogte van het okadainezuur gedeeld door de piekhoogte van de interne standaard genomen worden. Maak van te voren eerst een ijklijn met bekende concentraties okadainezuur.

Reken dit aan de hand van de ijklijn om naar mg/kg middendarmklier en naar mg/kg mossel door te corrigeren met het gewichtspercentage middendarmklier in mosselen.

7 OPMERKINGEN

Bij de opwerking is het het gemakkelijkste om uit te gaan van half bevroren mosselen. Bij volledig ontdooide mosselen is het prepareren moeilijker door de slappe structuur van het schelpdiervlees. Bij te hard bevroren mosselen is het vaak moeilijk om de schelp van het vlees te scheiden.

XC

VOORSCHRIFT ADAM SYNTHESE

SYNTHESE VAN 9-ANTHRYLDIAZOMETHAAN EN GEACTIVEERD MANGAANDIOXIDE

1 DOEL EN TOEPASSINGSGEBIED

9-Anthryldiazomethaan (ADAM) is een derivatiseringsreagens voor carboxylgroepen. Het wordt gebruikt bij de derivatisering van onder andere vetzuren, prostaglandines, diergeneesmiddelen en diarrhetisch schelpdiergif. De stof is niet stabiel, alleen in Japan commercieel te verkrijgen tegen een zeer hoge prijs (f 2600,= per gram) en betrekkelijk slechte zuiverheid. De synthese is eenvoudig en veel goedkoper.

Het verkregen produkt is goed toepasbaar voor bovenstaande derivatiseringen.

Het geactiveerde mangaandioxide is een reagens dat nodig is bij de synthese van het ADAM. Het commercieel verkrijgbare produkt blijkt niet goed werkzaam en eigen synthese is dan ook noodzakelijk.

2 PRINCIPE

Het principe van de synthese is een twee-staps synthese, uitgaande van 9-anthraldehyde. Deze stof wordt met behulp van hydrazine omgezet in het 9-anthraldehyde-hydraxon die in de tweede stap met geactiveerd mangaandioxide geoxideerd wordt tot het ADAM.

3 REAGENTIA

- 3.1 9-anthraldehyde (Aldrich no 27.868-8)
- 3.2 diethylether, watervrij (Merck no 929)
- 3.3 absolute ethanol (Merck no 983)
- 3.4 hydrazinehydraat (Aldrich no 22.581-9)
- 3.5 met kaliumhydroxide verzadigde ethanol. Bereiden door aan 100 ml absolute ethanol 20 gram vaste kaliumhydroxide toe te voegen en goed te schudden.
- 3.7 water (Millipore)
- 3.8 natriumsulfaat, watervrij (Merck no 6649)
- 3.9 stikstofgas
- 3.10 mangaansulfaat monohydraat (Aldrich no 22.128-7)
- 3.11 kaliumpermanganaat (Aldrich no 23.851-1)
- 3.12 natronloogoplossing 40 %, bereid uit 400 ml natriumhydroxide (Merck no 6495) en 600 ml Milliporewater.

4 GLASWERK / APPARATUUR

- 4.1 bekgelazen (diverse maten)
- 4.2 erlenmeyers (diverse maten)
- 4.3 pipetten 1, 5 en 10 ml
- 4.4 rondbodemkolf 200 ml
- 4.5 scheidtrechter 250 ml
- 4.6 aluminiumfolie
- 4.7 Buchnertrechter met diameter van 5 cm en bijbehorende rubberringen

concept

- 4.8 filterpapier met diameter van 5 cm (Whatman nrs 5 en GF/A)
- 4.9 magneetroerder en roervlooiën
- 4.10 medicijnflesjes
- 4.11 afzuiginstallatie bestaande uit vacuumpomp en afzuigglaswerk

5 WERKWIJZE

5.1 Synthese 9-anthraldehyde-hydrazon

Weeg op een bovenweger 8.8 gram 9-anthraldehyde af in een erlenmeyer van 250 ml. Voeg hieraan 150 ml absolute ethanol toe. Los de kristallen op en voeg 9 ml hydrazinehydraat toe. Roer bij kamertemperatuur met een magneetroerder gedurende 3 uur. Filtreer onder vacuum met behulp van een Buchner-trechter en een Whatman filter type 5 de vaste stof af. Herkristalliseer deze stof in warme absolute ethanol. Zuig nogmaals af en bewaar de kristallen in een afgesloten potje in de vriezer.

5.2 Synthese geactiveerd mangaandioxide

Voeg gedurende 1 uur gelijktijdig een oplossing van 111 gram mangaansulfaat-tetrahydraat in 150 ml water en 117 ml 40 % natronloogoplossing toe aan een warme (ongeveer 60 °C) geroerde oplossing van 96 gram kaliumpermanganaat in 600 ml water. Roer hierna nog een uur door en verzamel de vaste stof door vacuumfiltratie. Was het residu met Milliporewater tot het waswater kleurloos blijft. Droog de vaste stof hierna gedurende enkele uren in een oven bij 100-120 °C en maal tot een fijn poeder voor gebruik. Het poeder kan in een dinker flesje bij kamertemperatuur bewaard worden.

5.3 Synthese 9-anthryldiazomethaan

Weeg 0.22 gram 9-anthraldehyde-hydrazon af in een met aluminium bekleede erlenmeyer van 300 ml. Voeg hieraan 100 ml water vrije diethylether toe en los de kristallen op. Voeg vervolgens 0.8 gram geactiveerd mangaandioxide en 0.6 ml met kaliumhydroxide verzadigde ethanol toe. Plaats de erlenmeyer in een ijsbad op een magneetroerder en roer gedurende een half uur met de maximale snelheid. Filtreer onder vacuum het mangaandioxide af met behulp van een Buchnertrechter en een Whatman filter type GF/A en vang het filtraat op in een met aluminiumfolie beklede afzuigerlenmeyer. Was het filter met 40 ml water vrije ether en reduceer het ethervolume door verdamping onder een stikstofstroom. Bewaar de geconcentreerde rood-gele vloeistof (ADAM-oplossing) in een met aluminiumfolie bekleed flesje in de vriezer.

7 OPMERKINGEN

7.1 Stabiliteit

De ADAM-oplossing is erg gevoelig voor licht en hoge temperaturen, zorg er dus voor dat de oplossing altijd in de

concept

vriezer bewaard wordt en dat het glaswerk waarin de oplossing wordt bewaard met aluminiumfolie is bekleed.

VOORSCHRIFT SAXITOXINE BEPALING.

MOSSELEN - BEPALING SAXITOXINE, EEN VAN DE PARALYTISCHE SCHELPIEDIERGIFTEN - HPLC, POSTCOLUMN-DERIVATISERING EN FLUORESCENTIEDETECTIE

1 DOEL EN TOEPASSINGGEBIED

Het bepalen van saxitoxine, een van de toxines, die verantwoordelijk zijn voor paralytische schelpdiervergiftiging bij gebruik van mosselen. De bepalingsgrens bedraagt 0.05 mg/kg mosselen.

2 PRINCIPE

De mosselen worden ontdaan van de schelp en fijn vermalen met een gelijke hoeveelheid 0.1 N HCL, waarna een ultrafiltratie wordt uitgevoerd. Het filtraat wordt in een HPLC opstelling geanalyseerd. Na gradientelutie over een RP kolom vindt er een tweetrapsoxidatiestap plaats, waarbij de saxitoxine wordt omgezet in een fluorescerend derivaat.

3 REAGENTIA

- 3.1 Acetonitril p.a
- 3.2 Ammoniakoplossing 0.5 M,
bereid door 34 ml gec.ammoniakoplossing(28%) met water te verdunnen tot 1 liter.
- 3.3 Natronloogoplossing 5 M,
bereid door 200 gram NaOH op te lossen in 600 ml. water en met water te verdunnen tot 1 liter.
- 3.4 Hexaansulfonzuuroplossing 0.5M,
bereid door 4.7 gram hexaansulfonzuur op te lossen in water en met water te verdunnen tot 50 ml.
- 3.5 Heptaansulfonzuuroplossing 0.5M,
bereid door 5.05 gram heptaansulfonzuur op te lossen in water en met water te verdunnen tot 50 ml.
- 3.6 Fosforzuuroplossing 0.5M,
bereid door 57.6 gram geconcentreerd fosforzuur te verdunnen met water tot 1 liter.
- 3.7 Perjoodzuuroplossing 50 mM,
bereid door 11.4 gram perjoodzuur op te lossen in water en aan te vullen met water tot 1 liter.
- 3.8 Zoutzuur 0.1M,
bereid door 8.3 ml geconcentreerd zoutzuur te verdunnen met water tot 1 liter.
- 3.9 Salpeterzuuroplossing 0.75 M,
bereid door 46.7 ml geconcentreerd salpeterzuur te verdunnen met water tot 1 liter.
- 3.10 Saxitoxine, verdund met 0.1 n HCl tot oplossingen met een concentratie van resp. 1 , 0.5 en 0.25 ug/ml
- 3.11 Gedeïoniseerd water (bv Millipore systeem), te gebruiken voor het aanmaken van eluentia en reagentia.

4 APPARATUUR

- 4.1 Waterbad, gevuld met glycerine.
- 4.2 HPLC-gradientbesturingssysteem met 2 HPLC-pompen.
- 4.3 Fluorescentiedetector met dubbele monochromator.
- 4.4 Slangenpomp
- 4.5 Centrifuge
- 4.6 Ultrafiltratiebuisjes (bv. Amicon MFS-1 systeem)
- 4.7 pH-meter
- 4.8 HPLC-kolom (bv. Microspher RP-18 100*3 mm, Chrompack)
- 4.9 Filtratier- en ontluuchtingssysteem voor HPLC-eluentia (bv. Millipore AllGlass Filter Apparatus).

5 WERKWIJZE

5.1 Opwerking van de mosselen.

Verwijder de schelp van de mossel. Maal 100 gram schelpdiervlees, samen met 100 ml extractievloeistof, zo fijn mogelijk in de mixer gedurende 2 min. Centrifugeer dit mengsel gedurende 5 minuten bij 2000 rpm. 1 ml van het supernatant wordt overgebracht in een ultrafiltratiebuisje en gedurende minimaal 10 minuten gecentrifugeerd bij 2500 rpm tot voldoende filtraat verkregen is. De gefiltreerde vloeistof is nu gereed voor HPLC-analyse.

5.2 Blanco en recovery

Neem ter controle van de analysemethode een blanco chemicalien, een blanco chemicalien + toevoeging (0.5 mg/kg niveau), een blanco mossel en een blanco mossel + toevoeging (0.5 mg/kg niveau) mee. Voeg de standaard toe voor het malen bij 5.1.

5.3 HPLC-detectie.

Het gebruikte HPLC-systeem is een systeem met een gradient-elutie. De kolom wordt geelueerd volgens onderstaand schema:

tijd (min.)	A in %	B in %
0	100	0
4	100	0
11	70	30
17	10	90
17.5	0	100
18.5	0	100
19	100	0
26	100	0

Waarbij :

Mobiele fase A:

3 ml hexaan- en heptaansulfonzuuroplossing (3.4 en 3.5) en 3 ml fosforzuuroplossing (3.6) mengen met 990 ml water. Titreer tot pH=6.7 +/- 0.02 met 0.5 M ammoniumhydroxide-oplossing (3.2) en filtreer/ontlucht m.b.v. het Millipore filtersysteem (4.9; filtertype HA).

Mobiele fase B:

3 ml hexaan- en heptaansulfonzuuroplossing (3.4 en 3.5) en 12.5 ml fosforzuuroplossing (3.6) mengen met 720 ml water. Titreer tot pH=7.00 +/- 0.02 met 0.5 M ammoniumhydroxide oplossing(3.2) en filtreer/ontlucht m.b.v. het Millipore filtersysteem(4.9; filtertype HA). Voeg na het filtreren 250 ml acetonitril toe en ontlucht onder vacuüm.

Injecteer 10 µl van het bij 5.1 verkregen filtraat op de HPLC en start het gradientsysteem(zie ook 7.2). De totale flow van de mobiele fase bedraagt 1.3 ml/min. Na scheiding op de Microsferkolom vindt er een post-column oxidatie plaats. De retentietijd bedraagt ca. 18 min.

5.4 Post-column oxidatiesysteem

Na de kolom wordt de component geoxideerd, waarbij:

Oxidatiereagens:

Meng 150 ml perjoodzuuroplossing(3.7), 200 ml fosforzuuroplossing (3.6) en 600 ml water. Titreer met 5 N natronloog (3.3) tot een pH van 12.8. De flow van de oxidant bedraagt 0.8 ml/min.

Hierna moet gedurende 1 minuut de reactie plaatsvinden. Hiertoe wordt een hoeveelheid HPLC-tubing met een zodanig inwendig volume, dat de verblijftijd 1 minuut is in een waterbad van 50 C gelegd.

Hierna wordt het sterk basische mengsel aangezuurd door toevoeging aan de vloeistofstroom van 0.75M salpeterzuuroplossing(3.9) met een snelheid van 0,5 ml/min .

Deze vloeistofstroom wordt in het geheel door de fluorescentiedetector geleid.

5.5 Detectie

De detectie vindt plaats met een fluorescentiedetector met een flowcel van 12 µl. De detector wordt ingesteld op een excitatie- en emissiegolflengte van resp. 340 en 400 nm, met een spleetbreedte van maximaal 20 nm.

6 BEREKENING

Pas voor de berekening van het gehalte de volgende formule toe:

$$\frac{M}{S} \times C \times \frac{V}{I} = \text{mg Saxitoxine / kg mossel}$$

met: M = hoogte of oppervlakte verkregen bij het monster
S = hoogte of oppervlakte verkregen bij de standaardoplossing(7.2).
C = concentratie van de standaard in µg/ml
V = volume waterige fase(180 ml, uitgaande van een drogestof gehalte voor mosselen van 20%)
I = inweeg mosselvlees (100 gram)

Pas voor de berekening van de recovery de volgende formule toe:

$$\frac{G}{0.5} \times 100\% = \text{recovery Saxitoxine in \%}$$

met: G = gehalte gevonden in de blanco chemicalien met toevoeging en de blanco mossel met toevoeging op een niveau van 0.5 mg/kg.

De gevonden recovery mag variëren van 75 tot 120%. Buiten deze waarden is de bepaling niet betrouwbaar en moet ze herhaald worden.

7 OPMERKINGEN

7.1 Mobiele fases en andere reagentia.

Mobiele fase A is beperkt houdbaar en kan slechts 3 dagen gebruikt worden. Bewaar de oplossing tussentijds in de koelkast.

De oxidant moet elke werkdag opnieuw worden aangemaakt. Alle eluentia dienen tijdens de bepaling met helium gepurged te worden.

7.2 Stabiliteit van de detectie.

Om de stabiliteit van de analyse te controleren wordt om de 4 a 5 monsters een standaardoplossing geïnjecteerd. Gebruik bij de berekening de standaard, die in de buurt van het te berekenen monster geanalyseerd is.

Voor het begin van de bepaling moet het HPLC-systeem minimaal een half uur stabiliseren, gevolg door enkele injecties van standaarden tot de respons constant is.

7.3 Beeindiging analyse.

Vervang na het beeindigen van de bepaling alle reagentia door een oplossing van 30% methanol in water en spoel het systeem gedurende minimaal een uur om biologische afbraak van de kolom en uitzouting te voorkomen.

8 LITERATUUR.

- 8.1 Sullivan, J.J. and M.M. Wekell : "Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by high pressure liquid chromatography." In : Ragelis, E.F. (ed.) "Seafood toxins." ACS symposium series no 262, American Chemical Society, Washington, 1984, p. 197-205