



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Nahrungsmittelvergiftung mit marinen Toxinen

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin:	Miriam Santer
Matrikel-Nummer:	0206957
Studienrichtung:	Ernährungswissenschaften
Betreuerin:	Ao. Univ.-Prof. Dr. Rosa Lemmens-Gruber

Wien, am 17.05.2009

DANKSAGUNG

Ich möchte mich an dieser Stelle bei den Personen bedanken, die mir bei der Erarbeitung dieser Diplomarbeit geholfen und mich in dieser Zeit unterstützt haben.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Univ.-Prof. Dr. Rosa Lemmens-Gruber für die Betreuung meiner Arbeit.

Anschließend gilt mein Dank noch meiner Familie, die mir ein sorgenfreies Studieren ermöglicht hat und meine Höhen und Tiefen ertragen musste, meinem Freund, der mir bei EDV-technischen Dingen immer wieder geholfen hat und meinen Freunden, die mir tatkräftig zur Seite standen.

Inhaltsverzeichnis

I. Abbildungsverzeichnis.....	V
II. Tabellenverzeichnis.....	VII
III. Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung und Fragestellung.....	1
2. Intoxikationen durch marine Organismen.....	3
2.1. Intoxikation.....	3
2.2. Gifte von marinen Organismen.....	7
2.2.1. Muschel (Bivalvia).....	9
2.2.1.1. Aufnahme und Elimination von Toxinen.....	12
2.2.2. Dinoflagellate (Dinoflagellata)	15
2.2.3. Kugelfisch (Tetraodontidae).....	24
2.2.3.1. Herkunft und Entstehung von TTX.....	32
2.2.3.2. Fugudelikatesse.....	34
3. Paralytisch wirkende marine Toxine.....	38
3.1. Chemische Eigenschaften und Synthese.....	39
3.1.1. PSP-Toxine.....	39
3.1.2. Tetrodotoxin.....	53
3.2. Toxizität.....	65
3.3. Metabolismus, Transport und Elimination.....	68
3.4. Wirkung der PSP-Toxine.....	68
3.5. Symptome und Behandlung bei PSP-Vergiftung.....	74
3.6. Nachweis der PSP-Toxine und TTX.....	80
3.6.1. Biologische Techniken und Bioassay-Methoden.....	80
3.6.1.1. Maus-Bioassay.....	81
3.6.1.2. Andere Bioassays.....	83

3.6.1.3.	Makroskopische Methoden.....	86
3.6.2.	Immunologische Methoden.....	86
3.6.2.1.	ELISA.....	87
3.6.3.	Physikalische und Chemische Methoden.....	89
3.6.3.1.	Fluorometrische Techniken.....	89
3.6.3.2.	Chromatographische Techniken mit Detektor.....	90
3.6.3.3.	Elektrophorese Techniken.....	100
3.7.	Verwendung von TTX in der experimentellen Pharmakologie.....	102
3.8.	Risikoanalyse von PSP und TTX.....	103
4.	Zusammenfassung.....	105
5.	Summary.....	106
6.	Literaturverzeichnis.....	107
7.	Lebenslauf.....	119

I. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: *Mytilus edulis*

Abb. 2: Weg von Dinoflagellaten über Muscheln in den Menschen

Abb. 3: Weltweite Verbreitung von PSP-Toxinen

Abb. 4: Verschiedenartige Schichtung

Abb. 5: Beispiele von PSP-Produzenten

Abb. 6: *Sphoeroides maculatus*

Abb. 7: Verbreitung des Kugelfisches

Abb. 8: Vermuteter Mechanismus der TTX Entstehung im Kugelfisch

Abb. 9: Saxitoxin

Abb. 10: Struktur von Saxitoxin und Derivate

Abb. 11: Biotransformationswege von Gonyautoxinen zu STX

Abb. 12: Vorbereitung des vinylogen Carbamats

Abb. 13: Vorbereitung des Diguanidin-Stücks

Abb. 14: Abschluss der Synthese nach Kishi et al.

Abb. 15: Vorbereitung des Vorläufers der Zykladdition

Abb. 16: Vorbereitung des Pyrazolidins

Abb. 17: Abschluss der Synthese nach Jacobi et al.

Abb. 18: Die Oxathiazinan-Strategie

Abb. 19: Weiterer Syntheseweg nach Du Bois

Abb. 20: Struktur von Tetrodotoxin

Abb. 21: Tautomere von TTX

Abb. 22: Verschiedene Synthesewege vom Cyclohexan-Ring ausgehend

Abb. 23: Synthese nach Kishi et al.

Abb. 24: Synthese nach Isobe I

Abb. 25: Synthese nach Isobe II

Abb. 26: Synthese nach Isobe II

Abb. 27: Synthese nach DuBois

Abb. 28: Selektivitätsfilter eines Ionenkanals

Abb. 29: Spannungsabhängiger Ionenkanal

Abb. 30: Aufbau eines Natriumkanals

Abb. 31: Verschluss eines Ionenkanals durch TTX

Abb. 32: Veränderungen im Aktionspotential durch TTX

Abb. 33: Darstellung einer HPLC-Apparatur

Abb. 34: HPLC-Chromatogramm von TTX

Abb. 35: Positives und negatives Sekundärionen-Massenspektrometrum von TTX

Abb. 36: GC-MS von einer TTX-Fraktion aus einer *Vibrio*-Gruppe

Abb. 37: TLC einer TTX-Fraktion von *Vibrio*-Stämmen (LM-1) isoliert aus dem Darm von *F. vermicularis radiatu*

II. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Vorkommen und Wirkmechanismen einzelner Toxine

Tab. 2: Einteilung der Gifte nach ihrer letalen Dosis

Tab. 3: Länder mit toxischen Algen-Überwachungssystemen

Tab. 4: TTX-Menge in verschiedenen Organen

Tab. 5: TTX produzierende Bakterien

Tab. 6: Organtoxizität der schmackhaften Kugelfische

Tab. 7: Toxizität der Ovarien und der Leber in bestimmten Monaten

Tab. 8: Akute Toxizität von STX bei Mäusen

Tab. 9: LD50-Werte von PSP-Toxinen verschiedener Spezies

Tab. 10: LD50-Werte von TTX verschiedener Spezies

III. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
CE	capillary electrophoresis (Kapillarelektrophorese)
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EQ	Equivalent
ESI	Elektrospray-Ionisation
FAB	Fast Atom Bombardment (schneller Atombeschuss)
FAO	FOOD and AGRICULTURE ORGANIZATION
FAPAS	Food Analysis Performance Assessment Scheme
FDA	FOOD and DRUG ADMINISTRATION
FIA	flow injection analysis (Fließinjektionsanalyse)
GC	Gaschromatographie
GTX	Gonyautoxin
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
ISO	International Organization for Standardization
ITP	Isotachophorese
LC	liquid chromatography (Flüssigchromatographie)
LD	letale Dosis
LOAEL	lowest observed adverse effect level
MLD	minimal letale Dosis
MS	Massenspektrometrie
NOAEL	no observed adverse effect level
NP	Normalphasen-Chromatographie
PFP	Pufferfish poisoning (Kugelfischvergiftung)
PSP	paralytic shellfish poisoning
PST	paralytic shellfish toxins
RP	Reversed phase-Chromatographie
RIA	Radioimmunoassay
SIM	selected ion monitoring

STX	Saxitoxin
Tab	Tabelle
TDI	tolerable daily intake
TLC	thin layer chromatography; Dünnschichtchromatographie
TMS	Trimethylsilan
TTX	Tetrodotoxin
TTX-R	TTX-resistant

1 Einleitung

In vielen Regionen der Welt sind Vergiftungen mit marinen Biotoxinen oder Phykotoxinen, die durch den Verzehr dieser verursacht werden, ein bedeutendes Problem der öffentlichen Gesundheit, das einige tausend Menschen jedes Jahr betrifft.

In den letzten Jahren ist Berichten zufolge ein deutlicher Anstieg der Ausbrüche von Lebensmittelvergiftungen marinen Ursprungs zu erkennen. Ein Teil dieser Zunahme ist zweifellos auf den erhöhten Verzehr zurückzuführen, welcher von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird: zum einen von mehr Reisen in die Küstengebiete der Welt, in Regionen, in denen marine Toxizität endemisch ist und eine größere Chance für eine orale Fischvergiftungen gegeben ist, zum anderen wird durch moderne Methoden des Gefrierens und des Versands von Fisch und Meeresfrüchten der Umfang des Problems erweitert. Da sich der weltweite Vertrieb von Fischereierzeugnissen durch den steigenden Import nach Nordamerika, Europa und Russland noch weiter ausbreitet, wird die Zahl der Vergiftungsfälle mit Fisch und Meeresfrüchten auch im Landesinneren weiter ansteigen, es sei denn, Vorsichtsmaßnahmen werden getroffen [DESHPANDE, 2002]. Lebensmittelqualität und -sicherheit sind heute wichtige Anliegen der Nahrungsmittelindustrie und der Verbraucher, deswegen wurden Kontrollen der Warenlieferungen eingeführt, um sicherzustellen, dass keine schädlichen Mengen an Giften vorhanden sind [HUSS et al., 2003].

Viele an Lebensmittelvergiftungen beteiligte Toxine sind giftige Komponenten natürlichen Ursprungs, die aus einzelligen Mikroalgen und Bakterien entstehen [DESHPANDE, 2002]. Werden diese toxinbildenden Algen oder Bakterien nun von Meerestieren als Nahrung aufgenommen, könnte es zu einer Anreicherung dieser Toxine im Gewebe kommen, wodurch z. B. Muscheln oder Fische plötzlich giftig werden. Während das Tier selbst nicht von den marinen Toxinen beeinflusst wird, können beim Menschen durch den Konsum dieser nun toxischen Tiere Vergiftungen auftreten [BfR, 2008a]. Vergiftungen äußern sich in verschiedenen Erscheinungsformen und zwar als amnetische (ASP), diarrhöische (DSP), neurotoxische (NSP) oder paralytische (PSP) Schalentiervergiftungen. Weitere Vergiftungsarten sind Kugelfisch (PFP)-, Scombroid Fisch-, und Ciguatera-Vergiftungen [LIPP und ROSE, 1997].

Durch den großen Umfang der verschiedenen Vergiftungen wird in dieser Arbeit

speziell auf die paralytische Schalentiervergiftung und die Vergiftung mit Tetrodotoxin näher eingegangen. Es werden aktuelle Informationen zu giftigen Meerestieren, die als Nahrungs- oder Genussmittel dienen, zusammengefasst, ihre Vergiftungen sowie Toxine genau beschrieben. Ein kurzer Einblick über diese beiden Vergiftungen sollte nun Ihr Interesse wecken und Sie überzeugen, weiterzulesen.

Die weit verbreiteten und häufig auftretenden paralytischen Schalentiervergiftungen werden durch den Verzehr von Muscheln (Miesmuscheln, Austern), welche Saxitoxin und seine Derivate in ihrem Gewebe enthalten, verursacht [RALONDE, 1996]. Saxitoxin ist ein Neurotoxin, welches als Erstes aus der Alaska-Buttermuschel isoliert wurde und wird zu den bekanntesten und stärksten toxischen Nichtproteinsubstanzen gezählt [KISHI et al., 1977]. Eine Vergiftung mit diesem Toxin ist akut, oft tödlich, und es gibt keine wirksame Methode zur Entgiftung der Toxine oder zur Behandlung von Patienten. Eine einzige Miesmuschel kann genug Gift enthalten, um einen Menschen zu töten, aber ohne dabei merkliche Gesundheits- oder organoleptische Auswirkungen auf die Schalentiere zu haben. Das normale Aussehen und der Geschmack von giftigen Meeresfrüchten führen zu großen Schwierigkeiten bei der Kontrolle dieser Krankheiten [DESHPANDE, 2002].

Eine ähnliche Wirkungsweise wie Saxitoxin besitzt das im Kugelfisch vorkommende hochgiftige Tetrodotoxin, welches ebenso eines der potentesten Nichtproteintoxine ist [YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001]. Tetrodotoxin wurde nach seiner Ordnung Tetraodontiformes benannt und in verschiedenen Organismen und Bakterienspezies gefunden, weshalb man heutzutage der Ansicht ist, dass es einen bakteriellen Ursprung aufweist [HWANG und NOGUCHI, 2007]. Eine Vergiftung mit TTX durch den Verzehr von Kugelfisch ist eine der häufigsten Vergiftungsursachen im fernen Osten, vor allem in Japan, da dieser Fisch dort als feinste Delikatesse angesehen wird [YU und YU, 2002]. Von 1974 bis 1983 gab es 646 gemeldete Fälle von Kugelfischvergiftungen in Japan, davon 179 Todesfälle. Schätzungen zufolge sind es mehr als 200 Vergiftungen pro Jahr mit einer Mortalitätsrate von ungefähr 50% [FDA, 2007a]. In einigen Ländern gibt es staatliche Überwachungssysteme der Küstengewässer für toxische Algen und Toxine. Vorsichts- und Warnhinweise haben so das Risiko des Verbrauchs von giftigen Meeresfrüchten verringert [JOHNSON und SCHANTZ, 2002].

2 Intoxikation durch marine Organismen

2.1 Intoxikation

In den vergangenen zwei Jahrzehnten ist der Konsum von Fisch und Meeresfrüchten in vielen Ländern stark angestiegen. Im Jahr 2000 waren es noch 5,4 Kilo pro Kopf, 2005 bereits 7,7 Kilo. Bereits 2004 erreichte die weltweite Produktion von Fischen, Krebsen und Weichtieren durch die Fischerei und die Aquakultur 106 Millionen Tonnen [HERWIG, 2001].

Fisch und Meeresfrüchte sind seit jeher in vielen Teilen der Welt ein beliebter Bestandteil der Ernährung und in einigen Ländern stellen sie die wichtigste Quelle von tierischem Eiweiß dar [HUSS, 1994]. Fisch als Nahrungsmittel versorgt 2,6 Billionen Menschen mit mindestens 20% der durchschnittlichen pro Kopf-Proteinaufnahme [HERWIG, 2001]. Diese Nahrungsmittel beinhalten eine Fülle an bestimmten Nährstoffen, die zu einer gesunden und köstlichen Ernährungsweise des Menschen beitragen [SCHAPER et al., 2002; JOHNSON und SCHANTZ, 2002].

Heutzutage entscheiden sich noch mehr Menschen als gesunde Alternative zu rotem Fleisch für Fisch und Meeresfrüchte. Der niedrige Fettgehalt von vielen Fischarten (mit weißem Fischfleisch) und die Auswirkungen auf die Herz-Kreislauf-Erkrankungen durch die mehrfach ungesättigten Omega-3 Fettsäuren, welche in fettigen Fischarten vorkommen, sind sehr wichtige Aspekte für die Gesundheit des Menschen vor allem in wohlhabenden Ländern, wo die Sterblichkeit durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen hoch ist [HUSS, 1994]. Fische beinhalten neben wertvollem Eiweiß diverse Mineralstoffe wie Kalium, Zink, Fluor, Jod sowie Vitamin B12 und Vitamin D. Muscheln enthalten wie Fische viel wertvolles Eiweiß, Vitamin B12, Eisen, Zink, Kupfer, Jod sowie eine geringe Menge an gesättigten Fettsäuren [DER BROCKHAUS, 2008].

Jedoch kann der Verbrauch von Fisch und Schalentieren auch zu Krankheiten durch Infektionen oder Vergiftung führen. Einige der Krankheiten stehen speziell im Zusammenhang mit dem Verbrauch von Fisch und Schalentieren, andere sind mehr von allgemeiner Natur [HUSS, 1994].

Intoxikationen, die durch die Aufnahme von toxinkontaminierten Fischen oder Meeresfrüchten verursacht werden, sind ein Teil der menschlichen Existenz.

Intoxikationen zählen zu den nahrungsmittelbedingten Erkrankungen. Diese werden in fünf Bereiche unterteilt: Infektionen, Intoxikationen, Allergien, metabolische Funktionsstörungen und spezifische Erkrankungen. Infektionen und Intoxikationen können jeden angreifen, wohingegen Allergien, metabolische Funktionsstörungen und spezifische Erkrankungen gemeinsam als individuell unerwünschte Lebensmittelreaktionen auftreten können, weil sie nur bestimmte Individuen in der Bevölkerung befallen [TAYLOR, 2002].

Intoxikation wird definiert als „Erkrankung infolge chemischer Einwirkung von gesundheitsschädlichen Stoffen (z. B. Mykotoxinen, Giftstoffen von Bakterien)“ [DER BROCKHAUS, 2008]. Diese toxischen Stoffe können auf verschiedenen Wegen in den Körper gelangen, entweder durch die Verdauung, über die Atemwege oder über die Haut; die Symptome äußern sich vielseitig [DER BROCKHAUS, 2008].

Jährlich werden weltweit über 60 000 Fisch- und Meerestierintoxikationen und immerhin 100 Tote gemeldet. Die gesetzlichen Richtlinien zum Schutz des Konsumenten wurden von der Europäischen Kommission so geregelt, dass in der Verordnung EG Nr. 853/2004 die Höchstmengen für die einzelnen marinen Toxine definiert sind. So darf in den genießbaren Teilen keine Gesamtmenge von mehr als 800 µg/kg Algentoxin vorhanden sein [BfR, 2008b].

Die tatsächliche Häufigkeit von Krankheiten, die durch Lebensmittel hervorgerufen werden, ist nicht bekannt. Es gibt viele verschiedene Gründe dafür, warum es zu Vergiftungen kommen kann. In den meisten Ländern ist man nicht verpflichtet, die öffentlichen Gesundheitsbehörden über lebensmittelbedingte Krankheiten zu informieren. In den wenigen Ländern, die ein Reporting-System haben, gibt es eine schwere Untererfassung. Diese Art von Vergiftungen wird sicher unterschätzt, da viele Fälle der Meerestiervergiftungen mild verlaufen und nur 1% der tatsächlichen Fälle von lebensmittelbedingten Erkrankungen gemeldet werden oder überhaupt ein Diagnosefehler vorliegt [JOHNSON und SCHANTZ, 2002; HUSS et al., 2003].

Dies liegt daran, dass weder das Opfer noch der Arzt über die ursächliche Rolle der Lebensmittel genau Bescheid wissen. Außerdem sind die Lebensmittel für Analysen häufig nicht verfügbar und der tatsächliche Verursacher für die Krankheit kann nicht

gefunden werden [HUSS et al., 2003].

Zu den wichtigsten menschlichen Intoxikationen durch Fische und Meerestiere zählen neurotoxische (NSP), paralytische (PSP), amnetische (ASP) und diarrhöische (DSP) Schalentiervergiftungen, weiters Kugelfischvergiftungen, Scombroid-Fischvergiftungen und Ciguatera-Fischvergiftungen [JOHNSON und SCHANTZ, 2002].

Ein kurzer Überblick über die verschiedenen Toxine ist in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1: Vorkommen und Wirkmechanismen einzelner Toxine [SCHAPER et al., 2002; JOHNSON und SCHANTZ, 2002]

	Toxine	Vorkommen	Wirkungs- mechanismus	Symptome
ASP (amnesic shellfish poisoning)	Domoinsäure	Muscheln (Jakobsmuscheln) Krabben, Anchovis	exzitatorischer Neurotrans- mitter	Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Parästhesien, Atemnot
Ciguatera	Ciguatoxin	Innereien von verschiedenen Fischarten	Hemmung der Inaktivierung des Na ⁺ -Ein- stroms	Erbrechen, Durchfall, Bauch- schmerzen, Fieber
DSP (diarrhetic shellfish poisoning)	Okaidinsäure	Muscheln (Jakobsmuscheln)	Inhibierung von Protein- phosphatasen	Durchfall, Übelkeit, Erbrechen
NSP (neurotoxic shellfish poisoning)	Brevetoxine	Jakobsmuscheln, Austern, Venusmuscheln	Aktivierung von Na ⁺ -Kanälen	Durchfall, Übelkeit, Erbrechen, Temperatur- umkehrung,

				Parästhesien
PSP (paralytic shellfish poisoning)	Saxitoxin	Muscheln, Schnecken, Austern, verschiedene Fische (produziert von Toxinen aus Einzellern, wie Dinoflagellaten)	Verschluss der Na ⁺ -Kanäle	Lähmungs- erscheinungen, Parästhesien, bis zur tödlichen Atemlähmung
Pufferfish poisoning	Tetrodotoxin	im Kugelfisch (durch verschiedene Bakterien)	Verschluss der Na ⁺ -Kanäle	Lähmungs- erscheinungen, Schwächege- fühl, Parästhesien, Blutdruck- abfall, Zyanose
Scombroid fish poisoning	Histamin u.a. biogene Amine	in toten, faulenden Fischen durch bakterielle Aktivität (Makrelen, Thunfisch, Hering)	ähneln Histamin- reaktionen	Kopf- schmerzen, Hitzegefühl im Gesicht, Nessel- ausschlag milder Verlauf

2.2 Gifte von marinen Organismen

Auf der ganzen Welt findet man verschiedene Arten von giftigen Tieren, von denen manche zu lebensbedrohlichen Situationen führen können. Ihre Gifte verwenden sie, um sich vor Gegnern zu schützen oder um ihren Lebensraum zu verteidigen.

Prinzipiell werden Gifttiere in zwei Gruppen unterteilt:

- a) aktiv giftige Tiere
- b) passiv giftige Tiere

Aktiv giftige Tiere produzieren in bestimmten Geweben und Organen Gifte und geben sie über ein Werkzeug wie z.B. Stachel oder Zahn ab. Anders ist es bei passiv giftigen Tieren, diese besitzen keinen speziellen Giftapparat, mit dem sie das Gift übertragen können. Diese Gifte werden durch den Verzehr des toxinkontaminierten Tieres auf den Menschen übertragen.

Diese strikte Einteilung ist jedoch nicht immer einfach, da es Tiere gibt, die sowohl in die eine Kategorie passen, als auch in die andere. Ein Beispiel dafür sind Kröten, ihr Körper ist mit Giftdrüsen bedeckt und das Gift wird bei Reizung verspritzt [MEBS, 2000].

Zu den aktiv giftigen Tieren im marinen Bereich gehören z.B. Rochen, Petermännchen, Quallen oder Muränen und zu den passiv giftigen Tieren Kugelfisch und Muscheln oder die Einzeller Dinoflagellaten.

Gifte sind „dem Organismus zugeführte Naturstoffe (Giftpflanzen, -tiere), Chemikalien, Arzneistoffe etc., die in relativ kleinen Mengen – z. T. erst nach Umwandlung im Körper – Funktionsstörungen, Gesundheitsschäden oder den Tod hervorrufen (Vergiftung). Die Giftwirkung ist abhängig von Menge, Konzentration und Löslichkeit, Verabfolgung bzw. Ort der Einwirkung und deren Dauer“ [AMMON, 2004].

Schon Paracelsus erkannte, dass die Auswirkung einer Vergiftung von der Menge und Wirkungsweise abhängig ist [MARQUARDT und SCHÄFER, 2004].

„...Alle Ding sind Gift und nichts ohn Gift. Allein die dosis macht, dass ein Ding kein Gift ist...“ (Paracelsus 1538) [PARACELUSUS, 2003]

Wenn ein Tier ein giftiges Produkt in sich produziert oder speichert, muss es selbst entweder resistent gegen das Gift sein oder muss das Gift bis zu einer gewissen Konzentration ertragen, ohne selbst vergiftet zu werden. Dies gilt auch für Tiere, die sich von Giftpflanzen ernähren.

Die Tiere müssen über verschiedene Mechanismen verfügen, welche sie vor ihrem eigenen Gift schützen. Die Ionenkanäle dieser Tiere sind unempfindlich gegen ihre eigenen Toxine bis hin zu hohen Konzentrationen [MEBS, 2000].

Die Fische schützen sich vor der Vergiftung durch eine Mutation, genauer einer Einzelpunktmutation in dem Gen des Proteins, das für den Natrium-Ionen-Kanal kodiert und eine Änderung der Aminosäure-Sequenz zur Folge hat. Diese Veränderung bewirkt, dass das Gift den Kanal nicht mehr erkennt und sich daher auch nicht an diesen binden kann. Infolgedessen können Fische und Muscheln große Mengen des Giftes in ihrem Körper anhäufen. Die spontane Mutation, welche den Strukturwandel verursacht, ist für den Kugelfisch von Vorteil, da es den enthaltenen symbiotischen Bakterien erlaubt, das produzierte Toxin mit großem Vorteil zu nutzen [YU und YU, 2002; UNIVERSITY of MARYLAND, 2001].

2.2.1 Muschel (Bivalvia)



Abb. 1: *Mytilus edulis* [FAO, 2008]

Muscheln gehören zum Stamm der Weichtiere (Mollusca), genauer zur Klasse Bivalvia. Ihre Verbreitung erstreckt sich über Gewässer in der ganzen Welt, egal ob Salz-, Süß- oder Brackwasser, Muscheln können überall heimisch sein.

Ihr Gehäuse besteht aus einer zweiklappigen Schale, welche durch ein elastisches Ligament miteinander verbunden sind. Durch das Zusammenziehen des Ligaments öffnen sich die Schalen und durch die Schließmuskeln, die den Gegenpart des Ligaments bilden, kann sie wieder mit Kraftaufwand geschlossen werden.

Die Weichteile der Muschel mitsamt dem Fuß werden von einem Mantel umschlossen, der in drei Schichten eingeteilt wird. Innen die Perlmutschicht, danach die Prismenschicht und dann das Periostracum. Für die Fortbewegung und zum Graben tritt aus dem bewimperten Mantelepithel ein zungenförmiger Fuß heraus, der mehr oder weniger stark ausgeprägt sein kann. Zum Atmen benötigt die Muschel Kiemen, die sich zwischen Mantel und Fußbasis befinden. Diese Kiemen werden aber nicht nur zum Atmen verwendet, sondern auch für die Nahrungsaufnahme.

Muscheln sind Planktonfiltrierer und ernähren sich durch die Filtration des Atemwassers, mit Ausnahme der aktiven Nahrungssammler. Durch ihre bewimperten Kiemen erzeugen sie einen Wasserstrom, wodurch Wasser eingeatmet wird. Dabei wird Nahrung aufgenommen und die verdaulichen von den unverdaulichen Stoffen getrennt. Die verdaulichen Stoffe werden von den Kiemen aufgefangen und gelangen dann zur Mundöffnung, die unverdaulichen Stoffe werden gleich wieder ausgeatmet [GOSLING,

2003]. Hinsichtlich ihrer Ernährung durch Filtration sind sie besonders anfällig für die Aufnahme von im Wasser enthaltenen Schadstoffen und toxischen Planktonorganismen, ohne das sie selbst einen Schaden davontragen [MEBS, 2000].

Nach der Aufnahme der toxischen Dinoflagellaten werden diese in den Muscheln gespeichert und produzieren dort Toxine [HABERMEHL, 1994]. Da Muschelfleisch eine beliebte Delikatesse darstellt, werden die Toxine durch den Verzehr weiter auf den Menschen übertragen, wo sie zu einer sogenannten paralytischen Vergiftung führen können [MEBS, 2000; GOSLING, 2003].

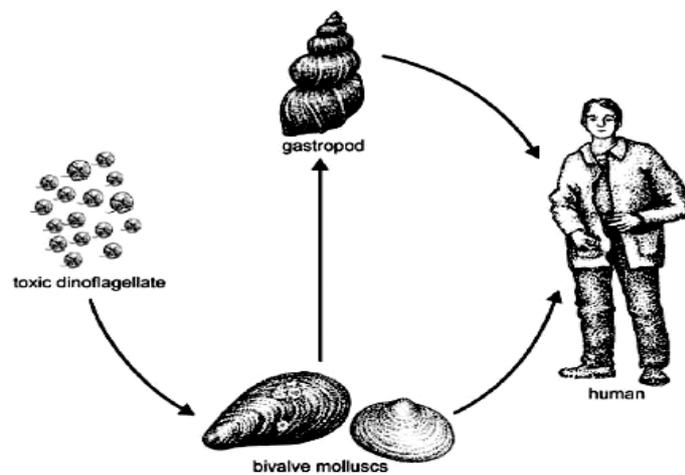


Abb. 2: Weg von Dinoflagellaten über Muscheln in den Menschen [HUSS et al., 2003]

Durch die jährliche Blüte der Dinoflagellaten werden die sonst essbaren ungiftigen Muscheln giftig, besonders bedenklich ist die Zeit von Mai bis September, wohingegen in den Wintermonate keine große Gefahr besteht. Weit verbreitet ist die Theorie, dass in den Monaten „ohne R“, sprich Mai bis September, keine Muscheln gegessen werden sollten [HABERMEHL, 1994].

Das primäre Werkzeug für die Prävention von Vergiftungen mit natürlichen Toxinen ist die Überwachung des Toxingehalts in Algen in den Erntegebieten. Basierend auf der Anwesenheit von Toxinen kann die Ernte von Muscheln verboten werden, wenn der Toxingehalt zu hoch sein sollte.

Andere Elemente eines Kontrollprogramms würden beinhalten:

- Eine Vorschrift, dass Behälter mit Schalentieren durch eine Etikette gekennzeichnet werden, welche Art und Qualität der Schalentiere, Erntemaschine, Standort der Ernte und Zeitpunkt der Ernte festlegt
- Eine Vorschrift, dass Weichtier-Erntemaschinen lizenziert werden
- Eine Vorschrift, dass Prozesse, in denen enthülste Produkte versendet werden, zertifiziert werden sollten
- Eine Vorschrift, dass Behälter mit enthülsten Schalentieren mit einem Etikett versehen werden, welches den Prozessor, den Namen, die Adresse und die Zertifizierung angibt

Reinigungsrate und Ozonisierung sind nicht wirksam und werden für die Verringerung der Toxine in Muscheln nicht verwendet [HUSS et al., 2003].

Muscheln, welche mehrfach zu Vergiftungen beim Mensch führen, sind unter anderem:

Saxidomus giganteus (Butter Clam)

Saxidomus nuttalli (Herzmuschel)

Ostrea edulis (Auster)

Mytilus edulis (Miesmuschel)

Mytilus californianus (Kalifornische Muschel) [HABERMEHL, 1994].

Leider ist es nicht möglich, durch Verfärbung oder den Geruch die Toxizität der Muschel zu erkennen [HABERMEHL, 1994]. Natürliche Toxine sind sehr hitzestabil. Normales Kochen im Haushalt wie Kochen, Dämpfen oder Braten hat keine oder nur sehr wenig Einfluss auf den Toxingehalt. Auch eine Wärmebehandlung bei 70°C, 20 Minuten lang war nicht ausreichend, um den Toxingehalt zu senken und auch nach dem Autoklavieren (120°C für 60 Minuten) blieben Toxine zurück [HUSS et al. 2003]. Die einzige Methode zur Entgiftung ist das Kochen der Muscheln mit Zusatz von einem Esslöffel Natriumbikarbonat/l Wasser. Bei dieser Zubereitungsmethode verschwindet jedoch der charakteristische Geschmack der Muschel [HABERMEHL, 1994].

Die normale industrielle Konservenherstellung kann deutlich den Toxingehalt in Muscheln senken. Die Senkung ist aber nur ausreichend, wenn der erste Toxingehalt

relativ gering ist. In der Europäischen Union ist es zulässig, Muscheln, welche den ersten Grad der Kontamination mit PSP bei einer Grenze von $80 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ gemäß der Richtlinie 91/492/EWG des Rates der Europäischen Gemeinschaft überschreiten, aber unter $300 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ bleiben, zu verwenden. Allerdings müssen die Muscheln folgenden Ablauf der Reihe nach durchlaufen [HUSS et al., 2003]:

1. Mit frischem Wasser werden die Muscheln mindestens zwei Minuten bei einer Temperatur von $20 \pm 2^\circ\text{C}$ vorgereinigt
2. Dann werden sie mit frischem Wasser mindestens drei Minuten bei einer Temperatur von $95 \pm 5^\circ\text{C}$ vorgekocht
3. Fleisch und Schalen werden abgetrennt
4. Die zweite Reinigung geschieht in rinnendem frischen Wasser für mindestens 30 Sekunden bei einer Temperatur von $20 \pm 2^\circ\text{C}$
5. Als nächstes werden die Muscheln mit frischem Wasser für mindestens neun Minuten bei einer Temperatur von $98 \pm 3^\circ\text{C}$ gekocht
6. Abgekühlt wird mit kaltem Wasser ungefähr 90 Sekunden lang
7. Mechanisch mit Wasserdruck werden die essbaren Teile (Fuß) von den nicht essbaren Teilen (Kiemen, Eingeweide und Mantel) getrennt
8. Konditionierung in luftdicht verschlossenen Behältern in einer nicht-gesäuerten Flüssigkeit
9. Sterilisation im Autoklaven bei einer Temperatur von mindestens 116°C , wobei sich die Zeit nach der Dimension der Behälter richtet, jedoch nicht weniger als 15 Minuten [HUSS et al., 2003]

2.2.1.1 Aufnahme und Elimination von Toxinen

Während des Prozesses der Filtration, d.h. der Nahrungsaufnahme, werden die Dinoflagellatzysten und Zellen in die Speiseröhre und den Magen der Muscheln transportiert. Die Verdauung findet im Magen statt, wobei PSP-Toxine freigesetzt werden und in die Verdauungsorgane eintreten. Dieses Toxin-Gemisch wird im weichen Gewebe der Schalentiere gespeichert, variiert so im Laufe der Zeit in seiner

Konzentration und ist bestimmt durch die Arten und Stämme der Dinoflagellaten und Schalentiere sowie durch andere Faktoren wie die Umweltbedingungen.

In Muscheln wurde festgestellt, dass die Eingeweide, deren Gewicht nur 30% des gesamten Gewebe-Gewichts beträgt, 96% der gesamten Toxizität ausmachen. In den Venusmuscheln wird das Toxin in den Eingeweiden rasch konzentriert und danach nimmt es allmählich ab [MONS et al., 1998].

Verschiedene Autoren haben über die Toxizität der Gewebe von Jakobsmuscheln berichtet und sind zu verschiedenen Ergebnissen gekommen:

- Der Anziehmuskel häuft keine Toxine an und es hat sich gezeigt, dass vorhandene Toxine inaktiviert werden. Eine Ausnahme waren die lila-aufklappbaren Jakobsmuscheln (*Hinnites giganteus*), wo ein Toxingehalt von 2000 µg/100 g Gewebe erreicht wurde.
- Magen-Darm-Drüse, Mantel, Gonade und Kiemengewebe speichern alle die Toxine, obwohl die Konzentration je nach Gewebe und Art variiert.
- Es gibt saisonale Schwankungen im Toxizitätslevel der verschiedenen Gewebe.

Nach der Aufnahme und der Verteilung durchleben die Toxine eine Transformation.

In Fütterungsversuchen wurden nicht toxische Buttermuscheln mit *A. catenella*, welche GNTX 1-4 und neoSTX, aber kein STX beinhalten, gefüttert. Nach einem Zeitraum von 83 Tagen wurde auch STX in den Muscheln festgestellt, was die Autoren zu dem Schluss brachte, dass irgendeine Art von Synthese oder Biotransformation von GNTX 1-4 und / oder neoSTX zu STX *in vivo* erfolgt. [MONS et al., 1998].

Abhängig von ihrer Entgiftungskinetik werden Muscheln in zwei große Gruppen geteilt, in Muscheln mit langsamer Entgiftung (z. B. *Saxidomus giganteus*) und in Muscheln mit schnell bis mäßiger Entgiftung (z. B. *Mytilus edulis*). Während einer Vergiftung erreichen die Eingeweide in der Regel eine Toxizität, die zwei bis fünf Mal höher ist als die des gesamten Gewebes, wobei das Gewebe am Bewegungsapparat (Fuß- und Musculus adductor) am wenigsten toxisch ist. Allerdings entgiften die Eingeweide schneller als andere Gewebe, was zu einem stetigen Rückgang in ihrem Beitrag zur

gesamten Toxin-Belastung während der Entgiftung führt. Einige Venusmuscheln wie die nördliche Quahog-Muschel (*Mercenaria mercenaria*) können die Aufnahme von toxischen Dinoflagellaten vermeiden, indem sie ihren Siphon zurückziehen und ihre Ventile in Anwesenheit von *Alexandrium sp.* schließen [EISING, 2005; VAN EGMOND et al., 2004].

Blanco et al. [1997] studierte die Entgiftungskinetik anhand der Muschel *Mytilus galloprovincialis*, welche zuvor einer Blüte der PSP-produzierenden Dinoflagellaten *G. catenatum* ausgesetzt wurde. Das Toxin-Profil in den Muscheln war sehr ähnlich dem von *G. catenatum*, was zeigte, dass Biotransformation in diesem Fall wenig oder gar keine Bedeutung hatte [BLANCO et al., 1997].

Das Entgiften der Muscheln findet in zwei Phasen statt:

1. Eine schnelle Entgiftung, welche während der frühen Entgiftungsperiode stattfand (nur eine kleine Menge des Toxins, bezogen auf den ursprünglichen Betrag, bleibt in der Muschel nach den ersten paar Tagen der Entgiftung).
2. Eine langsame Entgiftung vom Ende der ersten Phase bis zum Ende der Entgiftung. Umweltbedingungen (Salzgehalt, Temperatur und Licht-Übertragung) und Körpergewicht bestimmen die Entgiftung vor allem während der ersten schnellen Phase [VAN EGMOND et al., 2004].

Obwohl die meisten Filtrierer relativ unempfindlich gegen STX sind, gibt es Unterschiede darin, wie die verschiedenen Muschelarten auf STX reagieren. Miesmuscheln beispielsweise scheinen in der Regel viel höhere Levels von PSP-Toxinen zu akkumulieren als Austern unter ähnlichen Umständen. Anschließende Fütterungsstudien im Labor zeigten, dass Miesmuscheln gleiche oder größere Konzentrationen von *Alexandrium* leichter verbrauchen als Austern.

Elektrophysiologische Untersuchungen an isolierten Nerven von Muscheln der Atlantikküsten zeigten, dass die Nerven von Austern empfindlich auf die Giftstoffe reagierten, während jene von den Miesmuscheln relativ unempfindlich waren. [MONS et al., 1998].

Die chinesische Jakobsmuschel, *Chlamys farreri*, hat beispielsweise eine hohe Fähigkeit zur Anhäufung von PSP-Toxinen. Nach der 48 stündigen Aufnahme von toxischem *A. minutum* wurde 5000 µg STX eq/100g in den Eingeweiden dieser Jakobsmuscheln gefunden und die Rate der Entgiftung war langsam. Der gesamte Toxingehalt umfasst 97 Prozent des Toxingehalts der Eingeweide. Das Verhältnis der verschiedenen PSP-Toxine hat sich während des Versuchszeitraums verändert, zum Beispiel war das Verhältnis von GNTX1 und GNTX4 zum Gesamtoxin insgesamt zurückgegangen, während das Verhältnis von GNTX2 und GNTX3 sich erhöhte [VAN EGMOND et al., 2004].

2.2.2 Dinoflagellate (Dinoflagellata)

Dinoflagellaten (*Dinophyta*) gehören zu den Protozoa und sind einzellige Meeresalgen, welche photoautotroph leben. Sie sind frei schwimmende Organismen, die sich propellerartig bewegen und von zwei Geißeln angetrieben werden. Sie besitzen einen großen Zellkern mit kondensierten Chromosomen, Chloroplasten, Mitochondrien und Golgi-Körpern [FAUST und GULLEDGE, 2002].

Dinoflagellaten haben ein großes Verbreitungsgebiet und können sich an eine Vielzahl von Lebensräumen anpassen bzw. in verschiedenen Lebensräumen überleben.

Die meisten der schädlichen Arten haben nur ein beschränktes Verbreitungsgebiet, aber es gibt einige schädliche Arten, welche weltweit aufzufinden sind.

Ihre weltweiten Lebensräume ziehen sich von Plankton oder Sediment, Sand, Korallen, gemäßigten bis tropischen Meeren und von Flussmündungen bis zum Süßwasser [VAN EGMOND et al., 2004]. Dadurch, dass sich Dinoflagellaten überall anpassen können, sind sie weit verbreitet und können überall zu PSP führen, wie man auf der Abb. 3 erkennen kann.

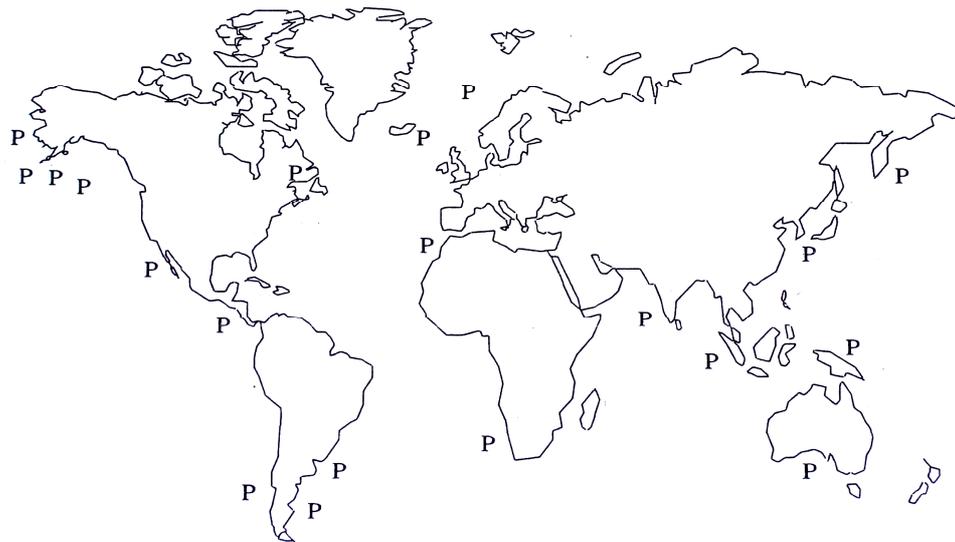


Abb. 3: Weltweite Verbreitung von PSP-Toxinen [DOUGLAS et al., 2001]

Algen und Dinoflagellaten sind dafür bekannt, dass sie marine Toxine produzieren, welche natürlich auftretende Erscheinungen sind und deshalb nicht durch Abwasserverunreinigungen entstehen [DOHLE et al., 1996].

Marine Toxine sind „Giftstoffe von im Meer lebenden, räuberischen Tieren“ [GOSLING, 2003] und werden von Algen oder Bakterien produziert.

Von den mehr als 5 000 bekannten Spezies von Phytoplankton sind 60-80 bekannt, welche schädliche Toxine produzieren. Weniger als 25 toxische Spezies wurden in der letzten Dekade erkannt [JOHNSON und SCHANTZ, 2002].

Unter diesen 5 000 bestehenden marinen Algen-Arten können etwa 300 manchmal in sehr hohen Zahlen auftreten (Blüte), sodass sie die Oberfläche des Meeres verfärben, dies wird "rote Gezeiten bzw. rote Flut" genannt [VAN EGMOND et al., 2004].

Der Name dieses Naturphänomens rührt von der kilometerweiten Verfärbung der Meeresoberfläche in gelb, braun bis rot. Verantwortlich dafür sind die in Dinoflagellaten enthaltenen Chlorophyll a und c₂, β -Carotin und Xanthophylle, welchen sie eine gelbbraune bis braunrote Färbung zu verdanken haben [DOHLE et al., 1996; FAUST und GULLEDGE, 2002].

Wichtig ist noch zu erwähnen, dass nicht jeder "roten Flut" zwangsweise eine seuchenartige Muschelvergiftung folgt, da selbst, wenn das Wasser nicht verfärbt ist,

eine Vergiftung auftreten kann. Anders kann die Farbe des Wassers auch durch eine harmlose, nicht toxische Algenblüte verändert werden [RAVEN et al.2006]. Toxische Dinoflagellat-Blüten färben die Wasseroberfläche nur rot, wenn alle klimatischen Bedingungen stimmen. Von den zahlreichen Mikroplanktonarten, die „rote Tiden“ zu bilden vermögen, enthalten nur wenige für den Menschen gefährliche Gifte [VAN EGMOND et al., 2004].

Die Voraussetzungen für eine Algenblüte sind noch nicht vollständig aufgeklärt, aber das Phänomen wird wahrscheinlich durch klimatische und hydrographische Umstände verursacht. Das explosive Wachstum erscheint manchmal während Wetterveränderungen, doch wichtige mitwirkende Ursachen können Schwankungen im Auftrieb von z. B. Nährstoffen, Temperatur, Turbulenzen oder Salzgehalt des Wassers, die Konzentration von gelösten Nährstoffen, Wind oder Oberflächenbelichtung sein [VAN EGMOND et al., 2004; GLIBERT et al., 1988].

Schalentier-Intoxikationen können nicht vorhergesagt werden. Im Allgemeinen treten rote Fluten häufig dann auf, wenn erwärmtes Wasser oder Süßwasser eine Oberflächenschicht über einer Schicht kaltem, nährstoffreichem Wasser schafft. Schnell wachsende Algen zerlegen auf schnelle Weise Nährstoffe in der oberen Schicht und lassen Stickstoff und Phosphor nur unter der Grenzfläche der Schichten zurück, genannt Pyknokline (Übergang zwischen Wasserschichten unterschiedlicher Dichte [SOMMER, 1998]). Nicht freibewegliche Algen können nicht einfach zu dieser Schicht gelangen, wo bewegliche Algen wie Dinoflagellaten gedeihen können. Viele schwimmen mit einer Geschwindigkeit von mehr als 10 Metern am Tag und einige durchleben täglich eine vertikale Migration. Sie wohnen im warmen, helleren Oberflächengewässer und schwimmen in der Nacht hin zum Pyknokline, um Nährstoffe aufzunehmen. Dies hat zur Folge, dass Blüten plötzlich in Oberflächengewässern erscheinen können, die frei von Nährstoffen sind [VAN EGMOND et al., 2004].

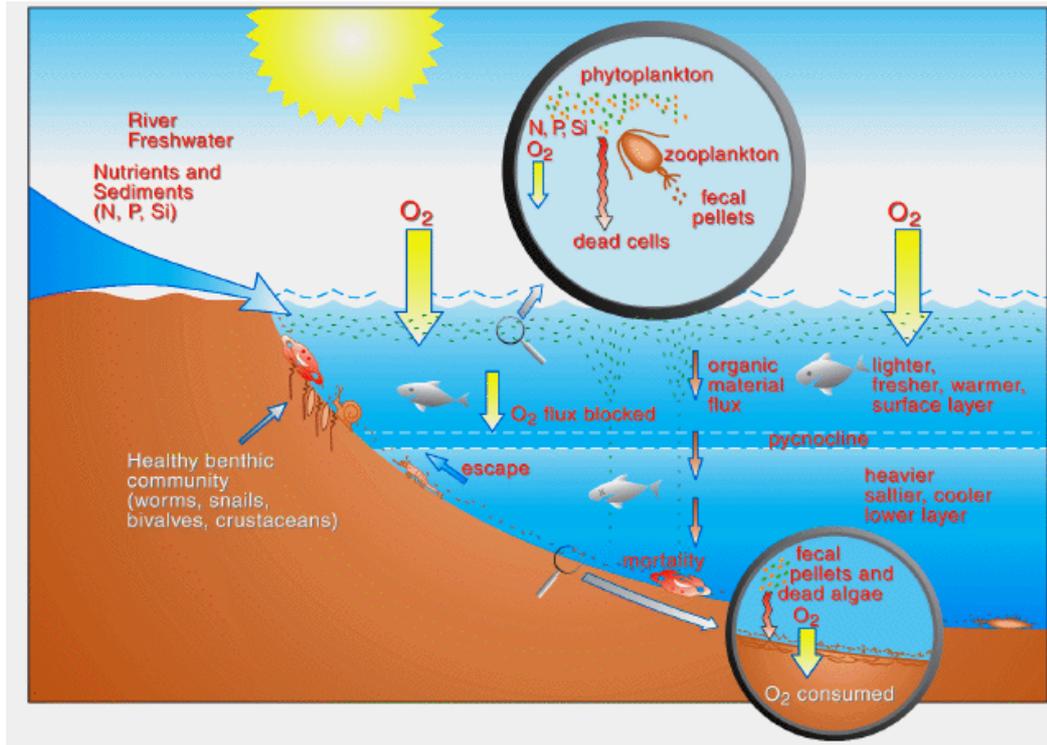


Abb. 4: Verschiedenartige Schichtung [JOYCE, 2000]

Um das Überleben bestimmter Dinoflagellaten von einer Saison auf die andere Saison gewährleisten zu können, produzieren einige Arten Ruhezysten, welche im Sediment für einen längeren Zeitraum überdauern können und dann zu initiierten Blüten keimen [FAUST und GULLEDGE, 2002]. Die Ruhe-Zyste oder Hypnozygote ist die unbewegliche Form einiger Dinoflagellaten. Diese Zysten sinken zum Meeresgrund und reichern sich an der Grenze von Wasser und Sediment an, wo sie überwintern. Bei günstigen Wachstumsbedingungen kehren sie zurück, die Zysten keimen wieder aus und impfen das Wasser mit neuen schwimmenden Zellen, die später blühen [MONS et al., 1998].

Einige Arten produzieren im Grunde harmlose Wasserverfärbungen. Auf der anderen Seite können einige Arten so dicht und unter außergewöhnlichen Bedingungen in geschützten Buchten blühen, dass sie durch ihren Sauerstoffverbrauch wahllos Fische und wirbellose Tiere töten. Andere Algen-Arten können schädlich auf Fische und wirbellose Tiere wirken, indem sie ihre Kiemen beschädigen oder verstopfen. Darüber hinaus gibt es Mikroalgen-Arten, welche die Eigenschaft zur Herstellung potenter

Toxine (so genannte Phykotoxine) besitzen. Einige Algenarten produzieren bereits in niedriger Zahl von einigen hundert Zellen je Liter Toxine, während andere Algen-Arten in einer Zahl von einigen Millionen Zellen pro Liter auftreten müssen, um einen Schaden zu verursachen. Die toxischen Algen finden ihren Weg durch die Nahrungskette (z. B. Muscheln, Krebstiere und Fische) und werden letztlich vom Menschen verzehrt, wo sie eine Vielzahl von Magen-Darm- und neurologischen Erkrankungen verursachen [VAN EGMOND et al., 2004].

Die Dinoflagellaten werden so allgemein als die Quelle der PSPs in gemäßigten Gewässern anerkannt und wurden ursprünglich der Gattung *Gonyaulax* zugeordnet, innerhalb derer sie unterschiedliche Untergruppen bilden. Diese wurden zusammen als *Tamarensis*-Komplex bezeichnet. Anschließend wurden sie als eine neue Gattung, *Protogonyaulax*, abgetrennt. Obwohl mehrere Forscher *Gonyaulax* als Name der Gattung verwendet haben, ist der richtige Name für diese Gattung nach der biologischen Nomenklatur *Alexandrium*. Trotz der Fülle von Gattungsnamen scheint die Gruppe selbst relativ gut definiert zu sein. Die meisten der Organismen haben eine ähnliche Morphologie.

Viele der Arten wurden durch einen geschichtlichen Zufall bekannt. Die taxonomischen und biogeographischen Aspekte von PSP-produzierenden Dinoflagellaten werden kurz im folgenden Abschnitt diskutiert [DESHPANDE, 2002].

Protogonyaulax Spezies

Die Mitglieder der Dinoflagellat-Gattung, *Protogonyaulax*, produzieren Toxine, die für das weltweite Vorkommen von PSP bei Menschen und Meerestieren verantwortlich sind. Durch die Blüten der *Protogonyaulax* müssen die jährlichen Ernten von Schalentieren eingestellt werden, was schwere wirtschaftliche Folgen für die regionale Schalentier-Branche entlang der östlichen und westlichen Küste der Vereinigten Staaten hat. Die beiden Algenarten, welche für viele dieser Blüten verantwortlich sind, sind *Protogonyaulax tamarensis* und *Protogonyaulax catenella*. *Protogonyaulax* produzieren eine Reihe von chemisch ähnlichen Neurotoxinen, die sich in ihrer biologischen

Toxizität unterscheiden. Diese Reihe enthält die C1, C2, C3 und C4-Toxine, die B1 und B2 Toxine, GTX I, II, III und IV, NeoSTX und STX. NeoSTX und STX haben die stärkste toxische Wirkung auf den Menschen [BOCZAR et al., 1988].

Zusätzlich gibt es noch fünf weitere Arten, welche bisher noch keine Toxine produzieren. Alle diese Arten waren früher unter der Gattung *Gonyaulax* eingeordnet, doch unterscheiden sie sich in mehrfacher Hinsicht, z. B. durch ihr Plattenmuster oder den Zystentyp. Die morphologische Unterscheidung zwischen den Arten von *Protogonyaulax* ist recht schwierig, da sie alle die gleichen grundlegenden Plattenmuster aufweisen, doch kann man sie aufgrund ihres Verbreitungsgebiets unterscheiden.

P. catenella tritt an der Westküste Nordamerikas von Südkalifornien bis zum Südosten Alaskas auf und ihr bevorzugtes Gebiet befindet sich am San Francisco Bay.

P. catenella wurde nicht immer im gesamten Atlantischen Ozean erfasst, hatte aber vier PSP-Ausbrüche vor der Westküste von Südafrika zur Folge. Die einzige Region, in der *P. catenella* erfasst wurde, ist die Ostküste Japans. Algenblüten treten generell dort auf, wo die Temperaturen ungefähr bei 20°C liegen und dann tritt der Ausbruch in Mündungen und offenen Küsten auf.

Im Gegensatz dazu verbreitet sich der *P. tamarensis* Morphotyp über ein viel größeres Gebiet, einschließlich der arktischen und tropischen Orte, wobei mit Letzterem der westliche tropische Atlantik gemeint ist. Im Nordatlantik werden sie in Mündungen oder in seichten Gebieten von der Long Insel bis zur Arktis gefunden und sind besonders häufig im Golf von Maine, in der Fundybucht und dem Golf von St. Lawrence im Westen, weiters vom nördlichen Portugal bis nach Norwegen und in der Arktis in der Nähe von Spitzbergen verbreitet. Im Süd-Atlantik sind sie von der zentralen Küste Argentinens bis nach Südwesten Afrikas verbreitet und im Pazifischen Ozean von Britisch-Kolumbien bis zu einigen Küstenregionen am Golf von Alaska und Buchten im Nordosten Japans [DESHPANDE, 2002].

Gonyaulax Spezies

Obwohl mehrere Arten von *Gonyaulax* (andere als *Protogonyaulax* und *Gessnerium* spp.) die „rote Flut“ produziert haben, stehen nur *G. grindleyi* (= *Protoceratium reticulatum*) und *G. polyedra* noch weiter in Verdacht, PSPs zu produzieren. Der Erste wurde im Zusammenhang mit PSP mehrfach mit dem Tod von Muscheln vor der Westküste von Süd-Afrika in Verbindung gebracht, obwohl kein wasserlösliches Toxin aus ihnen extrahiert werden konnte [DESHPANDE, 2002].

Gessnerium und Alexandrium Spezies

Mehrere Forscher umfassten im Rahmen dieser Nomenklatur alle diese Arten als *Protogonyaulax*. Die Arten, welche möglicherweise nach *Gessnerium* im engeren Sinne benannt werden, sind *GS. monilatum*, *GS. balechii* und *A. minutum*. Alle drei führen zur roten Verfärbung der Meeresoberfläche, aber nur *GS. monilatum* produziert Toxine, die für Fische, Weichtiere und Krebstiere tödlich sind [DESHPANDE, 2002].

Pyrodinium Spezies

Pyrodinium compressa ist die einzige bekannte Art, welche Toxine produziert und zur PSP-Verbreitung im Indo-West Pazifik führte. Diese Art zeigte sich in verschiedenen warmen Regionen mit hohem Salzgehalt, wie dem Rote Meer und dem Persischen Golf, wurde aber im Atlantischen Ozean nicht beobachtet. Im Gegensatz dazu verbreitet sich *P. compressa bahamense* fast ausschließlich im tropischen Atlantik von den Bahamas bis nach Venezuela sowie sporadisch an der Westküste von Zentral-Amerika. Obwohl *P. compressa bahamense* nicht dafür bekannt ist Toxine zu produzieren, gibt es Aufzeichnungen über PSP an verschiedenen Orten und es ist durchaus möglich, dass einige Stämme toxisch sind [DESHPANDE, 2002].

Peridinium Spezies

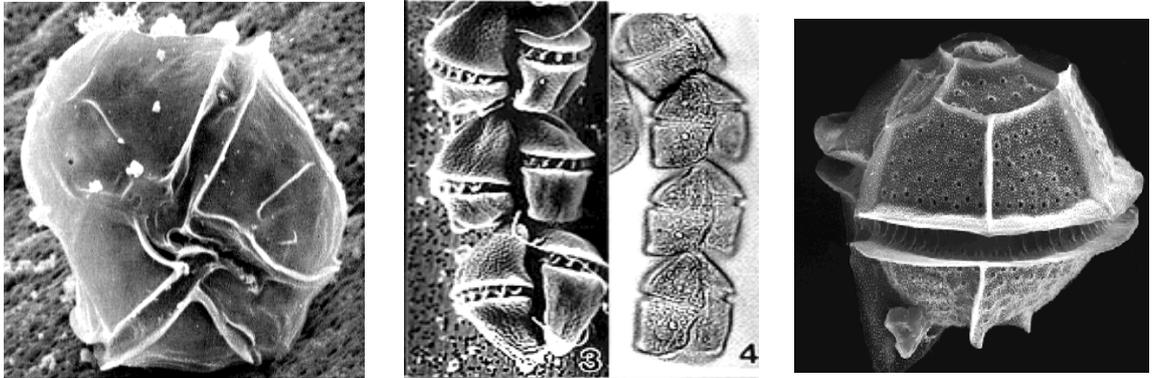
Der einzige bekannte giftige Dinoflagellat des Süßwassers ist *Peridinium polonicum*, welcher in Seen mit gemäßigter Temperatur verbreitet ist. Aufgrund der direkten Beziehung zwischen dem Auftreten von roten Gezeiten und den Neuerkrankungen an PSP haben mehrere Nationen ein Überwachungsprogramm für schädliche Algen. Von selbst sorgt die Phytoplankton-Überwachung nicht für einen ausreichenden Schutz der öffentlichen Gesundheit. Sie wird jedoch oft als Frühwarnsystem eingesetzt, um intensive Toxizitätstests anhand von Schalentiergeweben durchzuführen.

Beispiele für Länder, die potenziell giftige Arten überwachen und die Konzentrationen dieser eruieren, sind in Tab. 3 angeführt [DESHPANDE, 2002].

Tab.3: Länder mit toxischen PSP-Algen-Überwachungssystemen [DESHPANDE, 2002]

Land	Überwachte Algenspezies
Australien	<i>Alexandrium catenella</i> <i>Gymnodinium catenatum</i>
Kanada, Norwegen	<i>Alexandrium spp.</i>
Dänemark	<i>Alexandrium spp.</i>
Niederlande	<i>Alexandrium spp</i>
Philippinen	<i>Pyrodinium bahamense var. compressum</i>
Spanien: Valencia Balearische Inseln (Mallorca, Menorca, Ibiza) Andalusien	<i>Alexandrium catenella</i> <i>Alexandrium minutum</i> <i>Alexandrium spp.</i> <i>Gymnodinium catenatum</i>

In der Abb. 5 sind ein paar gesundheitsgefährdende Toxin-produzierende Dinoflagellaten dargestellt, welche sehr wirksame PSP-Toxine produzieren.



Alexandrium tamarenis

Gymnodinium catenatum

Pyrodinium bahamense

[FAUST und GULLEDGE, 2002; FAO, 2005]

Abb. 5: Beispiele von PSP-Produzenten

2.2.3 Kugelfisch (Tetraodontidae)



Abb. 6: *Sphaeroides maculatus* [FDA, 2002a]

Der Kugelfisch gehört zur Klasse: Osteichthyes (Knochenfische),

Ordnung: Tetraodontiformes (Haftkiefer / Kugelfischartige),

Familie: Tetraodontidae (Rundkopfkugelfisch, Vierzähler),

Gattung: Tetraodon,

Art: Tetraodon spec. ,

und es gibt weltweit mehr als 120 Arten davon. Die meisten giftigen Kugelfische sind in dieser Familie anzufinden, aber nicht alle Fische in dieser Familie produzieren das Gift [DESHPANDE, 2002].

Einige bekannte Arten sind *Arothron nigropunctatus*, *Fugu niphobles*, *F. oblongus*, *F. pardalis*, *F. poecilonotus*, *F. rubripes rubripes*, *F. vermicularis*, *Sphaeroides annulat*, *S. maculatus*, *S. nephelus* [DESHPANDE, 2002].

Tetraodontidae besitzen eine recht unscheinbare Zeichnung und ihre Größe beträgt etwa 10-90 cm. Durch ihre extrem elastische und schuppenlose Haut können sie sich bei Gefahr mit Wasser oder Luft aufblasen, wodurch sie relativ träge bzw. bewegungslos werden. Beim Aufblasen beginnt sich der Magen zu dehnen und die Wirbelsäule zu biegen, damit die Organe wie Leber, Darm und andere innere Organe, welche verdrängt werden, zwischen dem Fisch-Rückgrat und dem Magen Platz haben. Magentaschen werden nach oben rund um die Wirbelsäule geschoben, so dass die Fische eine fast kugelige Form annehmen [SUMMERS, 2001].

Der Beißapparat des Kugelfisches besteht aus Zähnen, die zu Zahnleisten verwachsen sind, oben und unten befinden sich je zwei Zahnreihen. Durch die Verschmelzung

dieser Zähne nimmt das Maul eine spitz zulaufende Form an. Bei den Kugelfischen befinden sich die Kiemen vor den Brustflossen, doch Kiemendeckel und Bauchflossen fehlen vollständig [MEBS, 2000; LACHMANN und GREMBLEWSKI-STRATE, 1995].

Zur Fortbewegung benutzen sie die After-, Rücken- und Brustflossen, diese machen kreisende Bewegungen. Mit ihrem plumpen Körper sind sie keine Ausdauerschwimmer, doch können sie durch extreme Geschicklichkeit im Riff beeindrucken, sie können sogar rückwärts schwimmen [PLAUT und CHEN, 2003].

Die Familie der Tetraodontidae ist in den Korallenriffen der tropischen und subtropischen Meere angesiedelt, außerdem können sie auch im Süßwasser und im Brackwasser leben (Abb. 7). Ihre Nahrung besteht hauptsächlich aus Schalentieren wie Krebsen, Schnecken, Muscheln und Bakterien [MEBS, 2000a; LACHMANN und GREMBLEWSKI-STRATE, 1995].

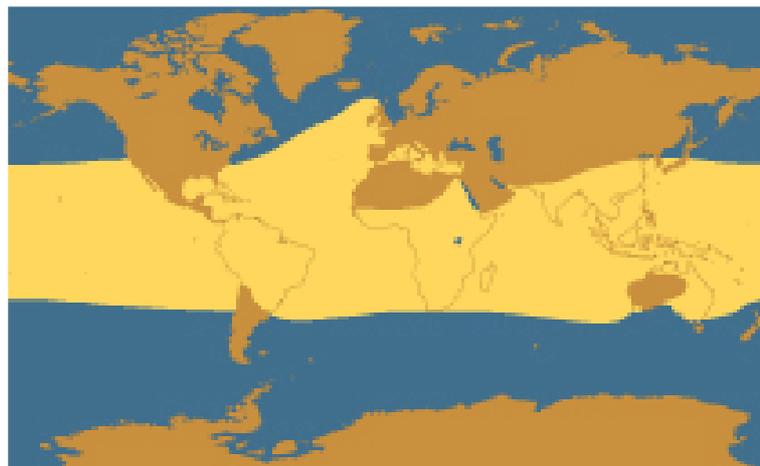


Abb. 7: ■ Verbreitung des Kugelfisches [NATIONAL GEOGRAPHIC, 2008]

Das im Kugelfisch vorhandene Tetrodotoxin ist ein starkes Neurotoxin und ist als verursachendes Agens von Vergiftungen bekannt [LEE et al., 2000]. Die Toxizität ist saisonal wie geografisch hohen Schwankungen unterworfen, sogar innerhalb der gleichen Arten gibt es extreme Toxizitätsunterschiede. Auch die Gewebe- und Organart und der Fortpflanzungszyklus spielen eine wesentliche Rolle [BENZER, 2007].

Das hochgiftige TTX ist in bestimmten Organen des Fisches enthalten, deswegen zählt der Kugelfisch zu den ichthyosarkotischen Fischen [HALSTEAD, 2001].

Diese Fische enthalten TTX in den Eierstöcken, der Leber, im Darm, in der Haut und

im Laich. Die stärkste toxische Wirkung haben die Eierstöcke und die Leber, der Darm ist nur bei einigen Arten (z. B. *F. niphobles*) relativ giftig. Die Haut kann bei mehreren Arten mäßig giftig sein und die Muskeln und Hoden sind in der Regel unbedenklich, mit Ausnahme der sehr giftigen Arten, in denen diese Gewebe schwach oder mäßig toxisch sind [DESHPANDE, 2002]. Beim weiblichen Kugelfisch sind die Eierstöcke der wichtigste Ort der Toxin-Konzentration. Weibliche Fische enthalten mehr vom Toxin als die männlichen, da die Eierstöcke in der Regel viel giftiger sind als die Hoden [DESHPANDE, 2002; LEE et al., 2000]. Die Toxinhöhe im Weibchen scheint im Zusammenhang mit der Laichzeit zu stehen [DESHPANDE, 2002].

In den Ovarien des Kugelfisches sammelt sich das TTX an, welches vermutlich vom Weibchen übermittelt wird, da das Toxin in der Regel etwa eine Woche nach der Befruchtung aus den Larven verschwindet. In freier Wildbahn tritt das Toxin in der Regel nach zwei Wochen wieder in den Larven auf, wahrscheinlich durch die Einnahme giftiger Organismen. In der Tat konnte festgestellt werden, dass Kugelfischlarven, in denen während der ersten Woche nach der Befruchtung TTX nachgewiesen werden konnte, nicht giftig sind, wenn sie während dieser Zeit kultiviert und mit einer TTX-Diät gefüttert werden [YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001].

Demnach entsteht der Toxizitätsmechanismus des Fisches durch die Nahrungskette, wenn Darmbakterien von einigen Fischarten geringfügige Mengen des Toxins produzieren [YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001]. Nicht jede Spezies der Kugelfische ist toxisch, manche sind nur schwach oder mäßig toxisch [LEE et al., 2000].

Die Menge von TTX in den verschiedenen Organen der am häufigsten konsumierten Kugelfische (*F. vermicularis*, *F. rubripes* und *F. poecilonotus*) wurde durch die Kapillar-Isotachophorese ermittelt und ist in der Tab. 4 genau ersichtlich [DESHPANDE, 2002].

Tab. 4: TTX-Menge in verschiedenen Organen [DESHPANDE, 2002]

Organ	Menge in mg/g
Ovarien	0,146 – 0,404
Leber	0,0018 – 0,113
Haut	0 – 0,301

TTX beschränkt sich nicht nur auf Kugelfische, sondern ist auch unter anderen Arten von Tieren weit verbreitet, wie im kalifornischen Molch *Tarichi torosa* und anderen Molcharten, dem Grundel *Gobius Criniger*, der Krabbe *Atergatis floridus*, dem blau geringelten Oktopus *Octopus maculosus*, in Bakterien, usw. [LEE et al., 2000].

Molch

Das erste Mal wurde über das Auftreten von TTX in anderen Tierarten als dem Kugelfisch berichtet, als das Gift in den Eiern eines Molches gefunden wurde. Später wurde festgestellt, dass TTX auch in mehreren Arten von Molchen, wie z. B. *Cynops pyrrhogaster*, *Cynops ensicauda* und *Tylototiton andersoni* vorhanden ist. *C. ensicauda* aus Okinawa und *C. pyrrhogaster* aus Japan wurden mit besonderem Schwerpunkt auf ihr Toxin-Profil beschrieben. TTX und seine Analoga 4-*epi*TTX, 6-*epi*TTX, 4,9-anhydro-6-*epi*TTX, 11-*deoxy*TTX, 11-*desoxy*-4-*epi*TTX und 4,9-anhydroTTX wurden in *C. ensicauda* erfasst. *C. pyrrhogaster*-Toxin besteht aus TTX und 6-*epi*TTX, welche die wichtigsten Komponenten darstellen und 4-*epi*TTX, 4,9-anhydro-6-*epi*TTX und 4,9-anhydroTTX als kleinere Komponenten. Eine andere Molchart und zwar *T. andersoni* wurde als ungiftig beschrieben. Insgesamt wurden 382 Exemplare des japanischen *C. pyrrhogaster* aus dem Westen Japans eingesammelt und auf ihre Toxizität und ihr Toxin-Profil getestet. Die Meisten von ihnen zeigten Toxizitäts-Werte zwischen 5 und 370 MU/g. Haut und Muskeln zeigten höhere Toxizitätsergebnisse (56 MU/g) als Leber, Magen, Darm und Gonade, deren Werte im Bereich von weniger als 2 bis 33 MU/g lagen. Die Toxizität wird im Hinblick auf die Jahreszeit wenig beeinflusst, doch gibt es große geschlechtsspezifische und regionale Unterschiede [HWANG und NOGUCHI, 2007].

Grundel

Grundel-Toxin wurde im kristallinen Zustand aus der Meergrundel *Yongeichthys criniger*, welche die Amami-Oshima-Insel und die Ryukyu Inseln bewohnt, isoliert und mithilfe von IR, H-NMR- und Elementaranalyse als TTX identifiziert. Auf diesen Inseln hielt sich schon lange das Gerücht, dass Landwirte die trockenen Meergrundeln als Nagetier-Killer auf den Feldern einsetzten. In der anschließenden Untersuchung wurde festgestellt, dass die Meergrundel giftig ist. Die TTX-Konzentration ist in der Haut (mit Flossen), gefolgt von den Eingeweiden und dem Muskel, relativ hoch. Bei einigen giftigen Exemplaren liegt die höchste Toxizität in den reifen Hoden vor [HWANG und NOGUCHI, 2007].

Xanthid-Krabben

Das Auftreten von TTX in Xanthid Krabben, wie z. B. *Atergatis floridus* und anderen Verwandten, erweitert die Vielfalt der TTX-tragenden Tieren. Die Toxinzusammensetzung der Xanthid Krabbe *A. floridus* differiert stark je nach Lebensraum. Noguchi et al. entdeckte 1983 erstmals TTX als die größte Komponente (90%) in *A. floridus*, welche auf der Miura-Halbinsel in der Nähe von Tokio gesammelt wurde. Im Jahr 1986 gab es wieder Berichte über TTX als die wichtigste Komponente in *A. floridus* von Ishigaki Island in Okinawa, aus Oita und der Kumamoto-Präfektur mit relativ geringen Toxizitätslevel (38-80 MU/g).

In Taiwan betrug die Gesamttoxizität der Xanthid Krabbe *A. floridus*, 85% TTX und 15% GTX1-4 [HWANG und NOGUCHI, 2007].

Blaugeringelte Krake

Die blaugeringelte Krake *Hapalochlaena (Octopus) maculosus* (Familie: Octopodidae) wurde bisher als die einzige tödliche und TTX-tragende Krake identifiziert. Sie bewohnt die flachen Korallen und felsige Gebiete in den Gewässern um Japan, Taiwan,

den Philippinen und Australien. Diese Spezies produziert das Gift in den Speicheldrüsen und im Eierstock, welches für die Jagd und die Verteidigung genutzt wird. Viele Forschungen haben versucht aufzuklären, warum der verursachende Wirkstoff der menschlichen Todesfälle auf den Biss dieser Spezies zurückzuführen ist. Zwar wurde zunächst behauptet, dass es das neue Toxin Maculotoxin sei, aber schlussendlich wurde es als TTX identifiziert. Ein Biss der Krake kann die Muskulatur viel schneller lähmen als der Verzehr eines giftigen Teils des Fugus. Ein erwachsener Mensch ist innerhalb von 20 Minuten nach dem Biss tot, wenn er nicht sofort ordnungsgemäß behandelt wird [HWANG und NOGUCHI, 2007].

Bakterien

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden mehrere Berichte veröffentlicht, die zeigen, dass viele Bakterien TTX enthalten. Im Jahr 1986, wurde zum ersten Mal von Noguchi et al. das Auftreten von TTX und anhydroTTX in *Vibrio* sp. aus dem Darm der Xanthid-Krabbe *A. floridus* demonstriert. In ihrem Versuch wurden vier Stämme von *Vibrio* sp. aus dem Inhalt des Darms von *A. floridus* isoliert und in einem Kolben mit 500 ml Wasser, 5 g jedes Phyton-Peptons und NaCl (pH 7,2) vermischt und bei 25°C für 10 Tage inkubiert. Die geernteten Zellen eines Stammes zeigten eine beträchtliche Menge des Toxins (30 MU/Kolben). Die Anwesenheit von TTX und anhydroTTX im Zellextrakt wurde mittels HPLC bestätigt.

Im Jahr 1987 wurde *Vibrio alginolyticus* aus dem Seestern *A. polyacanthus* und dem Kugelfisch *T. snyderi* isoliert, diese enthielten TTX. In einer der Studien von Noguchi et al. (1987) gehörten 26 von 33 Stämmen aerober und fakultativ anaerober Bakterien, die aus dem Kugelfisch isoliert wurden, zur Gattungen *Vibrio*. Durch die instrumentelle Analytik wurde TTX in allen Stämmen von *V. alginolyticus* erfasst.

Es wurden auch Versuche gemacht, bei denen TTX-tragende Bakterien von der im Bereich der Philippinen vorkommenden blaugeringelten Krake *O. maculosus* isoliert wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass 16 der 22 isolierten Stämme TTX und/oder verwandte Stoffe produzierten. Sechs der 16 Stämme wurden in die Gattungen *Vibrio*, *Pseudomonas* und jeweils zwei in *Alteromonas* und *Bacillus* eingeordnet.

Die oben genannten Ergebnisse weisen darauf hin, dass marine Bakterien aus der Gattung *Vibrio*, insbesondere *V. alginolyticus*, häufiger und reichlicher in giftigen Meerestieren vorhanden sind und eher in der Lage sind, TTX-und/oder damit verbundene Derivate zu produzieren als andere [HWANG und NOGUCHI, 2007; SIMIDU et al. 1987].

Die nachstehende Tab. 5 gibt eine genaue Übersicht über Bakterien, die TTX produzieren.

Tab. 5: TTX produzierende Bakterien [TEUSCHER und LINDEQUIST, 1994]

Art der Bakterien	Isoliert aus	
	TIER	ORGAN
<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Atergatis floridus</i> (Krabbe)	Darm
<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Fugu vermicularis</i> (Pufferfisch)	Darm
<i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Vibrio damsela</i> <i>Vibrio spec.</i> <i>Staphylococcus spec.</i>	<i>Astopecten polyacanthus</i> (Seestern)	Eingeweide
<i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Vibrio spec.</i> <i>Alteromonas spec.</i>	<i>Carcinoscorpius rotundicauda</i> (Krabbe)	Eingeweide
<i>Pseudomonas spec.</i>	<i>Fugu poecilonotus</i> (Pufferfisch)	Haut
<i>Alteromonas spec.</i> <i>Pseudomonas spec.</i> <i>Vibrio spec.</i> <i>Bacillus spec.</i>	<i>Octopus maculosus</i> (Kopffüßer)	Gewebe

Die TTX-tragenden Organismen, welche oben genannt und beschrieben wurden, haben eine sehr hohe Widerstandsfähigkeit gegen TTX im Vergleich zu den Nicht-TTX-tragenden Organismen wie Fische und Mäuse. Ein TTX-tragender Organismus sollte eine hohe Widerstandsfähigkeit gegen TTX bei TTX-Intoxikation aufweisen. Wenn

Kugelfische in einem Netz kultiviert werden und dort von der Befruchtung an heranwachsen, sind sie nie mit TTX vergiftet worden. Jedoch können solche ungiftigen Kugelfische, die noch eine hohe Widerstandsfähigkeit gegen TTX haben, vergiftet werden, wenn sie mit TTX-haltigen Lebensmitteln gefüttert werden. Auf der anderen Seite häufte ein nicht-TTX-tragender Fisch, der keine hohe TTX Widerstandsfähigkeit hat, auch wenn er für eine lange Zeit mit weniger als MLD_{50} der TTX-haltigen Lebensmitteln weiter gefüttert wurde, nie TTX in der Leber an.

Der Grund für die hohe Widerstandsfähigkeit gegen TTX ist eine Menge von speziellen TTX-resistenten (TTX-R) Natrium-Kanälen, welche sich von denen der Nicht-TTX-R Organismen unterscheiden. Es wurde behauptet, dass zwei verschiedene Arten von Natrium-Kanälen gefunden wurden. Ein TTX-resistenter Natrium-Kanal ist sicherlich 3300-mal TTX resistenter als ein TTX-empfindlicher Natriumkanal. TTX-R-Natrium-Kanäle sind nicht nur im Kugelfische zu finden, sondern auch in nicht-TTX-tragenden Organismen. Der Kugelfisch besitzt aber keine höhere Zahl an Na-Kanäle, was seine hohe TTX Widerstandsfähigkeit erklären könnte. TTX-tragende Tiere scheinen deshalb mit einem artspezifischen Mechanismus der Maskierung und/oder der Anpassung von TTX ausgestattet zu sein. Wahrscheinlich sind funktionelle Gruppen in die Toxizität der TTX-Struktur involviert und diese binden einige Stoffe mit höherem Molekulargewicht, was reversibel ist. Auf Anregung hin wird TTX alleine ausgeschieden und/oder in Verbindung mit einer TTX-bindenden Substanz und diese Substanz spielt eine Rolle bei der Abwehr und/oder dem Angriff. Ein solcher TTX-bindender Stoff mit hohem Molekulargewicht scheint so zu funktionieren: Die Strandkrabbe, *Hemigrapsus sanguineus*, ist sehr resistent gegen TTX. Zur Aufklärung des Mechanismus des TTX-Widerstandes wurde seine Körperflüssigkeit geprüft, die eine neutralisierende Wirkung gegen TTX hatte. Als die Körperflüssigkeit zusammen mit TTX in Mäuse injiziert wurde, reduzierte sich die tödliche Wirkung sehr stark. Allerdings wirkte die Körperflüssigkeit nicht gegen die tödliche Wirkung der PSPs. Die Körperflüssigkeit enthält TTX-bindende Stoffe mit hohem Molekulargewicht ($>2.000.000$), die für die neutralisierende Aktivität gegen TTX verantwortlich waren [HWANG und NOGUCHI, 2007].

2.2.3.1 Herkunft und Entstehung von TTX

Seit TTX-haltige Tiere eine völlig unverwandte Stammesgeschichte aufweisen, ist es möglich, dass das TTX, welches in den Tieren gefunden wurde, eher einen exogenen Ursprung aus der Nahrungskette hat als vom Tier selbst synthetisiert zu werden, also einen endogenen Ursprung zu haben. [YAN et al., 2005].

Matsui et al. war der Erste, der experimentelle Hinweise auf den exogenen Ursprung von TTX im Kugelfisch vorlegen konnte. Er wies nach, dass gezüchteter Kugelfisch kein TTX besitzt und dadurch nicht fähig ist, dieses Toxin zu produzieren.

Diese exogene Ursprungstheorie wurde weiter von folgenden Erkenntnissen bestätigt:

- 1) Viele marine Bakterien produzieren TTX
- 2) TTX wurde im Seestern festgestellt und in anderen marinen Tieren, welche zur Nahrung des Kugelfisches gehören [YASUMOTO et al., 1986].

D.h. TTX und seine Derivate werden von verschiedenen Bakterienarten produziert, wobei TTX-haltige Tiere das Toxin durch die Nahrungskette absorbieren und akkumulieren [MATSUMURA, 1995a].

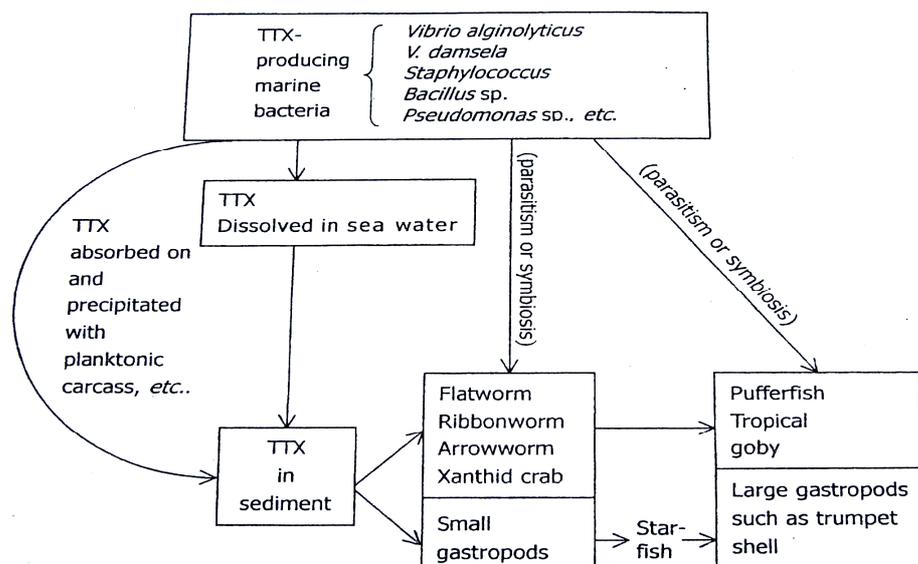


Abb. 8: Vermuteter Mechanismus der TTX Entstehung im Kugelfisch [YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001d]

Die bakterielle Produktion von TTX wurde zum ersten Mal von Yasumoto et al. berichtet, welche TTX in einer Kulturbrühe von *Pseudomonas sp.* mit 3% NaCl und 1% Polypepton durch HPLC und GC-MS nachwiesen [YASUMOTO et al., 1986].

Im April 2000 berichten veröffentlichte Daten von Lee et al., dass *Vibrio* Stämme, welche aus den Eingeweiden des Kugelfisches isoliert wurden, TTX und seine Derivate produzieren. Die Methoden der Ermittlung waren Dünnschichtchromatographie, Elektrophorese, HPLC und GC-MS, zusammen mit Mausbioassay für die Toxizität. Noguchi et al. [1982/1986] haben mit HPLC und GC-MS ebenfalls TTX in *Vibrio sp.* Zellen festgestellt, welche aus der Krabbe *Atergatis floridus* und dem Seestern *Astropecten polyacanthus* isoliert wurden [LEE et al., 2000].

Durch weiteres Suchen nach dem wahren Ursprung stieß man auf eine vorhandene Studie, welche allerdings einen endogenen Ursprung von TTX zeigte.

Matsumura entnahm vom *Fugu niphobles* ovulierte Eizellen, welche er künstlich befruchtete und kultivierte. Das Ergebnis war, dass der TTX-Level mit der Entwicklung im Embryo anstieg, d.h. TTX wird während der Entwicklung im Embryo produziert.

Diese Studie zeigte, dass der Kugelfisch die Fähigkeit besitzt TTX zu produzieren und dass im gezüchteten Kugelfisch ebenfalls das Toxin nachweisbar ist [MATSUMURA, 1998a].

Das Ziel einer weiteren Studie von Matsumura war es nachzuprüfen, ob Bakterien die Fähigkeit haben TTX zu produzieren, da die HPLC und GC-MS Analyse hohe TTX Peaks bei Polypepton und Hefeextrakt als Mediummaterial erfassen, aber diese chromatographische Analyse ist mangelhaft für TTX.

Zur Überprüfung wurden Bakterien vom Darmgehalt des *Fugu niphobles* isoliert und identifiziert. Die Resultate waren: TTX beider Stämme von *Vibrio alginolyticus* (Stamm 33 und 87) wurden mit HPLC und GC-MS erfasst, allerdings waren diese Proben beim Mausbioassay unerwartet negativ [MATSUMURA, 1995b]. Demnach sollten die Ergebnisse von Lee et al. falsch-positiv sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die bakterielle Produktion von TTX noch immer eine gültige Behauptung ist und die exogene Produktion sollte als eine Theorie betrachtet werden, die auf dieser Produktion von TTX basiert.

In einer Studie wurde festgestellt, dass nur ein paar *Virbio sp.* Stämme TTX produzieren

und das die Isolation und Charakterisierung von Bakterienstämmen möglicherweise ein wichtiger Punkt ist. Es ist daher davon auszugehen, dass Matsumuras Stämme keine TTX produzierenden Stämme waren, obwohl er *Vibrio* sp. kultivierte [YASUMOTO et al., 1986].

Es ist noch ein langer Weg zurückzulegen, um ein besseres Verständnis für den Mechanismus der bakteriellen Herstellung, der Gewinnung und im Hinblick auf eine bessere Ausbeute von TTX zu erreichen [YAN et al. 2005].

2.2.3.2 Fugudelikatesse

Der in Japan beliebte Kugelfisch „Fugu“ (auf japanisch 河豚) zählt zu einer der teuersten Delikatessen weltweit, da er zu einer erwünschten leichten Vergiftung führt [MEBS, 2000; Roth, 2007]. Durch das prickelnde, brennende, anschließend taube Gefühl im Mundbereich erlangt der Gast einen Nervenkitzel, den er besonders schätzt. Dieses sehr teure Gourmeterlebnis kann durch einen Fehler bei der Zubereitung das letzte gewesen sein [MEBS, 2000].

In größeren Städten, in denen der Kugelfisch als Lebensmittel auf dem Markt verkauft wird, gibt es genaue Vorlagen für den Verkauf, die eingehalten werden müssen, diese werden auch streng überwacht. Beim Kauf eines giftigen Fisches werden die toxischen inneren Organe noch auf dem Markt entnommen und der Konsument bekommt nur die genießbaren nicht toxischen, ordentlich mit Wasser gereinigten Fleischstücke [TSUDA, 1966]. In Restaurants darf nur ein speziell trainierter Koch, der von der Regierung geprüft wurde, den Kugelfisch zerlegen und seine giftigen Teile, also Innereien und Haut, entfernen, danach kann das Muskelfleisch herausgelöst werden. Dieses rohe Fleisch wird dann in hauchdünne Scheiben geschnitten und roh oder gekocht zum Verzehr angerichtet [MEBS, 2000]. Auch wenn das Kugelfischfleisch von Experten zubereitet wird, ist das Risiko von schweren Vergiftungen nicht beseitigt, es wird lediglich so gering wie möglich gehalten [DESHPANDE, 2002].

Die qualitativ hochwertigsten und teuersten Fische haben eine Größe von ca. 25 – 30 cm, man findet sie am häufigsten in den Monaten von Oktober bis Februar. Andere qualitativ nicht so hochwertige günstigere Fische werden auch als rohes Fleisch

(Sashimi) verzehrt, für Mitbringsel getrocknet oder zu Wurst weiter verwertet. In den Sommermonaten, in denen die Fische günstiger sind, werden aus ihrer ledrigen Haut die typischen asiatischen Lampenschirme hergestellt [TSUDA, 1966].

Durch die strengen Kontrollen auf den Fischmärkten ist die Anzahl der Vergiftungen zwar immer mehr gesunken, doch dadurch, dass man den Kugelfisch nicht nur dort erwerben sondern ihn auch direkt an der Küste fischen kann, kommt es leider immer wieder zu Vergiftungsfällen [TSUDA, 1966].

Für die Zubereitung dieser kulinarischen Delikatesse werden hauptsächlich die geschmackvollsten Kugelfischarten wie *Fugu rubripes rubripes*, *Fugu vermicularis vermicularis*, *Fugu vermicularis porphyreus* und *Fugu paradalis* verwendet, die leider auch zu den giftigen zählen, ein Sonderfall ist der ungiftige *Lagocephalus lunaris*. Ein ausgezeichneter Kugelfisch ist der *Fugu rubripes rubripes*, auch Torafugu genannt. Die japanische Übersetzung für „Tora“ ist Tiger, so heißt er wegen seiner tigerartigen Hautmusterung. Die Produktion des traditionellen "Fugu-kimo" ist eine Spezialität in den jeweiligen Puffer-Restaurants. Obwohl die Leber eine besondere Köstlichkeit des Kugelfisches darstellt, ist sie, wie in der Tab. 6 zu sehen ist, nach den Ovarien das giftigste Organ des gesamten Fisches und führt so durch Leichtsinn häufig zu Vergiftungen [TSUDA, 1966].

Tab. 6: Organtoxizität (im Winter) der schmackhaften Kugelfische [TSUDA, 1966]

Kugelfischarten	Ovarien	Leber	Haut	Darm	Fleisch	Blut	Testikel
Fugu rubripes rubripes	++	++	++	+	-	-	-
Fugu vermicularis vermicularis	+++	+++	++	++	+	-	-
Fugu vermicularis porphyreus	+++	+++	++	++	-	-	-
Fugu paradalis	+++	+++	++	++	-	-	+
Lagocephalus lunaris	-	-	-	-	-	-	-

- +++ = 10 g und < Organextrakt → stark giftig
- ++ = 10 g Organextrakt → etwas giftig
- + = 10 – 100 g Organextrakt → etwas giftig
- = 100 – 1000 g Organextrakt → nicht giftig

Die Leber wird vom Körper des wild lebenden Kugelfisches abgetrennt und durch wiederholtes Pressen mit beiden Händen durch Ausquetschen vom TTX befreit. Danach wird die Leber mit viel rinnendem Wasser über Nacht gewaschen und in verdünnter Kochsalzlösung gekocht. Das Resultat ist ein Gericht aus Kugelfischleber, serviert mit speziellem Essig. Allerdings bleibt generell ein wenig TTX in der vorbereiteten Leber, dies ist aber kein Problem und führt zu keiner Lebensmittelvergiftung. Jede TTX-Beseitigungsmethode ist abhängig vom jeweiligen Kugelfischladen, diese Methode ist geheim und wird niemals verraten [HWANG und NUGOCHI, 2007].

In Japan wird der Kugelfisch in erster Linie zwischen Oktober und März gegessen.

Der Grund dafür ist, dass sich durch die Veränderungen der Jahreszeit auch die Giftigkeit im Fisch verändert, d.h. der Toxingehalt ist von der vorherrschenden Jahreszeit abhängig. Wie man in der nachstehenden Tab. 7 erkennen kann, sind Kugelfische im Winter, in den kälteren Monaten, am giftigsten und im Sommer am wenigsten giftig. Die Tabelle gibt genau die Anzahl der Fische an, welche in den Ovarien oder in der Leber, in bestimmten Monaten nicht bis stark giftig waren. Daraus ergab sich, dass im November von insgesamt zehn untersuchten Fischen keiner in den Ovarien oder in der Leber Toxine enthielten, wohingegen im Jänner acht von insgesamt 15 Ovarien in den untersuchten Fischen stark giftig waren und drei von insgesamt 15 eine giftige Leber hatten. Wird es im Mai dann wieder wärmer, nimmt die Giftigkeit der Fische auch wieder ab [TSUDA, 1966].

Tab. 7: Toxizität der Ovarien und der Leber in bestimmten Monaten [TSUDA, 1966]

Monat	Organe	nicht giftig	etwas giftig	stark giftig	stark giftig/ Summe
November	Ovarium	9	1	0	0/10
	Leber	9	0	0	0/10
Dezember	Ovarium	3	5	3	3/11
	Leber	8	3	0	0/11
Jänner	Ovarium	1	6	8	8/15
	Leber	7	5	3	3/15
Februar	Ovarium	1	8	3	3/12
	Leber	5	6	1	1/12
März	Ovarium	5	6	3	3/14
	Leber	7	5	1	1/13
April	Ovarium	1	5	5	5/11
	Leber	5	5	1	1/11
Juni	Ovarium	4	2	1	1/7
	Leber	7	3	0	0/10

Nachdem sie im Mai abgelaicht haben, beginnt das Fleisch seinen guten Geschmack zu verlieren, was eine Wertminderung zur Folge hat. Deswegen ist dieses besonders schmackhafte Fleisch eher in den kalten Jahreszeiten eine Delikatesse, in den Sommermonaten wird der Fisch selten verzehrt [TSUDA, 1966].

Um Vergiftungen durch die Einnahme giftiger Teile zu verhindern und die große Nachfrage des Konsumenten zu erfüllen, ist in letzter Zeit die Ernte von wildem Kugelfisch rückläufig und die kultivierte Aufzucht von Kugelfisch floriert in vielen Gegenden Japans. Es bleibt nur zu hoffen, dass diese Kugelfischaufzuchten in den Netzen wirklich ungiftig sind, damit in naher Zukunft den Feinschmeckern ungiftige Leber ohne Risiken serviert werden kann [HWANG und NUGOCHI, 2007a].

3 Paralytisch wirkende marine Toxine

Paralytische Meerestiervergiftungen sind seit dem 17. Jahrhundert in Europa und Amerika bekannt [LACHMANN und GREMBLEWSKI-STRATE, 1995].

PSP wurde 1793 das erste Mal gemeldet, nachdem fünf Mitglieder der Besatzung von „Captain George Vancouver's ship“ nach dem Verzehr von toxinkontaminierten Muscheln krank wurden und einer davon starb [JOHNSON und SCHANTZ, 2002].

Das bekannteste PSP-Toxin ist Saxitoxin (STX), welches erstmals aus der „Buttermuschel“ (*Saxidomonus giganteus*) Alaskas isoliert wurde. Insgesamt gibt es neben Saxitoxin 21 verschiedene PSP-Toxine, unter anderem noch Gonyautoxin [DOUGLAS et al., 2001].

Zudem wird durch die ähnliche Wirkungsweise und den Mechanismus Tetrodotoxin auch zu den paralytisch wirkenden Toxinen gezählt. Das hochgiftige Toxin des Kugelfisches ist schon seit Jahrhunderten bekannt und es wurde bereits in den alten chinesischen Medizinbüchern über die Auswirkung nach dem Verzehr geschrieben, woraus sich unter anderem auch ableiten lässt, dass dieser Fisch bereits im alten China eine Delikatesse war. Durch Funde wie Skelettrückstände des Kugelfisches in Grabstätten wurde darauf geschlossen, dass der Fisch ungefähr seit der Yamato-Zeit (300 - 710 n. Chr.) in Japan verzehrt wird. Trotz dieser sehr frühen Erkenntnisse fand man in der japanischen Literatur erst in der Edo-Zeit (1603 bis 1868) Erklärungen über Vergiftungen nach dem Verzehr eines Kugelfisches [TSUDA, 1966; HWANG und NUGOCHI, 2007]. Erst im Jahr 1884 wurde der erste Artikel über die pharmakologische Analyse der Giftzusammensetzung des Kugelfisches publiziert. Im Jahr 1950 wurde das Toxin zum ersten Mal kristallin isoliert und die Struktur von TTX konnte dann restlos aufgeklärt werden. Trotz der früh beginnenden Geschichte dieses Toxins wurde seine Wirkungsweise erst später entdeckt [TSUDA, 1966].

In diesem Kapitel wird neben STX und GTX auch TTX als PSP-Toxin beschrieben.

3.1 Chemische Eigenschaften und Synthese

3.1.1 PSP-Toxine

Saxitoxin ist ein neurotoxisches, niedermolekulares, stickstoffhaltiges Alkaloid mit Tetrahydropurin (Summenformel: $C_{10}H_{17}N_7O_4 \cdot 2HCl$) als Grundmolekül und einem Molekulargewicht von 299,3 g/mol. Aus ihm entstehen durch die Kombination mit Radikalen weitere PSP-Toxine und zwar Gonyautoxin und Derivate [DOUGLAS et al., 2001].

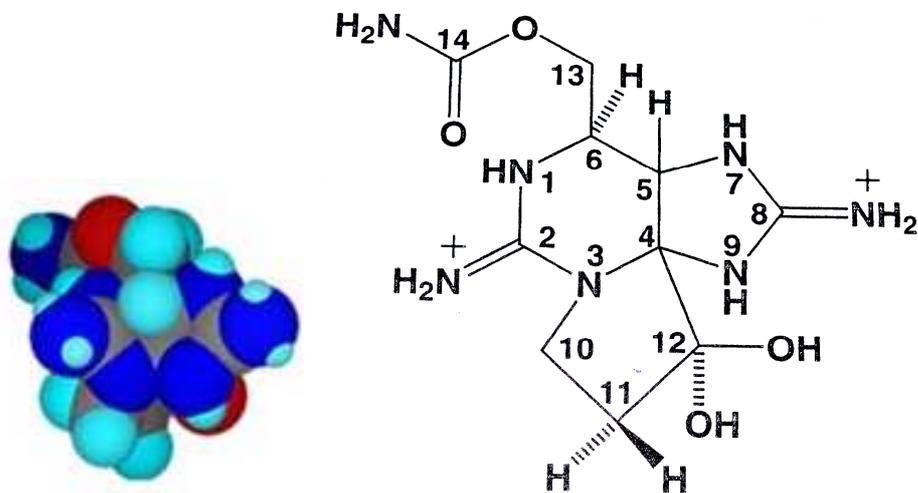


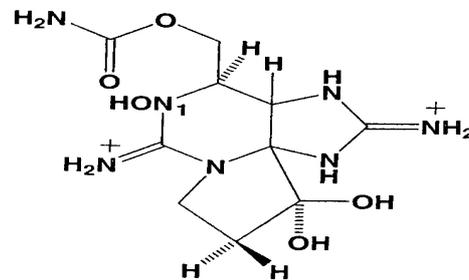
Abb. 9: Saxitoxin [DESHPANDE, 2002; UNIVERSITY of MARYLAND]

Wie schon oben erwähnt ist das grundlegende Molekül ein Tetrahydropurin mit Substituenten an verschiedenen Positionen. Das STX-Molekül hat mehrere interessante Strukturelemente. Die erste ist das Perhydropurin-Skelett mit einem zusätzlichen fünfgliedrigen Ring an der Position 3, 4. Es hat ein Ketonhydrat an der Position 12, das durch zwei benachbarte elektronenziehende Guanidinium-Gruppen stabilisiert wird [DESHPANDE, 2002]. Die Dihydroxy- oder hydratisierte Keton-Fraktion auf dem fünfgliedrigen Ring ist von wesentlicher Bedeutung für seine giftige Aktivität. Katalytische Reduktion von dieser Gruppe mit Wasserstoff zu einer Monohydroxy-Gruppe unterbindet die Aktivität. Die Entfernung der Carbamoyl-Seitenkette auf dem sechsgliedrigen Ring hinterlässt eine Hydroxyl-Gruppe an diesem Platz, welche ein Molekül

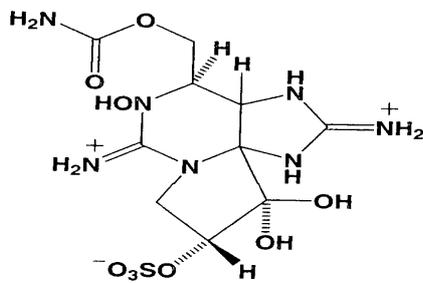
mit etwa 60 Prozent der ursprünglichen toxischen Aktivität produziert. Die Anwesenheit dieser wirksamen Hydroxyl-Gruppe bildet einen Träger für die Vorbereitung der verschiedenen Derivate von STX.

Die PSP-Toxine sind hitzestabil bei saurem pH-Wert (mit Ausnahme der N-Sulfocarbamoyl-Komponenten), aber instabil und leicht oxidiert unter alkalischen Bedingungen [MONS et al., 1998]. STX kann in verdünnter Salzsäurelösung für Jahre ohne Verlust seiner Aktivität oder Potenz aufbewahrt werden [DESHPANDE, 2002]. PSP-Toxine sind zudem polar und wasserlöslich und werden in vier Gruppen eingeteilt:

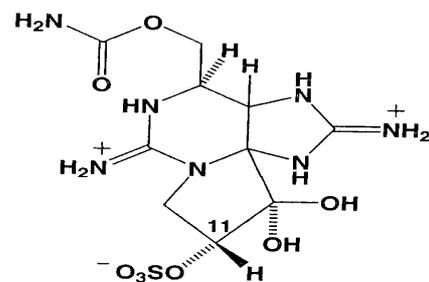
- 1.) Carbamoyl Toxine: STX, neoSTX, GTX-1, GTX-2, GTX-3, GTX-4.
- 2.) Decarbamoyl Toxine: dc-STX, dc-neoSTX, dc-GTX-1, -2, -3, -4.
- 3.) N-Sulfocarbamoyl Toxine: GTX-5(B1), GTX-6(B2), C-1, C-2, C-3, C-4.
- 4.) Neu isolierte Deoxydecabamoyl Toxine: do-STX, do-GTX-2, do-GTX-3 [DOUGLAS et al., 2001]



B. Neosaxitoxin (neoSTX)



C. Gonyautoxin-1 (GTX-1)



D. Gonyautoxin-2 (GTX-2)

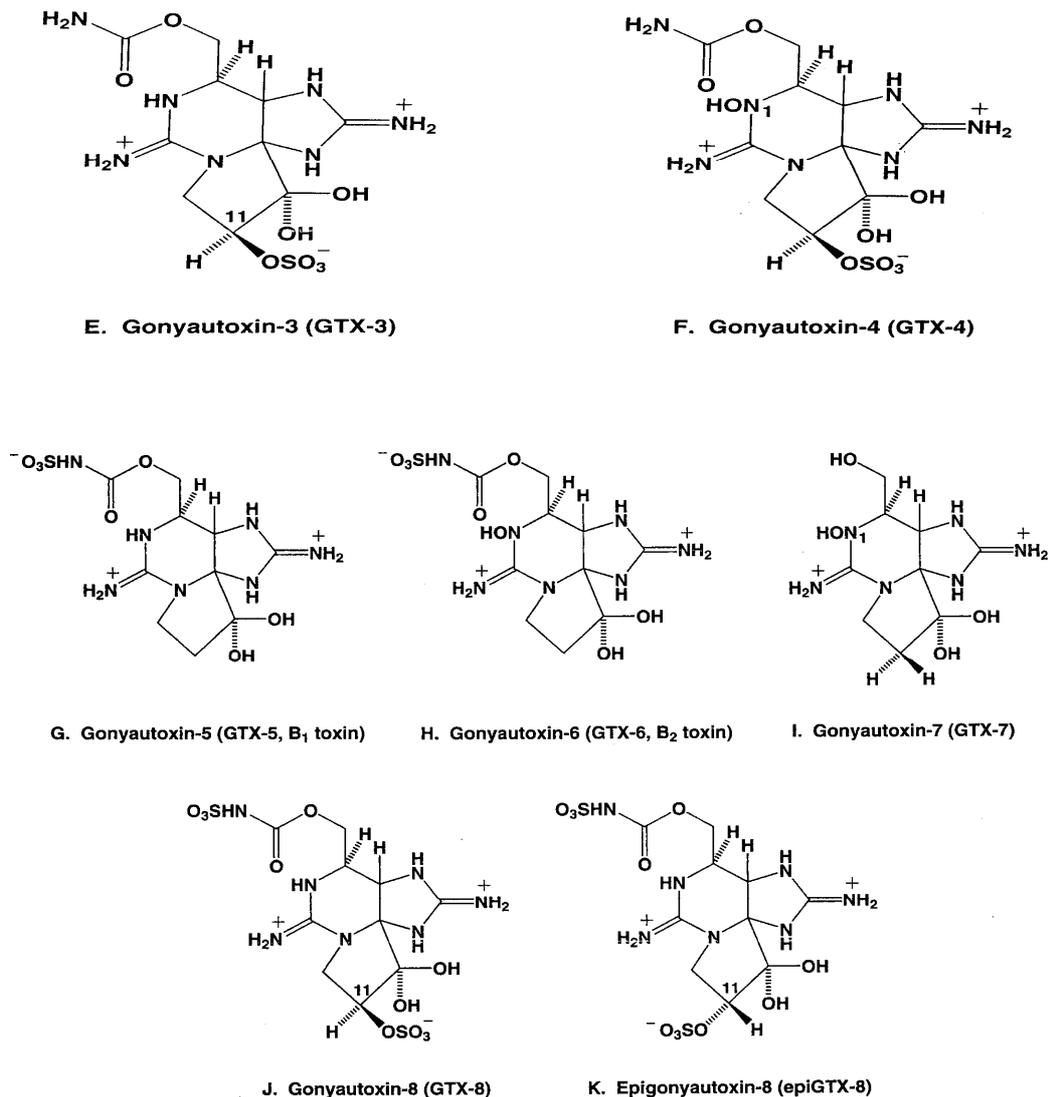


Abb. 10: Struktur von Saxitoxin und Derivate [DESHPANDE, 2002]

Neosaxitoxin (NeoSTX)

NeoSTX wurde zum ersten Mal als geringfügiger Bestandteil aus einer Probe der Alaska-Buttermuschel isoliert. Später wurde bewiesen, dass dieses Toxin eine wichtige Komponente der meisten giftigen Schalentiere, sowie Dinoflagellaten, blau-grüne Algen und Krebsen ist. Seine chemische Struktur ist 1-N-hydroxysaxitoxin. Aus der Reduktion von neoSTX mit Zink-Essigsäure resultiert durch eine reduktive Spaltung

von der N-Hydroxyl-Gruppe das STX [DESHPANDE, 2002].

Gonyautoxin (GTX)

GTX-1 wurde ähnlich wie neoSTX aus Sandklaffmuscheln isoliert, welche *G. tamarensis* Blüten ausgesetzt waren. Es war nun bekannt, dass dieses Toxin als ein wichtiger Bestandteil in vielen PSP-Proben und in verursachenden Organismen vorhanden ist. Seine Struktur wurde auf der Grundlage der spektroskopischen Daten und der chemischen Korrelation mit GTX-2, neoSTX und STX aufgebaut. So ergibt die Reduktion von GTX-1 eine Mischung aus neoSTX und GTX-2, welche weiter zu STX reduziert werden können. GTX-1 und sein Stereoisomer GTX-4 sind wahrscheinlich die Instabilsten unter den PSP-Toxinen.

Die Biotransformation von GTX-1 oder GTX-4 zu STX ist mit einer reduktiven Eliminierung von N-OH verbunden, welche eine relativ häufige biochemische Reaktion ist und einer Umkehrung des üblichen biochemischen Prozesses, das heißt einer Sulfat-Konjugation.

GTX-2 ist ein Sulfat-Ester von STX, wobei GTX-3 das 11-Epimer von GTX-2 ist. Diese beiden Verbindungen werden immer gleichzeitig aufgefunden und bilden ein Gleichgewichtsgemisch von 7:3 in einer Lösung mit neutralem oder höherem pH.

GTX-4 ist das 11-Epimer von GTX-1. Die Verhaltensweise dieser zwei Verbindungen untereinander ist parallel zu dem von GTX-2-und GTX-3.

GTX-5 ist das Carbamoyl-N-Sulfat von neoSTX und ist identisch mit B₁ Toxin. Es wurde zum ersten Mal aus japanischen und PSP-Proben aus Alaska isoliert. Es ist das wichtigste Toxin des tropischen Dinoflagellaten *P. bahamense* var. *compressa*. Diese meist ungiftige Substanz kann mit schwacher Säure hydrolysiert werden und so zum sehr giftigen neoSTX führen.

GTX-6 ist das Carbamoyl-N-Sulfat von STX und ist identisch mit dem B₂ Toxin. Bei saurer Hydrolyse wird die N-Sulfat Bindung gespalten und es entsteht STX. GTX-8 ist das Carbamoyl-N-sulfonyl-Derivat von GTX-3. Es kann leicht mit kurzer Säurebehandlung in GTX-3 umgewandelt werden. GTX-7 wurde zum ersten Mal in einer Toxinmischung der Jakobsmuschel, *Placopecten magellanicus*, gefunden und ist

das Decarbamoyl-neoSTX.

Die Wege der Biotransformation zur Umwandlung von verschiedenen GTX-Derivaten zu STX in verschiedenen Muscheln werden in Abb. 11 übersichtlicher dargestellt. (A1) und (A2) entsprechen Vorläufern von GTX-1 und GTX-4. Es ist durchaus möglich, dass diese Prozesse zur Biotransformation auch in Dinoflagellaten selbst auftreten, da Spuren von GTXs und neoSTX aus Dinoflagellaten extrahiert wurden [DESHPANDE, 2002].

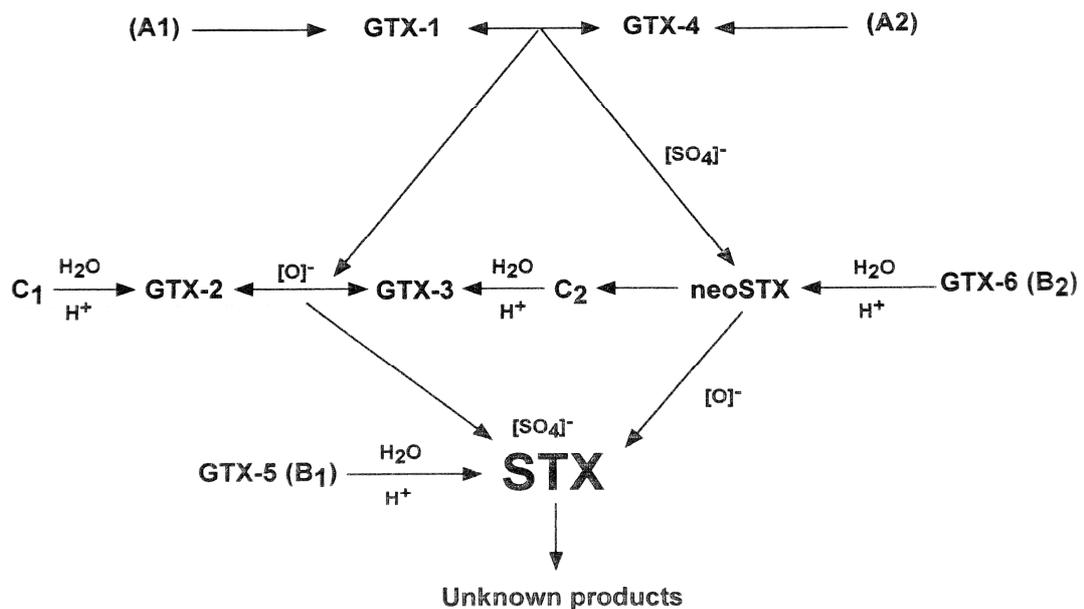


Abb. 11: Biotransformationswege von Gonyautoxinen zu STX [DESHPANDE, 2002]

Synthese von STX

Die erste Totalsynthese von racemischem Saxitoxin wurde im Jahr 1977 von Kishi et al. [1977] durchgeführt. Kishis Synthese beruht auf einer Kondensation eines vinylogenen Carbamats mit Benzyloxyacetaldehyd und Silizium-Tetraisopropoxid und produziert so Thioharnstoff-Ester als Zwischenprodukt, welches in ein Thioharnstoff-Carbamid als Standardmethode umgewandelt wurde. Eine Zyklisierung zur Erstellung des Saxitoxin-Skeletts wurde mit einer Säurebehandlung durchgeführt, die Reaktion schreitet über ein Zwischenprodukt, einem Iminium-Ion, fort. Die Transformationen der funktionellen

Gruppen wurden dann durchgeführt, um die erste Totalsynthese von razemischem Saxitoxin zu vollenden [EDWARDS, 1998].

Die Synthese begann mit einer Umwandlung von Methyl-2-oxo-4-phthalimidobutyrat über zwei Schritte in das Laktam:

1. HO(CH₂)₃-OH/*p*-TSA/C₆H₅CH₃/Rücklauf
2. NH₂NH₂·H₂O/CH₃OH/Rücklauf

Das Laktam ergab durch eine Phosphorpentasulfid-Behandlung mit Benzol das Thiolaktam, welches dann durch weitere zwei Schritte in das vinylogene Carbamat umgewandelt wurde.

1. CH₃COCHBrCO₂CH₃/NaHCO₃/CH₂Cl₂/Rücklauf
2. KOH/CH₃OH/50 °C [KISHI et al., 1977]

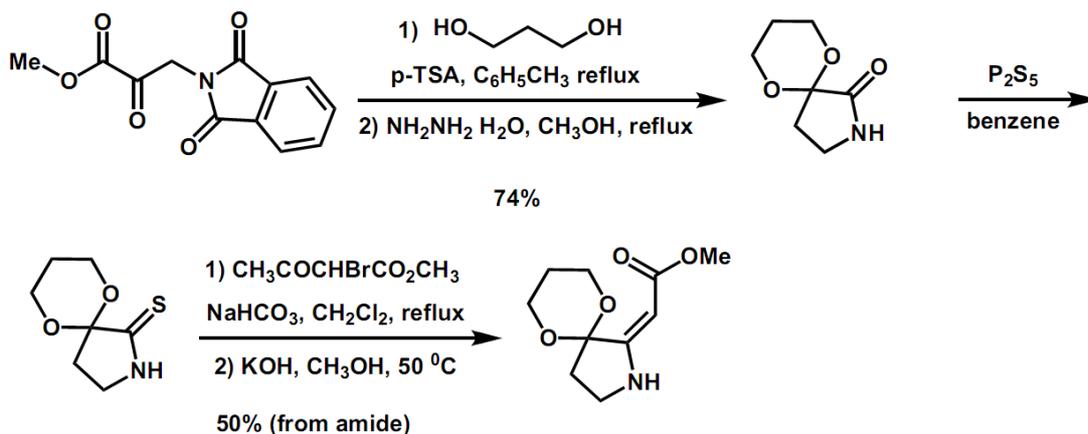


Abb.12: Vorbereitung des vinylogenen Carbamats [BAIRD, 2006]

Das vinylogene Carbamat wurde dann mit Benzoyloxyacetaldehyd und Silizium-Tetraisothiocyanat in Benzol bei Raumtemperatur kondensiert, gefolgt von einer Verarbeitung bei 110 °C in Toluol, mit dem Ziel den Thioharnstoff-Ester zu erhalten.

Der Thioharnstoff-Ester wurde dann durch vier Schritte in ein Molekül, das eine Thioharnstoff- und eine Harnstoffgruppe besitzt, umgewandelt:

1. NH₂NH₂·H₂O/CH₃OH/Raumtemperatur
2. NOCl/CH₂Cl₂/-50 °C

3. 90 °C/C₆H₆
4. NH₃/C₆H₆/Raumtemperatur

Die Zyklisierungsbedingung, die zuvor in diesem Labor entwickelt wurde, war nicht geeignet für das Thioharnstoff-Harnstoffmolekül, da dieses Molekül sehr säureunbeständig ist. Diese Schwierigkeit wurde durch das Ersetzen der Ketal-Gruppe vom Thioharnstoff-Harnstoffmolekül mit der Thioketal-Gruppe (säurebeständig) beseitigt. So wurde das Thioharnstoff-Harnstoffmolekül durch Behandlung mit 1,3-Propanedithiol in Acetonitril in Gegenwart von Bortrifluorid-Etherat bei Raumtemperatur in den Thioketal-Thioharnstoff umgewandelt.

Der Thioketal-Thioharnstoff wurde in einer Mischung von Essigsäure und Trifluoressigsäure auf 50 °C für 18 h erwärmt, um den trizyklischen Thioharnstoff und sein C6 Epimer zu erhalten. In sauberer Trifluoressigsäure ist das Verhältnis vom trizyklischen Thioharnstoff und dem zyklischen Epimer 1:5 zu Gunsten des Letzteren [KISHI et al., 1977].

Vinylogen Carbamat

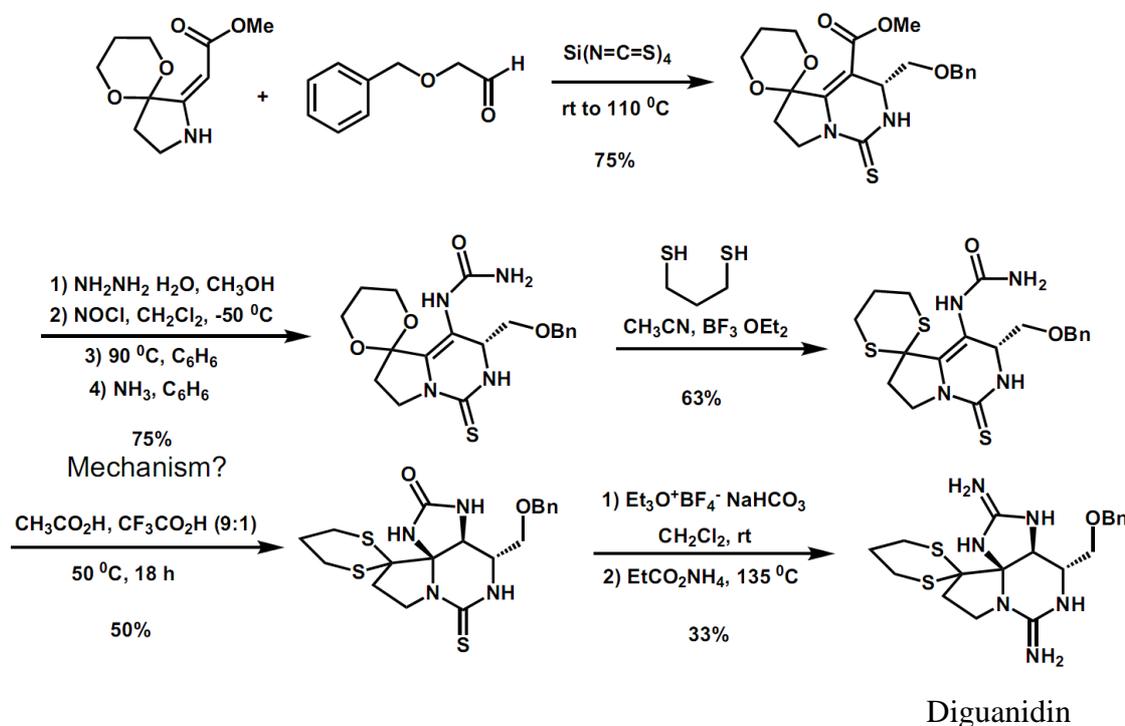


Abb. 13: Vorbereitung des Diguanidin-Stücks [BAIRD, 2006]

Danach wurde der trizyklische Thioharnstoff in zwei Schritten in das Diguanidin umgewandelt:

1. $\text{Et}_3\text{O}^+\text{BF}_4^-/\text{NaHCO}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Raumtemperatur}$
2. $\text{EtCO}_2\text{NH}_4/135\text{ }^\circ\text{C}$

Das Hydrochlorid-Salz von Diguanidin wurde mit Bortrichlorid in Methylenechlorid bei 0°C behandelt und es entstand Decarbamoylsaxitoxin-Thioketal, welches als Hexaacetat isoliert wurde. NBS-Behandlung des Hexaacetats in nassem Acetonitril bei 15°C , gefolgt von einer Methanol-Behandlung bei 100°C , ergab das Molekül Decarbamoylsaxitoxin-Dihydrochlorid als amorphen Festkörper.

Das Decarbamoylsaxitoxin, welches auf diese Weise synthetisiert wurde, war identisch mit dem authentischen Decarbamoylsaxitoxin, das aus dem natürlichen Saxitoxin entsteht. Eine Chlorosulfonylisocyanat-Behandlung von Decarbamoylsaxitoxin-Dihydrochlorid in Ameisensäure bei 5°C , gefolgt von einer Verarbeitung mit heißem Wasser, ergab das d, l-Saxitoxin-Sulfat. Die synthetische Substanz wurde isoliert mit schwach sauren Ionenaustauschharzen und Säulenchromatographie und ergab eine Ausbeute von 50%. Das synthetische Saxitoxin war nun identisch mit natürlichem Saxitoxin im Vergleich des NMR-Spektrums, der Kieselgel TLC und in der Toxizität [KISHI et al., 1977].

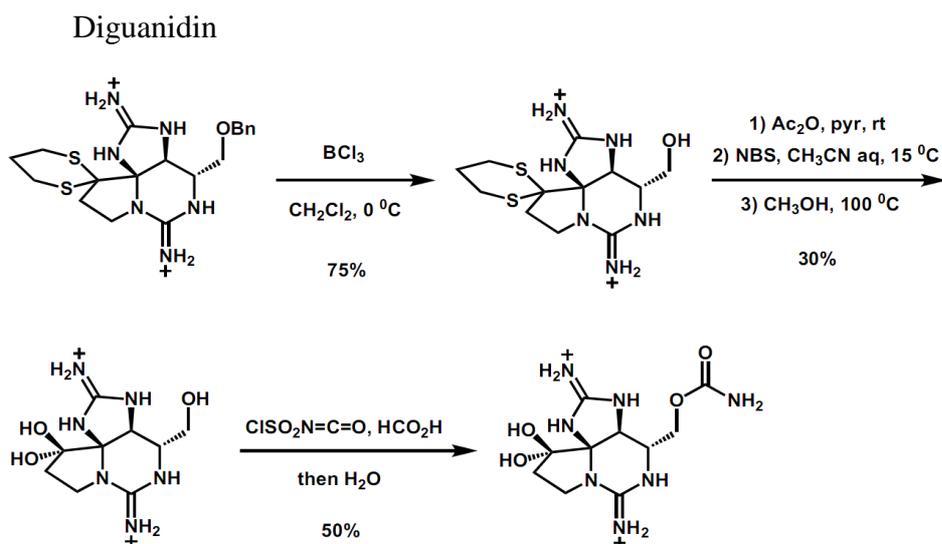


Abb. 14: Abschluss der Synthese nach Kishi et al. [BAIRD, 2006]

Die zweite Synthese wurde von Jacobi und seinen Mitarbeitern im Jahr 1984 durchgeführt. Der wichtigste Schritt der Synthese von Saxitoxin nach Jacobi beruht auf der Bildung eines Benzylhydrazid-Zwischenproduktes, welches durch Methylglyoxylat-Hemimethylacetal und einer Lewis-Säure, zum hoch-reaktiven Azomethin-Imin umgebaut wurde, das später eine intramolekulare 1,3-dipolare Zyклоadditionsreaktion durchlief und zu einem höheren tetrazyklischem Zwischenprodukt führte [EDWARDS, 1998].

Das Schlüssel-Zwischenprodukt für diese Synthese von STX ist das Hydrazid-Derivat, welches auf geeignete Weise von dem 2-Imidazolin (fünfgliedriger Ring mit zwei nicht benachbarten Stickstoffatomen) abgeleitet wurde. Dieses Molekül wurde bei der Behandlung mit Methyl-Glyoxylat-Hemiacetal in Anwesenheit von $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ reibungslos in das Azomethin-Imin umgewandelt, welches einer kinetisch kontrollierten 1,3-dipolaren Zyклоaddition unterzogen wurde, um das Pyrazolidin-Derivat (fünfgliedriger Ring mit zwei benachbarten Stickstoffatomen) zu erhalten [JACOBI et al., 1984].

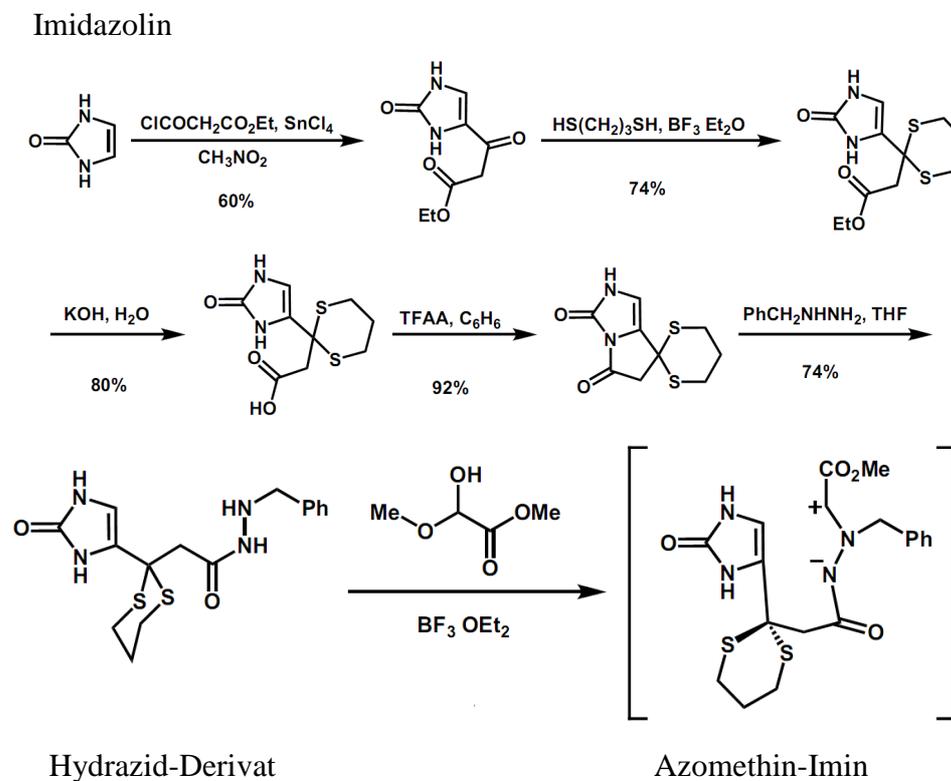


Abb. 15: Vorbereitung des Vorläufers der Zyклоaddition [BAIRD, 2006]

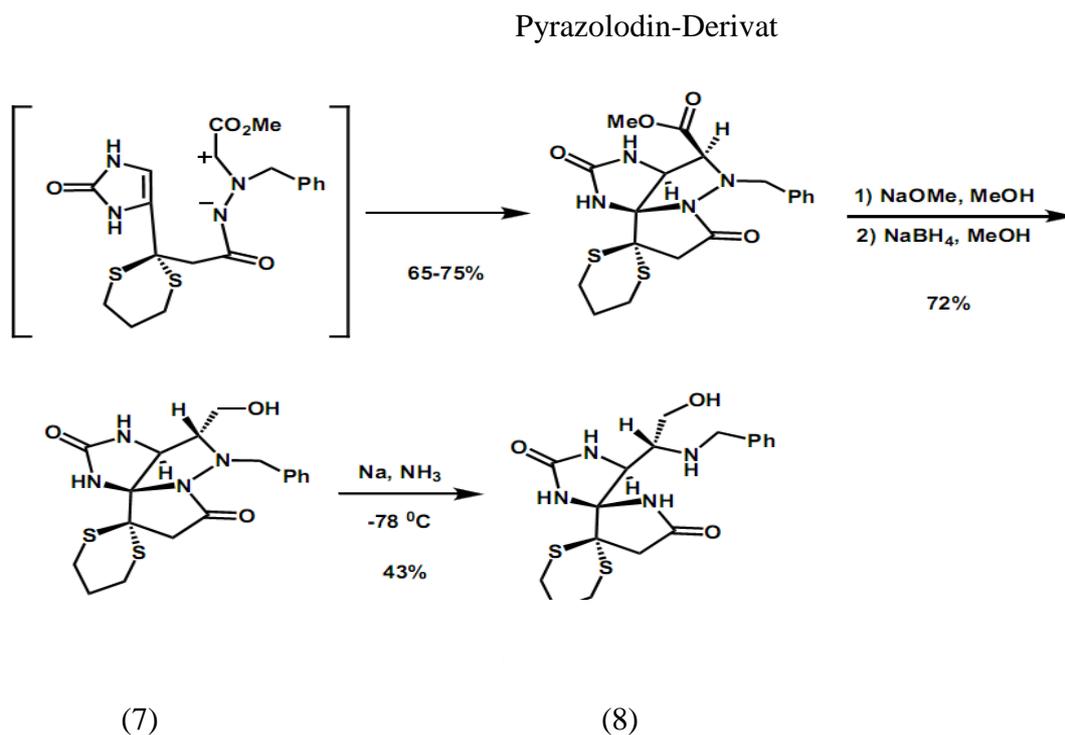


Abb. 16: Vorbereitung des Pyrazolidins [BAIRD, 2006]

Das Pyrazolidin-Derivat wurde als nächstes quantitativ zum α -Ester (NaOMe/MeOH) epimerisiert, welcher ohne Isolation zum α -Alkohol (7) (NaBH₄/MeOH) abgebaut wurde, mit allen asymmetrischen Zentren von Saxitoxin in der richtigen relativen Konfiguration. Durch eine weitere Reaktion mit Na/NH₃ entstand das Laktam-Derivat (8), weitere Reduktionen waren nicht möglich. Aus dem α -Alkohol (7) entstand durch seine leichte Umwandlung mit BH₃·Me₂S das Molekül (9) [JACOBI et al., 1984].

Das Molekül 9 wurde dann mit Pd/HOAc/HCO₂H und selektiver Acylierung in eine Reihe von verschiedenen aktiven Molekülen (10) umgewandelt, welche weiter durch Na/NH₃ zum Molekül (11) umgewandelt werden. Durch die Reduktion von OPh entstand (12), das mit Ac₂O/Pyr und Et₃O⁺BF₄⁻/KHCO₃ zu bis-Pseudourea (13) führte. Dieses letzte Molekül ergab bei einer kurzen Thermolyse EtCO₂NH₄⁺ (130 °C, 30 Min.) dann das bekannte bis-Guanidin (14) (Descarbamoylsaxitoxin), deren Hexaacetat-Derivat in jeder Hinsicht identisch war mit einer authentischen Probe [JACOBI et al., 1984].

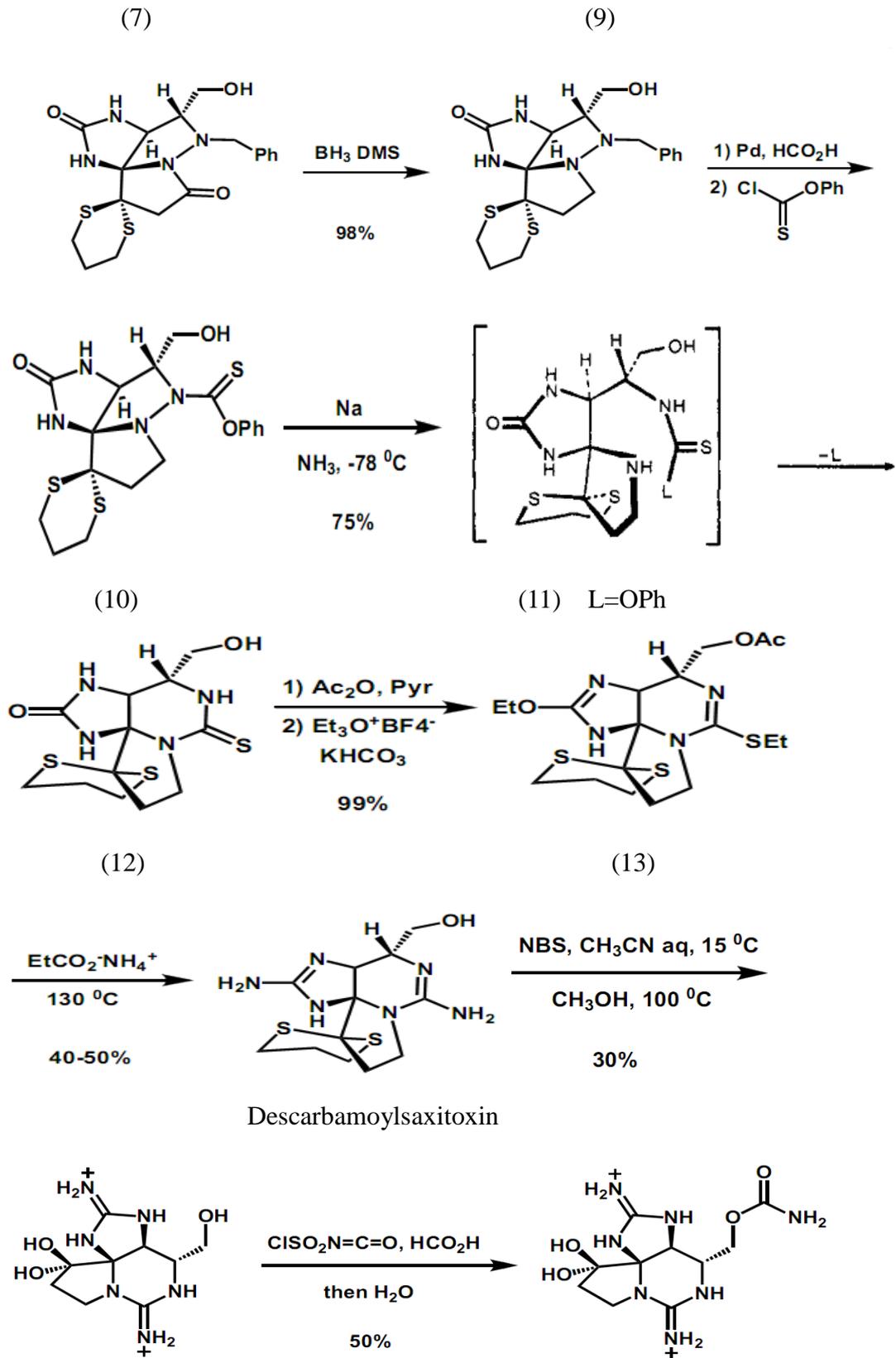


Abb. 17: Abschluss der Synthese nach Jacobi et al. [BAIRD, 2006]

Schlussendlich überschneidet sich hier der Syntheseweg von Jacobi et al. mit dem von Kishi et al., indem es zu der gleichen NBS-Behandlung des Hexaacetats in nassem Acetonitril bei 15 °C kam, gefolgt von einer Methanol-Behandlung bei 100 °C, was zum Decarbamoylsaxitoxin-Dihydrochlorid führte. Eine weitere Behandlung mit Chlorosulfonylisocyanat in Ameisensäure bei 5°C, gefolgt von einer Verarbeitung mit heißem Wasser, ergab dann d,l-Saxitoxin [JACOBI et al., 1984].

Erst kürzlich kam es im Jahr 2006 durch Du Bois zur Synthese von natürlichem (+)-STX [EDWARDS, 1998].

Eine erste Prüfung von STX zeigte, dass die beiden C4- und C12-Zentren sich auf der Ebene des Keton-Oxidation-Niveaus (Abb. 18) befinden. Bei physiologischem pH-Wert ist das Gleichgewicht zwischen dem C12-Keton und seiner hydratisierten Form im Hinblick auf den Letzteren stark begünstigt. Die retrosynthetische Trennung der benachbarten spiro-aminal (aus einem Amin und Acetal entstehend = zwei an einem Kohlenstoff-Atom gebundenen Aminogruppen [NEUMÜLLER, 2003]) Verbindung verlangt eine Cyclodehydrationsreaktion, bei der beide Guanidine auf ein Keton am C4 kondensiert werden. Damit dieser Plan möglich werden konnte, sollte eine der beiden Guanidine innerhalb eines neun-gliedrigen Ringes eingebunden werden (1). Obwohl fast kein Beispiel für diesen Einbau eines mittleren Guanidin-Ringes vorhanden war, wurde erwartet, dass Pseudothiourea (2) mit einem verkürzten Amin auf C6 kondensiert werden könnte, möglicherweise über ein reaktives Carbodiimid ($R - N = C = N - R'$) [FLEMING und DU BOIS, 2006].

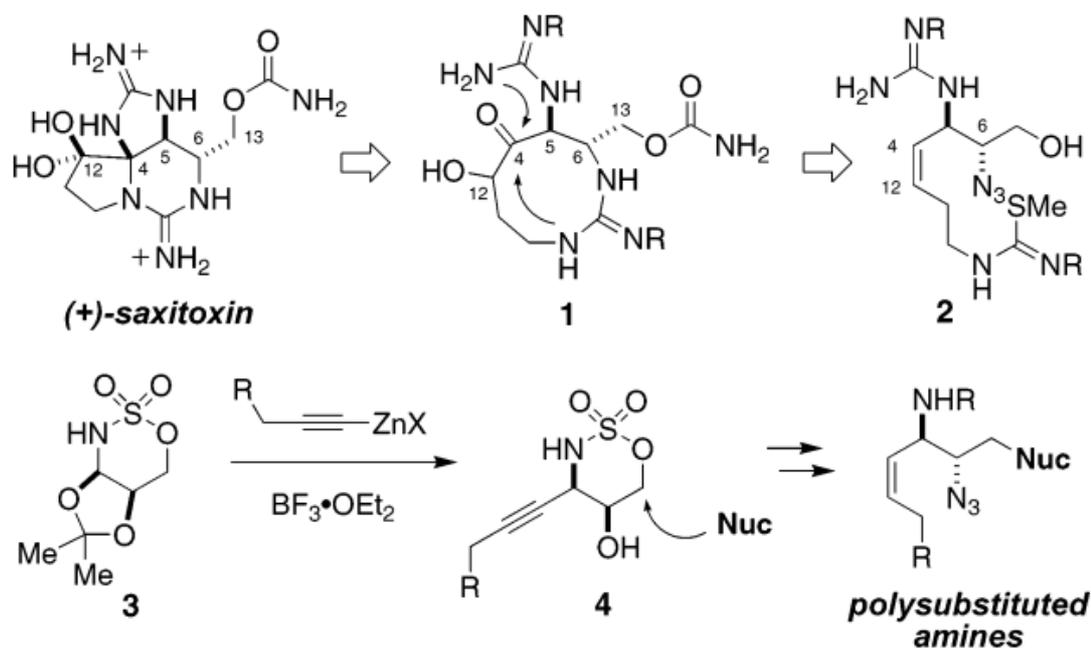
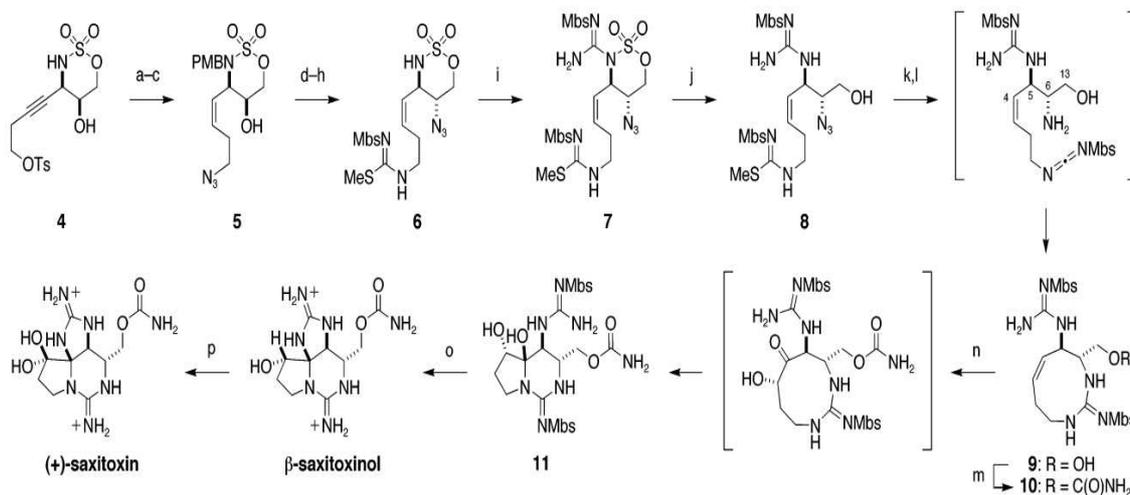


Abb. 18: Die Oxathiazinan-Strategie [FLEMING und DU BOIS, 2006]

Das besondere N, O-Acetal (**3**), das für die STX-Synthese gebraucht wurde, wurde leicht durch (R)-Glycerin-Acetonid hergestellt. Eine durch eine Lewis-Säure begünstigte Addition von einem Zink-Acetylid zu (**3**) ermöglichte so die Herstellung von Oxathiazinan-Dioxid (**4**) (R-CH₂OTs) als ein einziges Diastereomer. Der Vorteil dieses Heterozyklus war, dass er einerseits als Maskierungsgruppe der alkalischen Amine und andererseits als ruhendes Elektrophil diente, welches für die Ring-Öffnung zu einem geeigneten Zeitpunkt aktiviert wurde. Dementsprechend ermöglicht die N,O-Acetal-Strategie eine allgemeine Herangehensweise, um substituierte Amin-Derivate zu vervielfachen, die über ihre Nützlichkeit für den Bau von STX hinausschritten.

Die Vorbereitung des gewünschten neun-gliedrigen Ring Guanidins (**1**) erfolgte durch Oxathiazinan (**4**) über eine Reihe von einfachen Funktionsgruppen-Transformationen (Abb. 19). Ein erwähnenswerter Schritt in dieser Abfolge war auch der Einbau von Pseudothiourea (**6**) unter Verwendung von MeS-(Cl)C=NMbs, ein Reagenz, das speziell für diese Schritte hergestellt wurde. Außerdem installierte eine sequentielle Reaktion von Oxathiazinan (**6**) mit Cl₂C=NMbs und (Me₃Si)₂NH den ersten von zwei Guanidinen, während es als Aktivierung des heterocyclischen Ringes für die spätere hydrolytische Öffnung fungierte. Gemeinsam umfasste die Umwandlung von (**4**) bis (**8**)

11 Schritte und bot ein azyklisches Zwischenprodukt, welches alle erforderlichen Komponenten für den Einbau der trizyklischen Grundstruktur von STX trug [FLEMING und DU BOIS, 2006].



^a Conditions: (a) H_2 , Pd/CaCO₃/Pb, THF; (b) NaN_3 , $^t\text{Bu}_4\text{NI}$, DMF, 90% (2 steps); (c) *p*-MeOC₆H₄CH₂Cl, $^t\text{Bu}_4\text{NI}$, K₂CO₃, CH₃CN, 85%; (d) Me₃P, THF/H₂O; (e) MeS(Cl)C=NMbs, $^i\text{Pr}_2\text{NEt}$, CH₃CN, 72% (2 steps); (f) Tf₂O, C₅H₅N, DMAP, CH₂Cl₂; (g) NaN_3 , DMF, -15 °C, 70% (2 steps); (h) (NH₄)₂Ce(NO₃)₆, $^t\text{BuOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 74%; (i) KO^tBu, Cl₂C=NMbs; then (Me₃Si)₂NH, 70% (+20% of 6); (j) aq. CH₃CN, 70 °C, 95%; (k) Me₃P, THF/H₂O; (l) AgNO₃, Et₃N, CH₃CN, 65% (2 steps); (m) Cl₃CC(O)NCO, THF/CH₃CN, -78 °C; then K₂CO₃, MeOH, 82%; (n) 10 mol % of OsCl₃, Oxone, Na₂CO₃, EtOAc/CH₃CN/H₂O, 57%; (o) B(O₂CCF₃)₃, CF₃CO₂H, 82%; (p) DCC, C₅H₅N·HO₂CCF₃, DMSO, 70%. Mbs = *p*-MeOC₆H₄SO₂.

Abb. 19: Weiterer Syntheseweg [FLEMING und DU BOIS, 2006]

Nach einer Reduktion des Azids (8) mit Me₃P folgte eine sofortige Aufnahme von dieser Verbindung zu AgNO₃/Et₃N. Die letztgenannten Bedingungen sind vermutlich Auslöser eines reaktiven N-Sulfonylcarbodiimids, welches wiederum durch das Pendant C6-Amin abgefangen wurde. Im heterozyklischen Produkt (9) war der stark polare Charakter der beiden Guanidinteile schön maskiert durch die Mbs-Schutzgruppe. Die Funktionalisierung des C13-Alkohols in (9) war daher leicht durchgeführt (Cl₃CC(O)NCO) und es entstand die Verbindung (10). Die Verwendung von katalytischem OsCl₃ (10 mol %), Oxone und Na₂CO₃ führte zu einer Ausbeute von 57% des gewünschten Produkts (11) als einziges Stereoisomer.

Um den STX-Kern von (11) in eine effiziente Art und Weise zu bringen, wurden Bedingungen gesucht, um eine gleichzeitige Zyklisierung des fünf-gliedrigen Ring Guanidins und der Entfernung der Mbs-Schutzgruppe durchzuführen. Dies war der Fall, als (11) mit B(O₂CCF₃)₃ behandelt wurde und so das bekannte Produkt β-Saxitoxinol

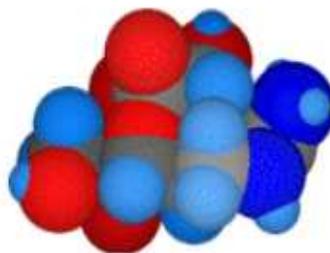
erzeugte. Schlussendlich ermöglichte eine Aufnahme von β -Saxitoxinol zu oxidativen Bedingungen das gewünschte Guanidinium-Gift [FLEMING und DU BOIS, 2006].

3.1.2 Tetrodotoxin

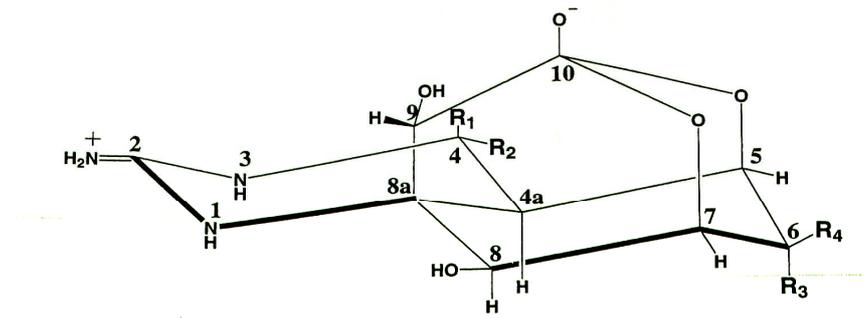
TTX ist durch seine einzigartige Struktur und seine spezifische Aktivität, Natrium-Kanäle zu blockieren, eines der bekanntesten marinen Toxine [YASUMOTO, 1986].

Es ist ein extrem giftiges, hoch letales, neurotoxisches, niedermolekulares, nicht-Protein Alkaloid und zwar ein Polyhydroxy-perhydro-2-imino-chinazolinderivat (Summenformel: $C_{11}H_{17}N_3O_8$) mit Hemilactalstruktur [TEUSCHER und LINDEQUIST, 1998; LEWIS' DICTIONARY OF TOXICOLOGY, 1998].

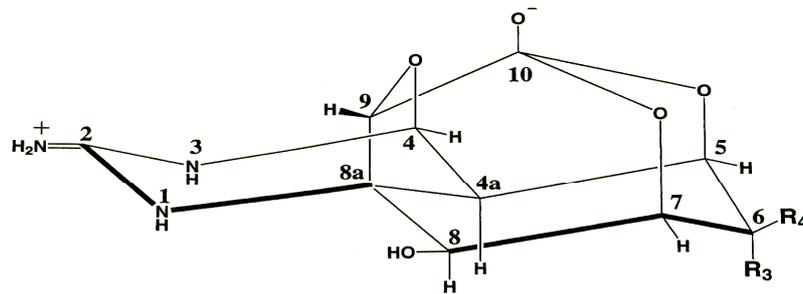
TTX hat in einer Reihe von strukturell verwandten Verbindungen die stärkste toxische Wirkung, es ist viel giftiger als die anderen Formen. Viele andere Verbindungen der TTX-Familie wurden als kleinere Komponenten in den verschiedenen Kugelfischarten festgestellt. Zu diesen kleineren Komponenten zählen unter anderem *4-epiTTX*, *6-epiTTX*, *11-deoxyTTX*, *11-norTTX-6(R)-ol*, *4,9-anhydroTTX*. Von Tetrodonsäure wurde ebenfalls berichtet [DESHPANDE, 2002].



[UNIVERSITY of MARYLAND]



(A) Tetrodotoxin



(B) Anhydrotetrodotoxin

Tetrodotoxin (TTX)	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
TTX (A)				
TTX	H	OH	OH	CH ₂ OH
4- <i>epi</i> TTX	OH	H	OH	CH ₂ OH
6- <i>epi</i> TTX	H	OH	CH ₂ OH	OH
11-deoxyTTX	H	OH	OH	CH ₃
11- <i>nor</i> TTX-6(<i>R</i>)-ol	H	OH	H	OH
11-deoxy-4- <i>epi</i> TTX	OH	H	OH	CH ₃
11-oxoTTX	H	OH	OH	CH(OH) ₂
AnhydroTTX (B)				
4,9-anhydroTTX			OH	CH ₂ OH
4,9-anhydro-6- <i>epi</i> TTX			CH ₂ OH	OH
4,9-anhydro-11-deoxyTTX			OH	CH ₃

Abb. 20: Struktur von Tetrodotoxin [DESHPANDE, 2002]

Die sechs OH-Gruppen, welche auf starke Hydrophilie weisen, und die stark basische Guanidogruppe sind wichtig für die spezielle Wirkung des Toxins.

TTX hat ein Molekulargewicht von 319,26798 g/mol, ist in Wasser und organischen Lösungsmitteln nicht löslich, in saurem Wasser und Methanol leicht löslich und hat keinen Schmelzpunkt [DESHPANDE, 2002; TSUDA, 1966].

Wenn TTX in saurem Lösungsmittel gelöst wird, entsteht ein Gleichgewicht zwischen Hemilaktal- und Lakton-Form [ROTH, 2007].

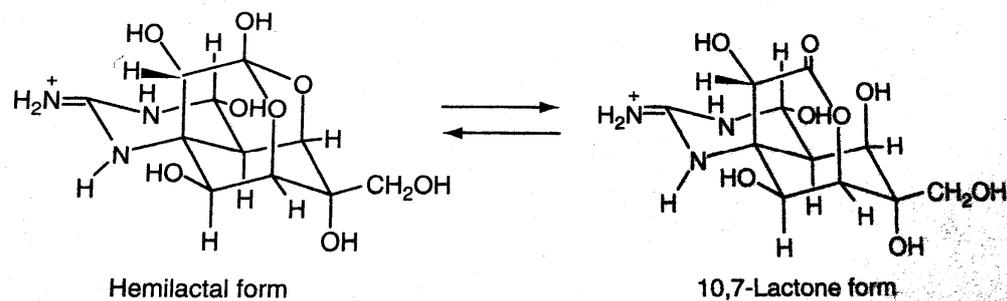


Abb. 21: Tautomere von TTX [HWANG und NOGUCHI, 2007]

Weiters ist dieses Toxin ab einem pH-Wert von sieben und unter einem pH-Wert von drei instabil. In einer sauren Lösung mit einem pH-Wert von 4 - 5 kann man TTX relativ gut gekühlt lagern, doch ist diese Lösung stark sauer oder basisch zerfällt TTX sehr schnell [TSUDA, 1966]. Das Toxin wird beim Erhitzen auf 116°C unter 12,5 Ψ [= 0,8620 bar (1 bar = 14,5 Ψ)] für 75 Minuten inaktiviert. Die einwertige Säure hat einen pKa von 8,5 und die terminale Aminogruppe neigt dazu ein Zwitterion mit einer Hydroxylgruppe zu formen [DESHPANDE, 2002].

Viele japanische Wissenschaftler haben lange Zeit die chemischen und pharmakologischen Charakterisierungen von TTX studiert. Dr. Tahara gelang im Jahr 1909 eine teilweise Reinigung des Kugelfisch-Toxins und er nannte es TTX nach seinem wissenschaftlichen Namen [HWANG und NOGUCHI, 2007].

Die absolute Struktur des TTX wurde durch drei Gruppen von Wissenschaftlern im Jahr 1964 aufgeklärt: Obwohl die strukturelle Bestimmung zunächst schwierig erschien, gelang es den drei Gruppen Hirata-Goto et al., Tsuda et al. und Woodward jeweils den

gleichen Aufbau unabhängig voneinander zu entdecken und einige interessante Eigenschaften dieses Moleküls aufzudecken. Tetrodotoxin enthält ein Dioxo-adamantan Ringsystem, welches durch mehrere Hydroxylgruppen funktionalisiert ist, eine ortho-Ester Gruppe und eine zyklische Guanidin-Substanz als Teil einer hemiaminalen Verknüpfung. Mehrere Jahre nach der ersten Isolation wurde die absolute Konfiguration durch die Röntgen-Kristallographie eines Derivats eindeutig ermittelt [HUANG, 2004].

Synthese von TTX

Die erste Totalsynthese von Tetrodotoxin wurde im Jahr 1972 von Kishi et al. in einer racemischen Form durchgeführt. Seitdem wurden mehrere Berichte über die Fortschritte in Richtung der Synthese dieses natürlichen Produktes dokumentiert und im Jahr 2003 kam es durch individuelle Anstrengungen von Isobe und DuBois zum Höhepunkt. Sie entwickelten die asymmetrische Synthese von TTX.

Die Synthese von Tetrodotoxin wurde zu einer wesentlichen Herausforderung für Bio-Chemiker. In einer retrosynthetischen Analyse zeigte die Beseitigung des Guanidin und des ortho-Ester-Teils einen dicht funktionalisierten Cyclohexan-Ring, dessen Kohlenstoffe alle ersetzt sind und sieben benachbarte stereogene Zentren (2) aufweisen. Interessanterweise ist der Ersatz zu diesem Ring meist auf die β -Seite begrenzt, mit Ausnahme der quartären Zentren auf C6 und C8a, die einen Sauerstoff und Stickstoff auf der α -Seite enthalten. Dieser substituierte Cyclohexan-Ring ist ein gemeinsamer Weg vor dem Einbau des Guanidin Teils und der Bildung des ortho-Esters [HUANG, 2004].

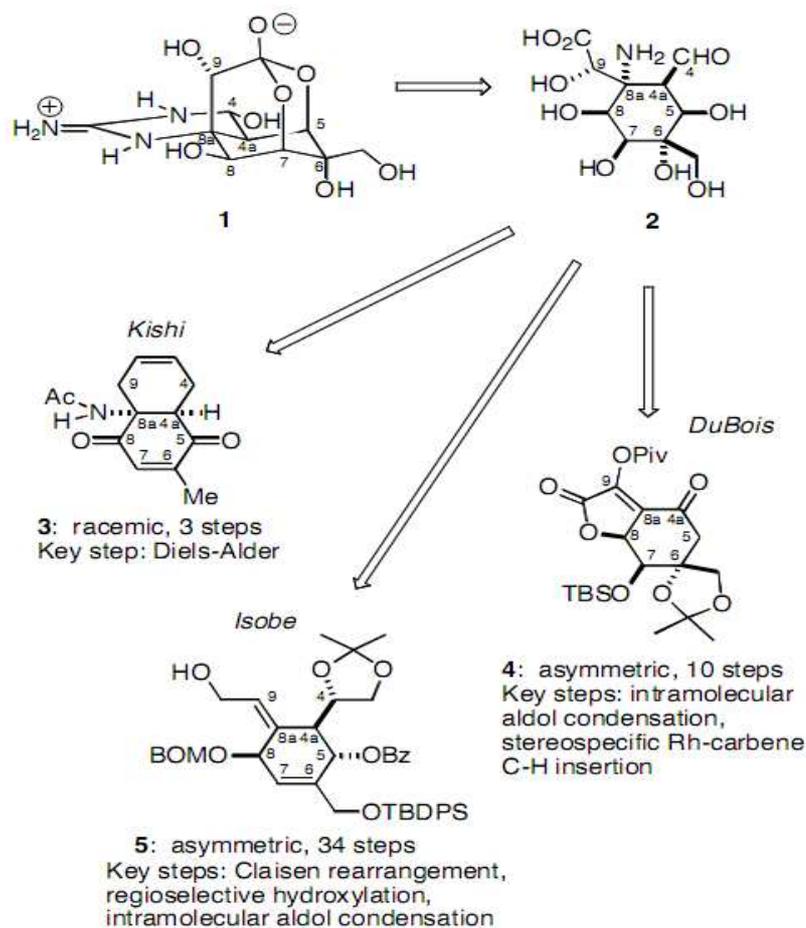


Abb. 22: Verschiedene Synthesewege vom Cyclohexan-Ring ausgehend
[HUANG, 2004].

Wie in der oberen Abbildung zu sehen ist, unterscheiden sich die Ansätze von Kishi, Isobe und Du Bois zu Cyclohexan (2) enorm. Kishis Synthese zielt auf ein cis-Dekalin (Dekahydronaphthalin) Addukt ab.

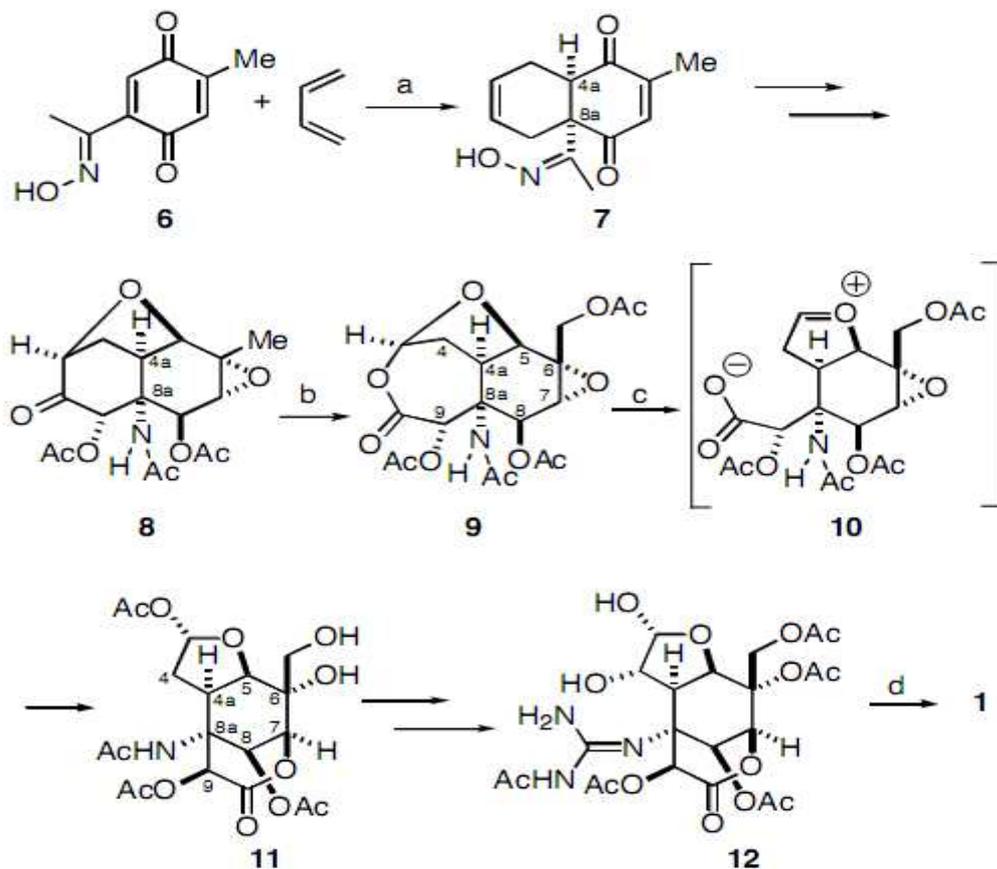
Die Konformationsänderung dieses cis-Dekalin Gerüsts bestimmt die Diastereoselektivität der nachfolgenden Transformationen. Isobe und Du Bois folgten einer anderen Strategie in Richtung einer asymmetrischen Synthese. Die Isobe-Strategie besteht aus insgesamt 67 Schritten und konzentriert sich als Erstes auf die Installation der C4a, C5 und C7 chiralen Zentren, mit einer späteren Umkehrung von C5 in der Synthese. Du Bois' Strategie besteht aus insgesamt 32 Schritten und konzentriert sich auf die Einstellung der anderen stereogenen Zentren vom Anfang, nämlich C6 und C8. Diese Strategien führen zwangsläufig zu sehr gegensätzlichen Synthesen [HUANG,

2004].

In der razemischen Synthese von Kishi wurde ein Weg zu einem voll funktionalisierten Cyclohexan-Ring durch eine Diels-Alder-Reaktion entwickelt.

Die Reaktion von Chinonoxim ($\text{RC} = \text{N} - \text{OH}$) (6) mit Butadien führte zum Dekalin-Addukt (7). Kishis Entscheidung, Chinon 6 in der [4 +2] Cycloaddition zu verwenden, scheint das einzige Beispiel für die Verwendung eines Oxims als Dienophil (Cycloaddition \rightarrow ein Kohlenstoffring wird mit zwei konjugierten Doppelbindungen (Dien) an eine Verbindung mit einer aktivierten Doppel- oder Dreifachbindung (Dienophil) addiert, es entsteht ein sechsgliedriger Ring [NEUMÜLLER, 2003]) in einer Diels-Alder-Reaktion zu sein. Die Verwendung von Oxim (6), bietet entscheidende Vorteile. Obwohl der Zusatz von SnCl_2 notwendig war, um die Cycloaddition zu beschleunigen, wurde die Kontrolle der Regioselektivität (bestimmte Regionen eines Moleküls werden bevorzugt angegriffen [NEUMÜLLER, 2003]) während dieser Reaktion von dem Elektronen-defizitären Oxim vermittelt, unabhängig von der Anwesenheit der Lewissäure [HUANG, 2004].

Durch eine Reihe von Reduktionen und Epoxidationen auf der α -Seite des Moleküls erreichte Kishi ein Zwischenmolekül (8), ein Ausgangsstoff eines wichtigen Umlagerungsschrittes in der Synthese. Eine Baeyer-Villiger-Oxidation (Ketone/Aldehyde werden durch Umsetzung mit Peroxocarbonsäuren zu Estern/Carbonsäuren umgesetzt [NEUMÜLLER, 2003]) vom Keton (8) bis zum Lakton (9), gefolgt von einer Säure katalysierten Neuordnung führte bis zum Molekül (11). Diese Transformation erfolgt vermutlich mittels Oxocarbenium-Ionen Bildung und gleichzeitiger Öffnung des 7-gliedrigen Laktons. Intramolekulare Angriffe auf das Epoxid durch Carboxylat und Angriffe auf die Oxocarbenium-Ionen durch Acetat ergaben das Molekül (11). Die restlichen Schritte schließen die Manipulation der funktionellen Gruppe und die Guanidin-Installation mit ein. Vom vorletzten Zwischenprodukt (12) ermöglicht ein Verfahren unter Einbeziehung von NaIO_4 Spaltung des Diols und einer Entfernung der Schutzgruppe die letzten beiden Ringschließungen. Das ist die gesamte Totalsynthese des razemischen Tetrodotoxin nach Kishi et al. [HUANG, 2004].



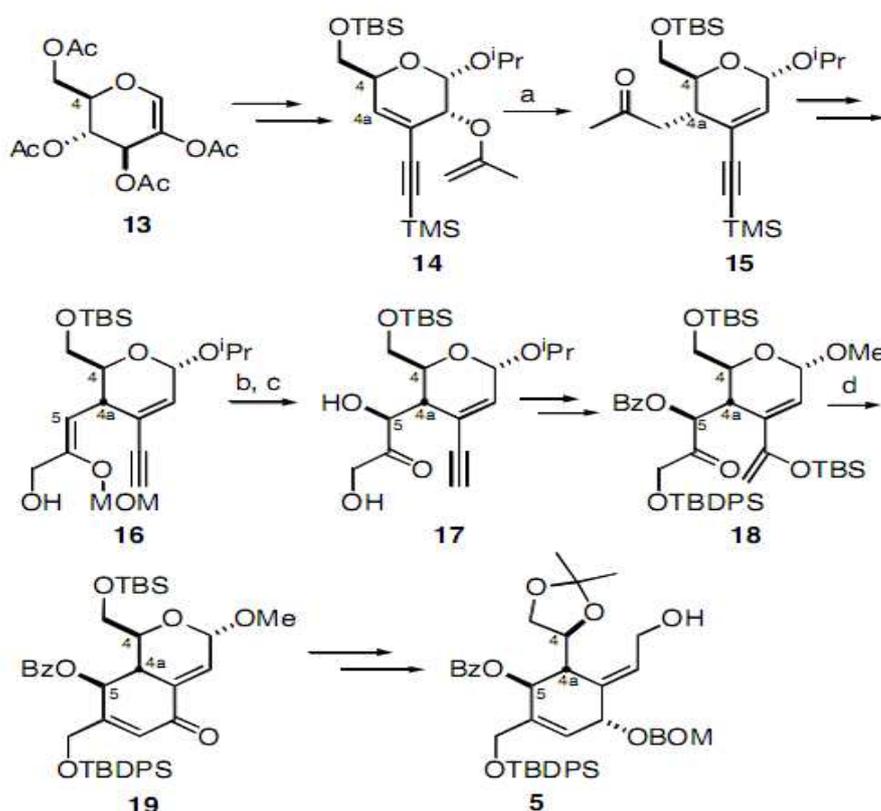
(a) SnCl_2 , CH_3CN , rt, 83%; (b) *m*-CPBA, CH_2Cl_2 , rt, quant; (c) KOAc, AcOH, 90 °C, quant; (d) NaIO_4 , THF, 0 °C; $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, NH_4OH , MeOH, H_2O ; Note: Yields not given in Schemes 1–5 indicate one was not given for that particular step, but over a series of steps and were generally high.

Abb. 23: Synthese nach Kishi et al. [HUANG, 2004]

Als Beweis für die Komplexität des konstruierten (-)-Tetrodotoxins wurde eine asymmetrische Synthese erst 31 Jahre später durch Isobe und Du Bois möglich gemacht. Isobe war der Erste, dem eine vollständige Synthese von (-)-Tetrodotoxin gelang. In seiner Synthese wurde 2-acetoxy-tri-O-acetyl-D-glucal (13) als Ausgangspunkt aus dem chiralen Pool gewählt, dieses Molekül enthielt Sauerstoff, welcher für das natürliche Produkt notwendig war.

Obwohl kein stereogenes Zentrum im Glucal (13) wie im natürlichen Produkt vorhanden war, hat die bestehende Stereochemie an C4 einen Einfluss auf die Kontrolle der Chiralität bei C4a, wenn auch durch eine lange Reihe von Transformationen. In

neun Schritten bei verfügbaren Ausgangsmaterialien wurde das erste stereogene Zentrum C4a im Tetrodotoxin durch eine Claisen-Umlagerung im Zwischenprodukt (14) eingesetzt. Nach einer Reihe von Reaktionen, die meist eine Entfernung der Schutzgruppe, Oxidationen und Schutzmaßnahmen einschließen, synthetisierte Isobe das Zwischenprodukt (16), welches Gegenstand einer diastereoselektiven Epoxidation war. Die Reaktion vom Zwischenprodukt (16) mit Amberlyst 15 ergab ein Produkt (17), dass eine 7:1 Diastereoselektivität zu Gunsten der gewünschten (S) - Konfiguration am C5 aufwies. In fünf Schritten erreichte Isobe das Zwischenprodukt (18), das weiter durch eine intramolekulare Aldolkondensation und einer Trocknung zu Cyclohexenon (19) umgewandelt wurde. Des Weiteren kommt es zu einer Funktionalisierung dieses Cyclohexenon-Rings zu Tetrodotoxin. Eine Reihe von Reduktionen, Schutzreaktionen und die Entfernungen der Schutzgruppe ergab den Alkohol (5) [ISOBE et al., 2003; HUANG, 2004].



(a) K_2CO_3 , *o*-dichlorobenzene (*o*-DCB), 150 °C, 94%; (b) *m*-CPBA, K_2CO_3 , CH_2Cl_2 ; (c) Amberlyst 15, THF/ H_2O , 74% (2 steps); (d) TBAF, THF, H_2O

Abb. 24: Synthese nach Isobe I [HUANG, 2004]

Ein integraler Bestandteil der Synthese von Tetrodotoxin war die stereoselektive Einführung des Guanidin-Stickstoffs auf C8a. Zu diesem Zweck nutzte Isobe eine intramolekular konjugierte Additionsreaktion. Die Behandlung von α, β -ungesättigtem Ester (20) mit zyklischem Carbamat (21) wurde in den nachfolgenden Schritten zum Boc (Butoxycarbonyl [NEUMÜLLER, 2003])-geschütztem Amin (22) hydrolysiert [ISOBE et al., 2003].

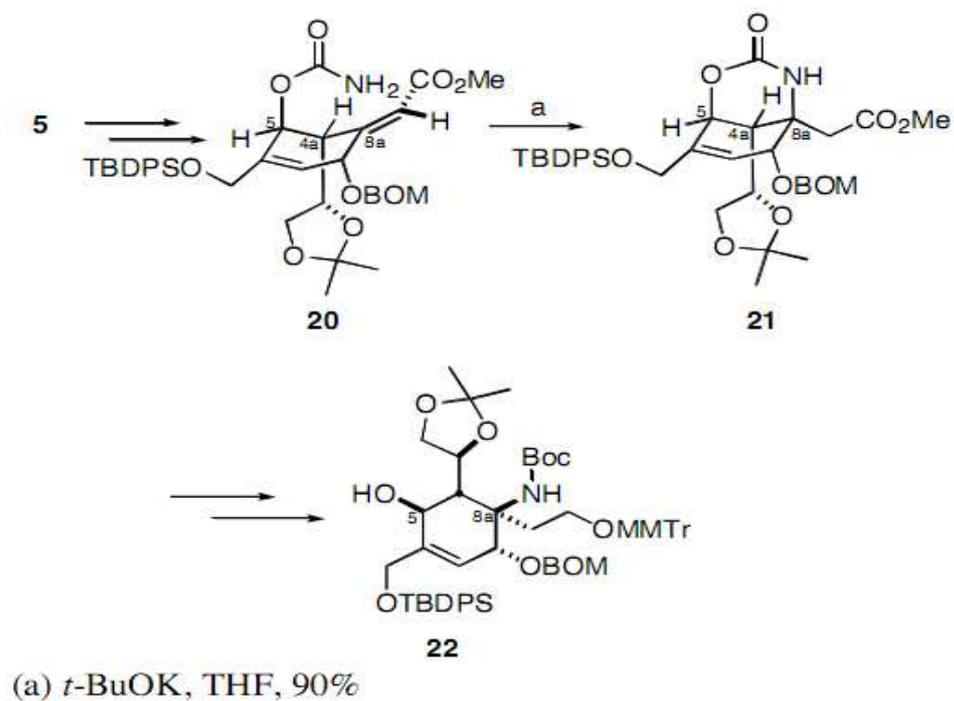
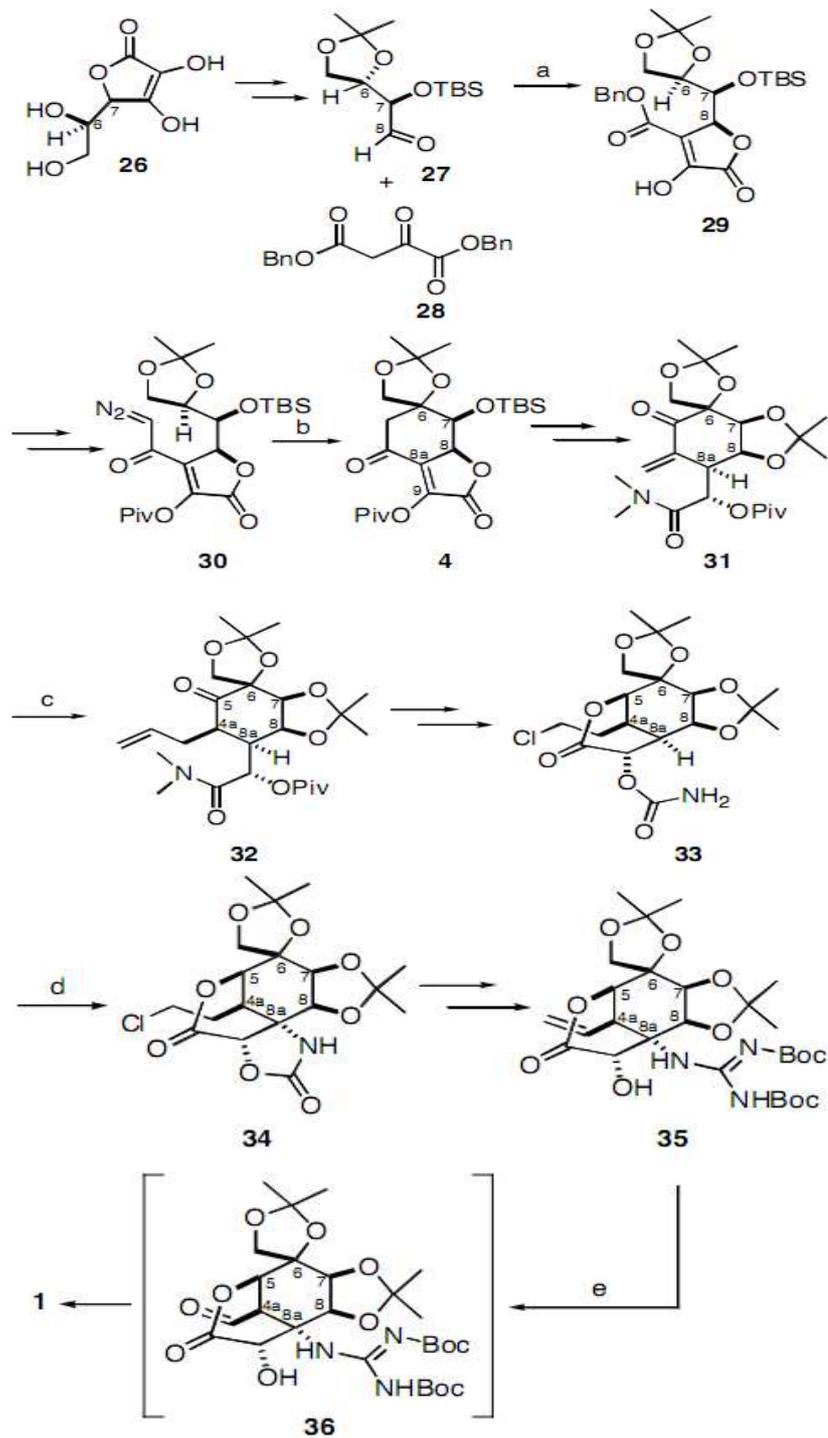


Abb. 25: Synthese nach Isobe II [HUANG, 2004]

Die letzten beiden stereogenen Zentren des Cyclohexan Rings wurden durch eine C5-Alkohol gerichtete Epoxidation von Olefin (22) installiert und später kam es durch die Öffnung des Epoxids durch *Z*-Enolate des Aldehyds (23) zum Produkt (25). Insgesamt umfasste diese Synthese 70 Schritte, ausgehend von 2 - acetoxy-Tri-O-Acetyl-D-Glucal (13) [ISOBE et al., 2003; HUANG, 2004].



(a) NaOAc, THF; (b) 1.5% $\text{Rh}_2(\text{HNCOCPh}_3)_4$, CCl_4 ; (c) $\text{H}_2\text{C}=\text{CHMgBr}$, CuI, THF; (d) 10 mol% $\text{Rh}_2(\text{HNCOCF}_3)_4$, $\text{PhI}(\text{OAc})_2$, MgO, C_6H_6 , 65 °C, 77%; (e) O_3 , CH_2Cl_2 , MeOH; Me_2S ; then aq $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$, 65%

Abb. 27: Synthese nach DuBois [HUANG, 2004]

Im sechsten Schritt dieser Synthese wurden sechs der acht Sauerstoffe von Tetrodotoxin bereits übernommen, was die Notwendigkeit zum Durchführen von Oxidationen in mehreren aufeinander folgenden Stufen verhinderte. Eine wichtige Umwandlung in der Du Bois-Synthese war eine stereospezifische Rh-Carbene C-H Einfügensreaktion von (30) die zum Keton (4) führte. Durch eine Reihe von Reduktionen, Oxidationen und Schutzmaßnahmen erreichte Du Bois das Zwischenprodukt (31), auf dem er eine diastereoselektiv konjugierte Additionsreaktion mit Vinyl-Magnesium-Bromid durchführte, um das Produkt (32) zu erhalten. Eine Lacton Bildung, gefolgt von einigen funktionellen Gruppenmanipulationen, ergab das Zwischenprodukt (33). Die stereospezifische Rh-Nitrene C-H Einfügensreaktion von (33) lieferte eine präzise Methode, um den Stickstoff auf C8a einzubauen und ergab so das gewünschte Stereoisomer (34).

In einem späteren Stadium führte der Einbau von Guanidin zu (35), gefolgt von einer Entfernung der beiden Kohlenwasserstoffe, die zuvor vom Vinyl-Magnesium-Bromid eingeführt wurden (36). Ein Verfahren, das eine Zyklisierung der Guanidin-Substanz, eine Hemiaminal-Bildung und eine Entfernung der Schutzgruppe, um den ortho-Ester zu bilden, mit einschloss, führte zur vollendeten Synthese von (1). Dieser letzte Schritt verfolgte des Weiteren die Strategie, die von Kishi in seiner Synthese von racemischen Tetrodotoxin angewendet wurde. Du Bois erreichte die Totalsynthese von (-)Tetrodotoxin in 32 Schritten und zwar ausgehend von D-Isoascorbinsäure [HINMAN und DU BOIS, 2003; HUANG, 2004].

Schlussendlich ist festzustellen, dass die komplizierte Struktur von Tetrodotoxin zu unterschiedlichen Strategien und Konzepten bei Forschern geführt hatte.

3.2 Toxizität

Saxitoxin

Die Toxizität der PSP-Toxine wird fast immer als STX oder STX-Equivalente ausgedrückt. Die Sulfocarbamoyl-Verbindungen sind deutlich weniger toxisch als die anderen Gruppen der PSP-Toxine, allerdings könnten diese Verbindungen unter sauren Bedingungen zu den giftigen Carbamaten umgewandelt werden. Mäuse reagieren im Vergleich zu Arten wie Fischen, Amphibien, Reptilien und Tieren einer niedrigeren Ordnung sehr empfindlich auf die PSP-Toxine [MONS et al., 1998].

Die unterschiedlichen LD₅₀-Werte bei Mäusen für die verschiedenen Aufnahmen werden in der Tab. 8 gezeigt. Die oralen LD₅₀-Werte für andere Arten als die Maus werden in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 8: Akute Toxizität von STX bei Mäusen [MONS et al., 1998]

Aufnahme	LD ₅₀ in µg/kg Körpergewicht
oral	260 - 263
intravenös	2,4 - 3,4
intraperitoneal	9 - 11,6

Tab. 9: LD₅₀-Werte von PSP-Toxinen verschiedener Spezies [DOUGLAS et al., 2001]

Spezies	LD ₅₀ in µg/kg Körpergewicht
Mensch (oral)	1-10
Mensch	3000-5000 b
Taube	91
Hunde und Hasen	181
Ratten	192

Katzen	254
Mäuse	382
Affen	364-727
Hasen	3-4 a
Taube	91

a intravenöse letale Dosis

b letale orale Dosis als Unfallursache

Die Konzentration, ab welcher PSP-Vergiftungen beim Menschen auftreten, ist sehr unterschiedlich. Diese Variation entsteht vor allem aufgrund individueller Unterschiede in der Empfindlichkeit und Schwankungen in den Bestimmungsmethoden.

Ein oraler Verzehr von 300 µg PSP-Toxin pro Person stellte sich in einigen Fällen als tödlich heraus, während in anderen das Fehlen von giftigen Symptomen nach einer oralen Dosis von 320 µg Toxin pro Person festgestellt wurde. In Alaska war die Aufnahme von PSP-Toxinen für einen Fischer fatal, während zwei andere sich schließlich erholten. Der Mageninhalt der Patienten enthielt 370 µg PSP-Toxin (STX eq) / 100 g Gewebe [MONS et al., 1998]. Andere Quellen berichten über milde Vergiftung bei Dosen zwischen 304 und 4128 µg / Person PSP-Toxine, während schwere Vergiftungen bei Dosen zwischen 576 und 8272 µg / Person auftraten.

Im Jahr 1987 wurde nach dem Verzehr einer Venusmuschelsuppe (*Amphichaena kindermani*) ein PSP-Ausbruch mit 187 Fällen und 26 Todesfällen berichtet. Die meisten Todesfälle betrafen junge Kinder (50 %) im Vergleich dazu lag die Todesrate bei Erwachsenen bei 7%. Einige der Kinder, die starben, nahmen eine geschätzte Dosis von 140-160 MU / kg Körpergewicht ein. Es wurde berichtet, dass die minimal letale Dosis in diesem Vorfall auf etwa 25 µg STX eq / kg Körpergewicht für ein Kind mit einem Gewicht von 25 kg geschätzt wurde, im Vergleich zu den 86-788 µg STX eq/ kg Körpergewicht, die sich für die vier erwachsenen Opfer als tödlich erwiesen hatten [MONS et al., 1998].

Die STX Dosis, ab welcher die ersten Symptome beim Menschen auftreten, beginnt bei 150-1600 μg STX. Der Grenzwert beim Verzehr liegt bei 400 MU (80 $\mu\text{g}/100\text{g}$), jedoch haben manche europäische Länder diesen Level auf 40 $\mu\text{g}/100\text{g}$ reduziert.

Die letale Dosis für Menschen liegt bei 1-4 mg [DOUGLAS et al., 2001].

Die FDA hat ein Limit für die maximale menschliche Toleranz von PSP-Toxinen bekannt gegeben, welches bei 1200 MU/100 g Schalentiere oder 2500 MU/Mahlzeit liegt [DESHPANDE, 2002].

Tetrodotoxin

Der Kugelfisch gilt als sehr giftig, schon weniger als 10 g seines Gewebes sind letal. Als mäßig giftig gilt ein Stoff, wenn 10 bis 100 g letal sind, als schwach giftig, wenn dies bei 100 bis 1000 zutrifft. In Maus Units sind das 20 000, 2000 und 200 MU oder mehr.

Die minimale letale Dosis (MLD) in Maus-Units ist 0,4 $\mu\text{g}/20$ g Maus. Auf dieser Grundlage der MLD für Mäuse entwickelte sich die MLD für Menschen, welche 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (circa 280 μg für einen durchschnittlichen Menschen) beträgt [DESHPANDE, 2002]. LD₅₀-Werte verschiedener Spezies sieht man in der angeführten Tab. 10.

Tab. 10: LD₅₀-Werte von TTX verschiedener Spezies [JOHNSON und SCHANTZ, 2002d]

Spezies	LD₅₀
Maus	10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p. 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.c. 322 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.o.
Hase	4 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Mensch	1-4 mg/kg

3.3 Metabolismus, Transport und Elimination

Der erste Abschnitt nach der Aufnahme, in dem die PSP-Toxine verändert werden, ist im Darm selbst. Magensäure kann kleine Mengen von den weniger toxisch sulfonierten PSP-Toxinen zu wirksameren Verbindungen umbauen. Dies kann sich als wichtig erweisen, wenn sehr große Mengen von diesen sulfonierten Toxinen aufgenommen werden und kritische Mengen von dem hoch toxischen STX oder neoSTX produziert werden. Ist STX einmal im Blut, kehrt es wieder zum physiologischen pH zurück und somit zu einem doppelt angereicherten und hoch toxischen Stadium. Da STX nun wieder ganz polar ist, gibt es wenige Möglichkeiten, über die Blut-Hirn-Schranke zu gelangen, da diese sich am besten als lipophile Substanz durchqueren lässt. Diese Entdeckung wurde bei einer Studie gemacht, bei der kein Toxin das Hirn einer Katze erreichte, obwohl sie 2,7 µg/kg STX erhielt. Seltsamerweise konnte eine höhere Dosis (10 µg/kg) bei der gleichen Studie sehr wohl in das Hirn eindringen. Diese Dosis ist abhängig von der STX-Fähigkeit, in das Hirn einzudringen.

Beobachtungen beim Menschen haben gezeigt, dass Patienten, die eine PSP-Vergiftung 24 h lang überleben, gute Chancen auf eine rasche und vollständige Genesung haben. Solche Beobachtungen deuten darauf hin, dass Toxine, die für PSP verantwortlich sind, sehr rasch ausgeschieden, verstoffwechselt oder beides werden [MONS et al., 1998].

Die PSP-Toxine werden überwiegend mit dem Urin ausgeschieden und nicht mit dem Fäzes. Die Ausscheidung dieser Toxine erfolgt sehr schnell, egal, wie sie aufgenommen wurden. Bei Menschen beträgt die Halbwertszeit nach oraler Aufnahme von toxischen Schalentieren ungefähr 10 h [LIEWELLYN, 2001].

3.4 Wirkung der PSP-Toxine

Die pharmakologische Wirkung der PSP-Toxine ähnelt stark der von TTX. Wegen der fast gleichen Wirkung von STX und TTX wurde davon ausgegangen, dass beide Moleküle auf die gleiche Weise mit dem Rezeptor interagieren. Viel Aufmerksamkeit wurde der Aufklärung des Mechanismus gewidmet, mittels welchem die Blockade des spannungsabhängigen Natriumkanals erreicht wird, da STX und TTX die einzigen

Agenten sind, welche diesen Kanal in einer selektiven Weise und mit hoher Affinität blockieren [VAN EGMOND et al., 2004].

Aufgabe und Funktion eines Ionenkanals

Die Membran einer Zelle hat die Aufgabe, Zellen voneinander und von ihrem Umkreis abzugrenzen und blockiert den ungesteuerten Durchtritt von wasserlöslichen Ionen (geladene Teilchen), wohingegen lipidlösliche Ionen frei passieren können [KOERT, 1997b; SCHMIDT und LANG, 2007]. Durch ihre Phospholipiddoppelschicht ist sie für Ionen überwiegend undurchlässig. Ein regelmäßiger Transport von Ionen durch die Membran kann nur stattfinden, wenn röhrenförmige Öffnungen, sogenannte Ionenkanäle, in die Membran eingebaut sind [KOERT, 2003a].

D.h. Ionenkanäle sind Transmembran-Poren, welche den Durchgang von Ionen in die und aus der Zelle entlang des elektrochemischen Gradienten ermöglichen. Es gibt eine Vielzahl von verschiedenen Ionenkanälen, diese unterscheiden sich durch die Grundlage ihrer Ionen-Selektivität und des Gating-Mechanismus [HESKETH, 2007]. Durch ihre hochselektive Wirkungsweise können sie nicht nur zwischen Kationen und Anionen, sondern auch zwischen ein- und zweiwertigen Ionen unterscheiden [HUCHO und WEISE, 2001]. In der Öffnung wird entschieden, welches Ion (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-) die Membran durchdringen darf und welches nicht. Je höher die Selektivität für eine bestimmte Ionenart, umso geringer ist die Leitfähigkeit der geöffneten Pore für andere Ionen. Ein Natriumkanal lässt nur Natriumionen passieren und ein Kaliumkanal nur Kaliumionen [SCHMIDT und LANG, 2007]. Im Selektivitätsfilter des Ionenkanals muss die Pore eng genug sein, damit Ionen, die den Kanal passieren, den Wänden sehr nahe kommen. So können nur bestimmte Ionen den Kanal passieren. Damit Ionen den Kanal überhaupt durchqueren können, müssen sie ihre Wassermoleküle abstreifen und an die Membran abgeben. Die Kanalwand besitzt des Weiteren auch Sauerstoffmoleküle aus den Polypeptidketten, die den Kanal bilden, diese ziehen Elektronen von anderen Atomen an und werden dadurch negativ. Natrium ist ein positiv geladenes Ion und wird so von den negativ geladenen Sauerstoffmolekülen herangezogen. Die Wassermoleküle, die am Anfang am Ion hängen, werden im Kanal

von den Polypeptidketten nachgebildet und genau deswegen geben die Ionen ohne Weiteres ihre Wassermoleküle ab [BECK, 2004].

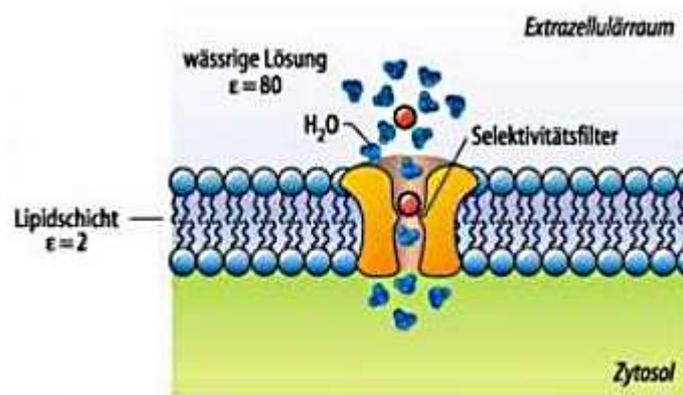


Abb. 28: Selektivitätsfilter eines Ionenkanals [SCHMIDT und LANG, 2007]

Der Transport von Ionen durch einen Kanal erfolgt entlang eines Konzentrationsgefälles und wird als passiver Transport bezeichnet. Da auf beiden Seiten der Zellmembran eine unterschiedliche Konzentration von Ionen vorliegt, wird so ein elektrisches Potential, ein Membranpotential (voltage gating), angelegt, welches neben chemischen Botenstoffen wie Acetylcholin (ligand gating) und mechanisch gesteuerten Einheiten das Öffnen und Schließen der Kanäle ermöglicht [KOERT, 1997b]. Dieser besondere Öffnungs- und Schließmechanismus (Gating-Mechanismus) ermöglicht das freie Hin- und Herschalten und wird von verschiedenen Einheiten gesteuert [SCHMIDT und LANG, 2007]. Ionenkanäle werden deswegen in spannungsabhängige, ligandengesteuerte oder mechanisch gesteuerte Einheiten eingeteilt [HESKETH, 2007].

- **Spannungsabhängige Ionenkanäle:** Spannungsabhängige Kanäle, deren Sensor die transmembranäre Potentialdifferenz registriert, gehen in Abhängigkeit von der Spannung entweder eine offene oder eine geschlossene Konfiguration über. D.h. durch die Veränderung des elektrischen Potentials öffnen sich die Kanäle [RAHAMIMOFF et al. 1994].

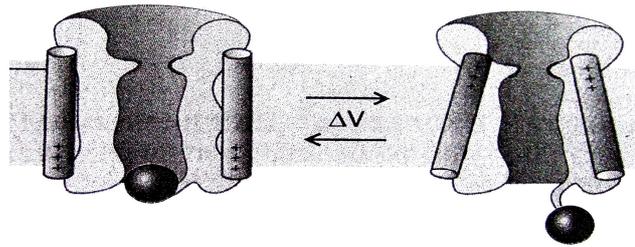


Abb.29: Spannungsabhängiger Ionenkanal [KARSCHIN und GREGER, 2005]

- **Ligandengesteuerte Ionenkanäle:** Ligandengesteuerte Kanäle, in denen der Sensor ein spezifisches Molekül, einen Liganden (z. B. Acetylcholin) bindet (entweder aus der extrazellulären oder der intrazellulären Flüssigkeit), bewirken eine Änderung seiner Konfiguration von offen zu geschlossen oder umgekehrt [RAHAMIMOFF et al. 1994].
- **Mechanisch gesteuerte Ionenkanäle:** Bei diesen Kanälen wird der Gating-Mechanismus durch eine mechanische Verformung der Zellmembran hervorgerufen. D.h. die Kanäle öffnen sich durch Druck und Zug an der Oberfläche der Zelle [RAHAMIMOFF et al. 1994].

Durch diese Steuerungskriterien zusammen mit der Ionen-Selektivität können Ionenkanäle weiter in mehrere Subtypen unterteilt werden: spannungsabhängige Kalium-, Calcium-, Natrium- und Chloridkanäle [HESKETH, 2007].

In dieser Arbeit wird genauer auf die spannungsabhängigen Natriumkanäle eingegangen, welche bei einer PSP- oder TTX-Vergiftung blockiert werden und zu den spezifischen Symptomen führen.

Spannungsabhängige Natriumkanäle

Der spannungsabhängige Natriumkanal ist ein Protein von etwa 250 000 Da, welches die Plasmamembran vieler erregbarer Zellen durchquert. Er zeichnet sich durch eine einheitliche Leitfähigkeit, Membranpotential-Abhängigkeit und Ionen-Selektivität aus [VAN EGMOND et al., 2004].

umgewandelt wird. Erst dann wird die Domäne wieder ins Innere der Zelle gezogen, der kugelige Anhang löst sich und bei der nächsten Depolarisation können die Natriumionen wieder in die Zelle einströmen. Durch diesen Inaktivierungsmechanismus kann gewährleistet werden, dass kurz nach dem Öffnen und dem Natriumeinstrom der Kanal wieder geschlossen wird [FRINGS, 2003].

PSP-Toxine und TTX haben eine hohe Spezifität und Bindungskapazität zu den Na-Kanälen und ihr wichtigstes Ziel ist die Bindung an Kanäle in erregbaren Membranen wie Nerven und Muskeln. Die Toxinmoleküle blockieren die Kanäle, bevor die Na-Ionen eintreten können, d.h. sie verhindern den Natrium-Ionenfluss in den Zellmembranen [DESHPANDE, 2002].

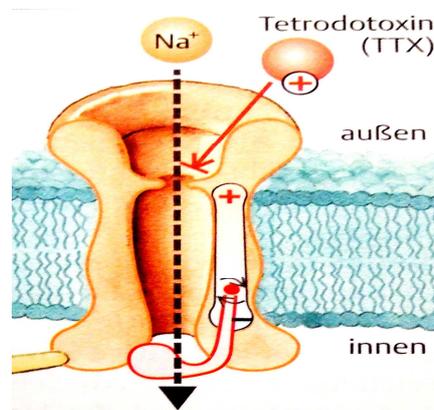


Abb. 31: Verschluss eines Ionenkanals durch TTX [SILBERNAGL und DESPOPOULOS, 2003]

Das bedeutet, dass der anfängliche Anstieg der Natrium-Permeabilität in der Regel im Zusammenhang mit Erregung beeinträchtigt wird, so dass die Ausbreitung des Impulses in Nerven und Muskeln blockiert wird, ohne Depolarisation.

Dadurch wird die Ausbildung von Aktionspotentialen (gelbe Linie in Abb. 32) und die Reizübertragung verlangsamt und verhindert, d.h. die Signalweiterleitung wird unterbrochen (schwarze Linie in Abb. 32) [DESHPANDE, 2002; ROTH, 2007].

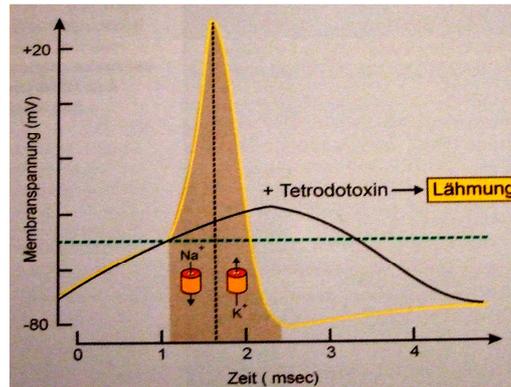


Abb. 32: Veränderungen im Aktionspotential durch TTX [ROTH, 2007]

Dieser grundlegende Mechanismus ist für die typischen gastrointestinalen und neurologischen Symptome verantwortlich [CARVALHO et al., 1998].

Neben den spannungsabhängigen Na⁺-Kanälen finden sich in der Membran auch noch Kalium-Kanäle. Wenn sich diese öffnen, erlauben sie, dass intrazelluläres Kalium den Kanal nach außen passiert und eine daraus resultierende Repolarisation. Der einzige Unterschied zum Na⁺-Kanal ist, dass STX und TTX den K⁺-Kanal unbeeinflusst verlassen.

Es wurde festgestellt, dass die 7,8,9-Guanidin Funktion an der Kanal-Blockade beteiligt ist. Die durchschnittliche Zeit der Blockade des Kanals ist nicht von der Toxin-Konzentration abhängig sondern von der Dissoziation-Geschwindigkeit. Die Lebensdauer eines offenen Kanals ist jedoch reversibel korrelierend mit der Toxin-Konzentration und hängt von der Assoziationskonstante ab [MONS et al., 1998].

3.5 Symptome und Behandlung bei PSP-Vergiftung

Marine Toxine wie STX und TTX, die zu PSP-Vergiftungen führen, gehören zu den akuten Vergiftungen und produzieren sehr ähnliche neurologische, gastrointestinale und kardiovaskuläre Syndrome, welche zu hoher Mortalität und Langzeit-Morbidität führen [FDA, 2007b].

Auswirkungen auf die Atmungsorgane bei Tieren

Wenn eine PSP-Intoxikation eintritt, dann sind die Auswirkungen auf die Atmungsorgane für das tödliche Ende verantwortlich. Die Todesursache ist Erstickung durch fortschreitende Lähmung der Atemmuskulatur. In einer Studie mit Tieren (Katzen, Kaninchen) verursachte eine Dosis von 1-2 µg STX/kg Körpergewicht intravenös verabreicht eine verringerte Atmungs-Aktivität. Als die Dosis auf 4-5 µg STX/kg Körpergewicht gesteigert wurde, trat eine starke Depression der Atmung ein. Durch künstliche Beatmung konnte der Tod vermieden werden. Wenn die Dosis nicht übermäßig hoch ist, wird die Atmung wieder spontan [MONS et al., 1998].

Herz - Kreislauf - Effekte bei Tieren

Bei betäubten Tieren können bereits Dosen von über 1 µg STX/kg Körpergewicht (i. v.) Hypotonie verursachen (Lähmung der Muskeln ist auch schon bei niedrigen Dosen beobachtet worden). Der Herz-Kreislauf-Effekt wurde bei vergifteten Menschen selten beobachtet und ist eher die Spiegelung der peripheren Wirkungen, obwohl das zentrale Nervensystem bis zu einem gewissen Grad beteiligt sein könnte. Über die periphere Auswirkung gibt es keine Gewissheit.

Abgesehen von einer direkten Wirkung auf das Muskelgewebe kann die Möglichkeit einer axonalen Blockade des sympathischen Nervensystems nicht ausgeschlossen werden. Die meisten Forscher sind sich darin einig, dass keine oder kaum direkte kardiale Auswirkungen auftreten [MONS et al., 1998].

Neuromuskuläre Effekte bei Tieren

Eine intravenöse Dosis von 1-2 µg STX führt zu einer schnellen Schwächung der Muskel-Kontraktion.

Die Auswirkungen schließen alle Skelettmuskel-Gewebe mit ein. Diese Dosismenge induziert auch eine Abnahme der Aktionspotential-Amplitude und eine längere

Latenzzeit im peripheren Nervengewebe. Beide, motorische und sensorische Nervenzellen, werden beeinflusst, aber die sensorischen Nervenzellen werden bereits bei niedriger Dosis gehemmt. Durch diesen Einfluss auf das sensorische System werden das Taubheitsgefühl und der Verlust der Eigenempfindung des Körpers erklärt, aber nicht die Parästhesie [MONS et al., 1998].

Wirkungen auf das zentrale Nervensystem bei Tieren

Über die Existenz eines Effekts der PSP-Toxine auf das zentrale Nervensystem herrscht Ungewissheit. Die meisten Symptome lassen sich auf periphere Wirkungen zurückführen. Allerdings können zentrale Effekte nicht ausgeschlossen werden. Beispielsweise berichten Forscher über den Einfluss von STX beim Kniesehnen-Reflex [MONS et al., 1998].

Auswirkung auf den Menschen

Die klinischen Symptome nach einer Vergiftung sind sehr charakteristisch und reichen von Kribbeln oder Taubheit einzelner Körperteile als Resultat einer milden Intoxikation bis, in extremen Fällen, zum Tod durch respiratorische Paralyse [DESHPANDE, 2002]. Eine Vergiftung wird durch unzählige Symptome charakterisiert und ist abhängig von der aufgenommenen Menge des Toxins. Von dieser Menge abhängig, erscheinen die Symptome normalerweise innerhalb von 10 - 45 Minuten nach der Aufnahme, allerdings wurde von manchen Fällen berichtet, die anfangs bis zu 3 - 6 Stunden nach der Aufnahme unsymptomatisch waren [YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001]. Bei einer milden Intoxikation erscheinen die Symptome meist innerhalb von 30 Minuten und entstehen aufgrund der örtlichen Absorption der PSP-Toxine durch die Mundschleimhäute [DE CARVALHO et al., 1998].

Die Symptome bei einer Vergiftung werden in vier wichtige Phasen eingeteilt und basieren auf dem Schweregrad und der Entfaltung der Vergiftung [YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001]:

1. Phase: Orale Parästhesie ist normalerweise das Anfangssymptom und breitet sich weiter schrittweise über das Gesicht und den Hals auf die Gliedmaßen und den Rumpf aus. Andere frühe Symptome beinhalten Geschmacksbeeinträchtigung, Schwindel, Kopfschmerzen, Schwitzen und Pupillenverengung. Diese werden oder werden nicht von gastrointestinalen Symptomen wie vermehrter Speichelfluss, Übelkeit, Erbrechen, Bewegungsdrang, Durchfall und abdominalen Schmerzen begleitet [YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001]. Manchmal wurde bei Opfern auch eine vorübergehende Erblindung beobachtet.

Die meisten Symptome haben einen schnellen Beginn (Stunden), können Tage andauern und verändern sich praktisch in allen Fällen von PSP nicht [MONS et al., 1998].

2. Phase: Diese Phase wird durch zusätzliche neuromuskuläre Symptome wie voranschreitende Parästhesie, Lähmung der Finger bzw. Zehen und Gliedmaßen, Pupillenerweiterung und Hornhautreflex charakterisiert. Atemnot könnte in dieser Phase auch schon auftreten [YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001].

3. Phase: Hier beginnen die neuromuskulären Symptome anzusteigen. Parästhesie im Kehlkopf führt zu Schluckstörung, zudem Störung der Sprachartikulation, Teilnahmslosigkeit, motorische Inkoordination, Bewegungsstörung und Ataxie, Taubheit und schnelle regellose Muskelkontraktionen ohne Bewegungseffekt [DE CARVALHO et al., 1998] [MONS et al., 1998]. Kardiovaskuläre und pulmonale Symptome wie Hypotonie oder seltener Hypertonie, auf die Gefäßnerven bezogene Blockaden, Herzrhythmusstörung einschließlich Sinusbradykardie, Asystole, Tachykardie und Anomalien der Aterioventrikularknoten Leitung. Während dieser Phase können auch Zyanose, Blässe und Atemnot auftreten und sich dermatologische Symptome wie großflächige Schuppung, Bläschen und punktförmige Hautblutung bemerkbar machen [YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001].

4. Phase: Die letzte Phase umfasst Symptome wie Atemstörung, extreme Hypotonie und epileptische Anfälle [YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001]. Diese entstehen durch ausgeprägte Muskelschwäche, weil die sensorischen Nerven dünner werden und sie kürzere Internodien haben als die motorischen Nerven [MONS et al., 1998]. Obwohl einige Patienten eine Beeinträchtigung der mentalen Fähigkeiten aufweisen und sogar komatös werden können, bleiben viele Patienten völlig bei Bewusstsein und wach bis der Tod eintritt. Da dieser normalerweise nach 6 - 24 Stunden eintritt, haben Patienten, die 24 Stunden überleben, eine gute Chance auf Genesung. Andernfalls wird der Tod durch fortschreitende Atemlähmung und ausgeprägte Atmungsschwierigkeiten verursacht [YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001].

Klinische Diagnosetests gibt es für diese Toxine nicht, deswegen basiert die Diagnose auf einer klinischen Präsentation und einem Ernährungsprotokoll in den der Erkrankung vorhergehenden 24 Stunden [SOBEL und PAINTER 2005].

Wenn bei einer Vergiftung kein spontanes Erbrechen eintritt, sollten gezwungenes Erbrechen oder eine Magenspülung angewandt werden, um die noch nicht absorbierte Toxinquelle zu entfernen. Da die PSP-Toxine durch den Magen-pH stark belastet sind, würden sie durch Aktivkohle wirksamer absorbiert werden. Diese Schritte sind bei der Behandlung von Vergiftungen bei Kindern besonders wichtig, da die Schwere der Intoxikation direkt von der Konzentration der Toxine im Körper abhängig ist.

Bei mäßig schweren Vergiftungen ist die Aufrechterhaltung von ausreichender Sauerstoffzufuhr das vorrangige Ziel. Bei unkomplizierten Vergiftungen ist der Atemweg nicht durch übermäßige Absonderung blockiert. Zu Störungen der Sauerstoffzufuhr kommt es aufgrund des unterschiedlichen Grades der Lähmung in respiratorischen Nerven und Muskeln.

Eine klassische konservativ unterstützende Behandlung hat sich bei Vergiftungen bewährt. Wenn der Patient 24 Stunden überlebt, ist die Prognose gut und es kann mit einer vollständigen und schnellen Genesung gerechnet werden. Bei einer niedrigen Dosismenge und ansprechender medizinischer Behandlung sollten selbst neun Stunden für eine angemessene physiologische Verringerung der Giftstoffkonzentration zu einer relativ harmlosen Konzentration reichen, außer in den Fällen, in denen die Toxin-Konzentration außergewöhnlich hoch begann oder bei Opfern mit eingeschränkter

Nierenfunktion. Künstliche Beatmung und Magenspülung sind nach wie vor die einzigen akzeptablen medizinischen Gegenmaßnahmen bei einer STX- oder TTX-Intoxikation. Bei schweren Intoxikationen war die künstlich Beatmung jedoch nicht ausreichend [MONS et al., 1998].

Normalerweise gibt es kein Antidot für STX- und TTX-Toxine und alle Vergiftungsfälle benötigen sofortige medizinische Behandlungen, welche lebensrettende Maßnahmen beinhalten, um das Leben des Opfers zu schützen [SOBEL und PAINTER 2005].

Einige Studien bei Tieren haben jedoch Hinweise ergeben, dass 4-Aminopyridin ein wirksames Antidot bei einer STX-Intoxikation sein könnte.

4-Aminopyridin kehrte deutlich die Atemfrequenz, das Atemzugvolumen und den Blutdruck bei STX vergifteten betäubten Mäusen auf normale Werte um. Des Weiteren verlängerte 4-Aminopyridin nicht nur die Überlebenszeit sondern es sank auch die Sterblichkeit bei Mäusen (von 71 auf 43 Prozent) bei einer normalerweise tödlichen Dosis STX [CHEN et al., 1996].

Bei Meerschweinchen war 4-Aminopyridin in der Lage, das Ausmaß kardiorespiratorischen Gebrechens und andere fast tödliche Auswirkungen von STX und TTX rückgängig zu machen. An dem Punkt, an dem die kardiorespiratorische Leistung sehr stark beeinträchtigt war, wurde 4-Aminopyridin injiziert. Innerhalb weniger Minuten wurden alle STX oder TTX induzierten Symptome wie z. B. Zwerchfell-Blockade, Bradypnoe und Bradykardie wieder auf ein Niveau gebracht und waren nun entweder mit der Kontrolle vergleichbar oder übertrafen diese sogar.

4-Aminopyridin führte bei der Dosismenge zur Wiederherstellung der Atmungsfunktion und der Herz-Kreislauf-Funktion zu keinen Anzeichen von Anfällen und Krämpfen. Obwohl weniger Nebenwirkungen wie kortikale Erregungswirkung und schwankende Perioden der regellosen Skelettmuskelkontraktion festgestellt wurden, waren diese Ereignisse von geringerer Besorgnis im Hinblick auf die bemerkenswerten therapeutischen Effekte [CHANG et al., 1997].

3.6 Nachweis der PSP-Toxine

Allgemein ist zu sagen, dass wegen der potenziellen Gefahr für Mensch und Tier eine schnelle, spezifische und sensitive Methode erforderlich ist, um die Präsenz der PSP-Toxine in Muscheln zu ermitteln. Es wurden im Laufe der Zeit viele Bioassays zum Nachweis von Meerestiervergiftungen entwickelt, doch sind Mausbioassays die am häufigsten angewendeten Techniken, um eine PSP- und DSP-Vergiftung nachzuweisen [FDA, 2007b].

Dieser Test brachte allerdings einige Beeinträchtigungen mit sich, war teuer, unbequem und wurde von Tierschützern als unethisch angesehen. Deswegen mussten alternative Testverfahren für die Erkennung mariner Toxine gefunden werden, wie pharmakologische Tests, Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC), Immunoassay oder alternative Bioassays [VAN EGMOND et al., 2004].

3.6.1 Biologische Techniken und Bioassay-Methoden

Biologische Techniken oder Bioassays messen die Reaktion, welche nach dem Einsatz eines Stimulus auf ein biologisches System folgt. Der verwendete Stimulus wird durch Standard- oder Test-Proben vertreten, die den biologischen Wirkstoff oder Analyten enthalten. Das biologische System, welches den Stimulus empfängt, können ein vielzelliger Organismus wie ein Tier oder eine Pflanze, isolierte Organe oder Gewebe aus vielzelligen Organismen, ganze Zellen oder Mikroorganismen sein.

Der Vorteil von Wirbeltier-Bioassays ist, dass sie, obwohl sie mehr Zeit und Laborfläche beanspruchen, im Bezug auf Aktivierungs- und Entgiftungswege als auch in der Art ihrer giftigen Wirkung näher an Säugetiere herankommen.

Die Reaktion, welche nach dem Einsatz von Toxinen erfolgt, wird als Änderung im biologischen System gemessen und kann eine positive Reaktion im Zusammenhang mit einer erhöhten Aktivität oder eine negative Reaktion, welche hemmend oder sogar tödlich für das biologische System sein kann, bewirken.

Alle Bioassays sind vergleichend und erfordern eine Standard-Vorbereitung, idealerweise aus der gleichen Quelle, mit der jede Probe verglichen werden kann.

Der Einsatz von betriebsinternen Standards führt häufig zu einem Mangel an Korrelationen und ist daher nicht ratsam. Bessere Korrelationen sind durch den Einsatz internationaler Standards für die Kalibrierung von Bioassays erzielt worden.

Diese Standards werden von der WHO festgelegt und basieren auf den Empfehlungen des „Fachausschusses für die biologische Standardisierung“ [DESHPANDE, 2002].

Sobald die Tests abgeschlossen sind, können die Daten auf mehrere verschiedene Arten analysiert werden, um die Beziehung zwischen der Dosis und der Intensität der Reaktion herzustellen.

Die Intensität der biologischen Reaktion ist abhängig von der Steigung der Kurve sowie der relativen Position zu der Abszisse, dies bestimmt die Empfindlichkeit und Nachweisgrenzen des Bioassays. Im Idealfall sollte die Antwort auf einen verwendeten Stimulus ausreichend empfindlich sein, damit man sich eine Differenzierung von kleinen Veränderungen der Dosis erlauben kann.

Bioassays können nur für Substanzen verwendet werden, welche eine biologische Reaktion in lebenden Organismen oder Geweben verursachen.

Diese Einschränkung schließt ihre weit verbreitete Verwendung als allgemeine analytische Technik in mehreren Bereichen aus. Ein weiterer Minuspunkt ist, dass die breite Öffentlichkeit die Verwendung von Tieren oder deren Gewebe in der wissenschaftlichen Forschung zunehmend als unethisch betrachtet. Fortschritte in Zellkultur-Techniken haben die Notwendigkeit für den Einsatz von Tieren in Bioassays minimiert [DESHPANDE, 2002].

3.6.1.1 **Maus-Bioassay**

Zurzeit bildet der Maus-Bioassay noch die Grundlage der meisten Toxizitäts-Überwachungs-Programme bei Muscheln. Das Verfahren wurde vor mehr als einem halben Jahrhundert entwickelt und wurde von der „Association of Official Analytical Chemists“ (AOAC) verfeinert und standardisiert, um eine schnelle und genaue Messung der gesamten PSP-Toxine zu erhalten. Der Maus-Bioassay kann neben den PSP-Toxinen auch zur Identifikation von TTX im Kugelfisch herangezogen werden, da es

die gleiche Wirkungsweise wie Saxitoxin aufweist [VAN EGMOND et al., 2004].

Es wird 1 ml Flüssigkeit von den vermeintlich toxischen Muscheln oder Fischen extrahiert und in Mäuse injiziert. Die Zeit, die das Tier braucht, bis es stirbt, wird festgehalten. Der Todeszeitpunkt bei den Mäusen mit einem Standardgewicht von 18-22 g ist abhängig vom Toxinlevel. Hoch toxische Extrakte werden verdünnt, um zu gewährleisten, dass die Sterblichkeit in 5 -15 Minuten eintritt.

Dann wird die Toxizität der Probe mit Verweis auf die Dosis-Wirkungs-Kurve mit STX-Standards berechnet und in Maus-Einheiten angegeben (MU).

Die Nachweisgrenze des Tests beträgt ca. 40 µg STX/100 g Schalentiergewebe mit einer Genauigkeit von +/- 15-20 % [VAN EGMOND et al., 2004].

MU ist diejenige Menge von STX bzw. TTX, welche eine 20 g schwere männliche Maus in 30 Minuten tötet, demnach ist 1000 MU ausreichend um 50 20 g schwere Mäuse zu töten [DESHPANDE, 2002]. 1 MU entspricht z. B. 220 ng TTX [YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001].

Eine bekannte Beeinträchtigung der Proben entsteht durch den hohen Salzgehalt, welcher die toxischen Effekte unterdrückt. Außerdem weist die Zink-Anreicherung in Austern bei einem bestimmten Niveau eine tödliche Wirkung bei Mäusen auf, stellt aber keine gesundheitliche Gefahr für den Menschen dar. Hoch toxische Extrakte können zu extrem unterschiedlichen Ergebnissen führen.

Die Nachteile dieser Methode sind:

- Eine Kolonie von Mäusen zwischen 19 g und 22 g Gewicht muss aufrechterhalten werden, eine verstärkte Überwachung kann am Mäuseangebot scheitern
- Die Nachweisgrenze des Tests ist stammabhängig
- Der Zeitpunkt des Todes gegenüber dem Toxin-Level ist nicht-linear
- Es ist sehr arbeitsintensiv, den Todeszeitpunkt genau zu bestimmen
- Es ist wird eine große Anzahl an Versuchstieren benötigt, was zu ethischen Bedenken führen kann

Trotz dieser Schwierigkeiten ist der Test auf eine Vielzahl von Muscheln, Krebsen und Fischen anwendbar und ist in den meisten Ländern immer noch die offizielle Methode [VAN EGMOND et al., 2004].

Maus-Bioassays wurden auch in einer Pilotstudie angewendet, um PSP-Toxine in gefriergetrockneten Muscheln festzustellen. Organisiert wurde diese Studie 2003 von „Food Analysis Performance Assessment Scheme“ (FAPAS[®]).

Fünfzehn Laboratorien nahmen an dieser Übung teil, acht davon wendeten Maus-Bioassays an. Die Materialien, die für die Untersuchung gebraucht wurden, wurden aus zertifizierten Referenzmaterialien zusammengestellt, und zwar in der Weise, dass die Stabilität und Homogenität zufriedenstellend waren. Die Ergebnisse dieses Pilotprojekts waren nicht beeindruckend. Die Analyseergebnisse lagen im Bereich von 1 bis 383 µg /100 g (ausgedrückt als Gesamt-PSP-Toxine auf Basis von frischem Gewicht) mit einem Median-Wert von 137 µg /100 g. Eine statistische Auswertung wurde aufgrund der variablen Art der erhaltenen Ergebnisse nicht durchgeführt [EARNSHAW, 2003].

3.6.1.2 **Andere Bioassays**

Es gab viele Versuche, alternative Bioassay-Methoden für PSP Messung und Screening zu entwickeln, einschließlich Versuchen mit Hausfliegen, Hühnerembryos, Salzwassergarnelen, ausgewählte mikrobielle Bioassays und Gewebe-Biosensoren. Die Hausfliegen- und Hühnerembryo-Assays haben bemerkenswerte Einschränkungen im Bezug auf Sensitivität, relativ lange Inkubationsperioden und spezialisierte Techniken gezeigt, welche ihre Verwendung als Alternative zu den Maus-Bioassay unmöglich machten [KITTS, 2001].

Die erste Alternative kam von Davio und Fontelo, sie schlugen einen radioaktiven Verdrängungs-Assay vor, welcher auf der Affinität von Saxitoxin und anderen paralytischen Giftstoffen basiert und um Nervenmembranen konkurriert. Die Proben werden mit titriertem Saxitoxin zusammengemischt und mit einer Suspension Ratten-Gehirn-Membran inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Membran gewaschen

und die Radioaktivität bestimmt. Die Konzentration von PSP-Toxinen in der Probe bei der Flüssigkeitsszintillations-Zählung war umgekehrt proportional zur Radioaktivität. Berichten zufolge ist dieses Assay sehr sensibel (1000-mal mehr als das Maus-Bioassay). Allerdings misst diese Methode nicht die totale Toxizität und es erwies sich auch als Problem Schalentierproben zu finden, die von paralytischen Toxinen ausreichend frei waren, um sie als negative Kontrollen verwenden zu können [DAVIO und FONTELO, 1984].

Ähnliche Solid-Phase, Radiorezeptorbindungs-Assays wurden für die Schätzung der kumulativen PST-Toxizität entwickelt.

Eine gute Übereinstimmung wurde mit Dinoflagellat-Toxinen, in der Einschätzung von Saxitoxin-Äquivalenten über einen weiten Konzentrationsbereich (0,5 μM -0,1 mM) von Saxitoxin, mit dem Maus-Bioassay und HPLC festgestellt. Darüber hinaus korrelierte der Radiorezeptor-Assay auch sehr gut mit den HPLC-Ergebnissen auf PST-kontaminierten Muscheln, Miesmuscheln und Austern über einen Konzentrationsbereich von 40-8000 μg STX/100 g Schalentier [KITTS, 2001].

Eine weitere neue Methode wurde beschrieben, bei der ein Gewebe-Biosensor-Verfahren zur schnellen Messung kleiner Mengen von PSTs entwickelt wurde.

Der Biosensor bestand aus einer Natrium-Elektrode, welche mit einer Froschblasen-Membran abgedeckt war, und maß die Affinität der verschiedenen Muschel-Toxine, die die Natrium-Kanäle blockierten. Die aktive Übertragung von Natrium über eine Froschblase von der internen zur externen Seite der Membran wurde durch eine Natrium-Elektrode innerhalb einer „flow“ Zelle erfasst.

Wie sich der Einfluss der marinen Bedingungen (Salzkonzentration, Temperatur) auf dieses Verfahren auswirkt, ist noch nicht genau erforscht worden [KITTS, 2001].

Diese Methode wurde verwendet, um die Toxizität in kultivierten *Alexandrium tamarensis* Stämmen unter verschiedenen Umweltbedingungen zu prüfen. Es stellte sich heraus, dass das Gewebe-Biosensor-System fähig war, sehr kleine Mengen von PSP-Toxin innerhalb einer einzelnen Planktonzelle zu messen. Allerdings ist für eine Erhöhung der Empfindlichkeit des Systems die Messung von mindestens 100 Zellen wünschenswert. Zum Vergleich: mindestens 6 000 einzelne Zellen müssten geerntet werden, um die Toxinproduktion mit der LC-Methode zu messen [VAN EGMOND et al., 2004].

Kogure et al., entwickelten einen weiteren alternativen Ansatz mit Maus-Neuroblastomzellen. Maus-Neuroblastomzellen schwellen an und lysieren eventuell bei Einwirkung von Veratridin (ein Steroid-Alkaloid aus der Familie der Liliaceae), welches zusammen mit Ouabain (auch genannt g-Strophanthin, ein giftiges Herzglykosid [HUNNIUS und AMMON, 2004]) den Natrium-Ionen-Einstrom erhöht.

In Anwesenheit von STX oder TTX, welche beide die Natrium-Kanäle blockieren, wird die Wirkung der beiden anderen Verbindungen gehemmt und die Zellen bleiben morphologisch normal. In diesem Bioassay ist der Anteil der Zellen gegen den Effekt von Ouabain und Veratridin direkt proportional zu der Konzentration von TTX oder STX und dessen Analoga. Diese neue Methode ist einfach, kostengünstig und empfindlich, kann also durchaus die herkömmliche Maus-Bioassay-Methode ersetzen [KOGURE et al., 1988].

Später veränderten Forscher diesen Bioassay so, dass die Geschwindigkeit und Bequemlichkeit durch Entfernung der Notwendigkeit, einzelne Zellen zu zählen, verbessert wurde, um die STX-Äquivalente zu ermitteln.

Sie haben Mikroplatten-Reader für die automatische Bestimmung der Resorption von Kristallen aus violett gefärbten Neuroblastom-Zellen eingesetzt.

Als diese Änderungen und andere geringfügige technische Änderungen in diesem Gewebekultur-Bioassay systematisch getestet wurden, fand man heraus, dass die untere Nachweisgrenze rund 10 ng STX-Äquivalente pro ml des Extrakts (= 2,0 µg STX eq/100 Schalentierewebe) beträgt.

Diese Version des Gewebekultur-Bioassays war im Vergleich mit der Standard-Maus-Bioassay-Methode, welche 10 Säure-Auszüge aus Dinoflagellaten und 47 Auszüge aus Schalentierewebe braucht, gebrauchsfertig entsprechend dem AOAC Verfahren.

Die Gewebekultur-Bioassay-Ergebnisse sind praktisch identisch mit denen der Maus-Bioassay ($p > 0,96$) und darüber hinaus erheblich sensibler. Die Ergebnisse aus der Flüssigchromatographie (LC) waren weniger einheitlich im Vergleich mit den Ergebnissen aus beiden Bioassay-Methoden.

Im Prinzip könnte der Neuroblastomzell-Assay eine gute Alternative zum Maus-Bioassay sein, um Schalentier- und PSP-Toxine zu testen. Allerdings führten die Verfahren, als sie in einer internationalen AOAC Studie getestet wurden, im Hinblick auf die Ausbeute zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen. Durch eine enttäuschende

Leistung in der Praxis, auch aufgrund von Problemen bei der Lieferung der Studienmaterialien, kam es in den Verfahren zur Bewertung durch das „Methods Committee on Natural Toxins of AOAC International“ zum Abbruch der untersuchten Methode [VAN EGMOND et al., 2004].

3.6.1.3 Makroskopische Methoden

Toxinproduzierende Dinoflagellaten können mit einem Lichtmikroskop überwacht werden und daher im Gegensatz zum Maus-Bioassay ein Frühwarnsystem für bevorstehende giftige Blüten bieten. Dies ermöglicht das Handeln vor einem Befall mit giftigen Algen, indem die gezüchteten Schalentiere früher geerntet oder die Lachsfarmen auf einen anderen Platz verlegt werden.

Die PST-Produktion ist ein stabiles Merkmal in ausgewählten Stämmen von Dinoflagellaten, doch ist ein Training wichtig, um toxische oder nicht toxische Stämme unter dem Lichtmikroskop differenzieren zu können [KITTS, 2001].

3.6.2 Immunologische Methoden

Immunologische Methoden sind für die Überwachung von PSTs vielversprechend und beinhalten Radioimmunoassay (RIA), direkte sowie indirekte ELISA-Assays ("enzyme linked immunosorbent assay") [KITTS, 2001].

Im Gegensatz zum Radioimmunoassay, beruht ELISA nicht auf Radioaktivitätsmessungen sondern auf enzymatischen Farbreaktionen.

Bei der Radioimmunoassay-Methode wird das Nachweisreagenz radioaktiv markiert und die Identifizierung erfolgt durch Messung der radioaktiven Strahlung.

Bei der ELISA-Methode wird die Konzentration von Antigenen und Antikörpern bestimmt. In diesem Fall wird die Eigenschaft der spezifischen Antikörper, an das Antigen (nachzuweisende Substanz) zu binden, ausgenutzt. Das Antigen bindet an eine feste Oberfläche, welche mit einem spezifischen Antikörper belegt ist, und wird konzentriert. Im Anschluss wird ein weiterer Antikörper dazugegeben, der zuvor mit

einem Enzym markiert (z.B. Phosphatase, Peroxidase) wurde. Durch dieses Enzym wird eine Reaktion katalysiert, die als Nachweis für die Anwesenheit des Antigens fungiert. Das heißt, dass dieses Enzym das sogenannte Substrat umsetzt und es zu einem Farbumschlag kommt. Anhand dieses Farbnachweises kann die Konzentration der nachzuweisenden Substanz auch in sehr geringen Mengen erfasst werden [CHEMGAPEDIA, 2008b].

3.6.2.1 ELISA

Eine Methode zur Herstellung von PSP-Assay-Systemen wurde von Chu und Fan beschrieben. Ein STX-Antigen wird mit Rinder-Serum-Albumin angesetzt und in Kaninchen injiziert. Die steigende Anzahl der Antikörper im Kaninchen wird dann gesammelt und lyophilisiert. Im Test-System werden Antigene auf Mikrotiterplatten beschichtet, STX-Standards oder Muschel-Extrakte und geeignete Verdünnungen von Antikörpern werden hinzugefügt und die Menge der gebundenen Antikörper wird mit anti-Rabbit IgG-Peroxidase-Konjugat mit Messung von einem kolorimetrischen Substrat-Assay bestimmt. STX im Muschelextrakt konkurriert mit dem STX-Antigen um die Bindung auf den beschichteten Mikrotiterplatten [CHU und FAN, 1985].

Mit der Zeit wurden dann Handels-ELISA-Test-Kits nur für STX entwickelt. Diese sind jedoch nicht ganz spezifisch für STX und einige Reaktionen werden von Decarbamoyl-STX (dcSTX) und neoSTX induziert [VAN EGMOND et al., 2004].

Enzym-Immunoassays werden nicht nur für die Analyse von PSP-Toxinen herangezogen, sondern auch für die Analyse von TTX. Dadurch, dass diese Methoden schnell und auch höchst sensibel auf TTX-Konzentrationen niedriger als 2-100 ng/ml reagieren, werden sie oft eingesetzt. Bei der TTX-Analyse wird das Antigen ebenfalls mit Rinder-Serum-Albumin zur Erhöhung der Sensitivität und Spezifität für dieses Toxin angesetzt. Die Ergebnisse werden nach einer 60 minütigen Vorbereitung in 30 Minuten geliefert [YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001].

Die Meinungen der Wissenschaftler über die ELISA-Testmethode gingen weit auseinander. Chu et al. verglichen drei verschiedene direkt kompetitive ELISAs für die Analyse einer großen Anzahl von kontaminierten Muscheln miteinander und kamen zu dem Schluss, dass es Übereinstimmungen zwischen den ELISA-Daten und den Maus-Bioassay Ergebnissen gab [CHU et al., 1996].

Kasuga et al. haben jedoch den Schluss gezogen, dass Maus-Bioassays zum Screening von Schalentierproben nicht durch ELISA ersetzt werden können, da unberechenbare Kreuz-Reaktionen auftreten könnten. Ebenso kommt es zur Unterschätzung der Toxizität von einigen natürlich kontaminierten Schalentierproben, die im Meer in der Nähe von Japan geerntet wurden [KASUGA et al., 1996].

Von Garthwaite et al. wurde dann ein Jahr später ein integriertes ELISA-Screening-System für ASP, NSP, PSP und DSP-Toxine (einschließlich Yessotoxin) entwickelt, welches die verdächtigen Schalentierproben erkennt. Diese verdächtigen Proben werden mit verschiedenen Methoden, die von internationalen regulatorischen Behörden anerkannt wurden, analysiert. Durch Alkohol-Extraktion konnten alle Toxin-Gruppen wieder gut hergestellt werden [GARTHWAITE et al., 2001].

Kawatsu et al. entwickelten einen direkten kompetitiven Enzym-Immunoassay auf der Grundlage eines Gonyautoxin2 / 3 (GNTX2 / 3)-spezifischen monoklonalen Antikörpers und eines Saxitoxin-Meerrettich Peroxidase-Konjugats. GNTX2 / 3, DC-GNTX2 / 3, C1 / 2, GNTX1 / 4, STX und neoSTX wurden in niedrigeren Konzentrationen als die rechtliche Beschränkung von 80 µg/100 Schalentiergewebe nachgewiesen [KAWATSU et al., 2002].

Mehrere Publikationen erschienen kürzlich über die Anwendung von ELISA zur Analyse von Schalentieren auf PSP-Toxine. Angesichts der Präsenz von Kreuzreaktionen mit geringerer Bindungs-Spezifität und dem möglichen Mangel an Reaktionen auf andere Gifte als STX innerhalb der PSP-Gruppe, sind die praktischen Anwendungen dieser Tests wahrscheinlich nach wie vor begrenzt, es sei denn, es können Eigenschaften in formalen Studien nach AOAC International oder ISO-Verfahren nachgewiesen werden. Solche Studien wurden noch nicht veröffentlicht [VAN EGMOND et al., 2004].

3.6.3 Physikalische und chemische Methoden

Die klassischen biochemischen Verfahren wie Spektrophotometrie, Gaschromatographie (GC), Massenspektrometrie (MS), Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), Papier- und Dünnschicht-Chromatographie (PC und TLC) und Elektrophorese gekoppelt mit Ultraviolett (UV) und Fluoreszenz-Nachweismethoden sind häufig für die Identifizierung und Quantifizierung von biologisch wichtigen Verbindungen herangezogen worden.

Diese grundlegenden Analyse-Tools nutzen die physikalischen und/ oder chemischen Eigenschaften der Verbindungen. Die wichtigsten Beschränkungen, die diese Techniken beinhalten, sind die Kosten für Ausrüstung, Verbrauchsmaterialien und Probendurchsatz, weiters ist für die Analyse auch ein bestimmter Grad an Erfahrung und Geschick erforderlich. Darüber hinaus sind diese Methoden oft langwierig und mühsam und erfordern eine aufwendige Probensäuberung und Konzentrations-Verfahren. Die Grundprinzipien dieser Techniken werden nun kurz beschrieben [DESHPANDE, 2002].

3.6.3.1 Fluorometrische Techniken

Ein chemisches Vorgehen bei der Überwachung von PSTs in Schalentieren entstand durch die Entwicklung einer fluorometrischen Methode. Diese Methode ist auch die Grundlage für mehrere spätere chemische Analysen, einschließlich der Dünnschicht-Chromatographie, Niederdruck-Flüssigkeitssäule und HPLC-Techniken.

Die fluorometrische Methode verwendet zur Herstellung eines fluoreszierenden Derivates von Saxitoxin 8-Amino-6-Hydroxymethyl-2-Iminopurine-3(2H)-Propionsäure, eine Oxidationsstufe mit Wasserstoffperoxid unter alkalischen Bedingungen. Obwohl die Trennung von Toxinen auf einem schwachen Kationenaustauschmaterial, und zwar Harz eluiert mit Schwefelsäure, basiert, besteht eine wichtige Einschränkung dieser Methode darin, dass nur Saxitoxin gemessen wird. Auch wenn einige Arbeitnehmer Erfolg mit der Methode hatten, kann der Toxingehalt aufgrund der Ergebnisse um bis zu 65% im Vergleich zum Maus-Bioassay unterschätzt

werden [KITTS, 2001].

Der Grund, warum die Toxizität unterschätzt wird, ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass andere PSTs, die weniger aus der schwachen Ionenaustausch-Säule eluiert werden, aufgrund der hohen polaren Natur nur über begrenzte Fluoreszenz verfügen. Außerdem wird nur Saxitoxin zum bekannten Standard hin gemessen.

Zum Beispiel sind die Carbamat- und Sulfocarbamoyl-PSTs in einigen Muscheln zwei der am meisten dominierenden Isomer-Quellen, allerdings haben die Carbamat-Toxine eine stärker toxische Wirkung und die Sulfocarbamoyl-Toxine sind die am wenigsten toxischen. Eine Unterschätzung der PSTs tritt auf, wenn andere PSTs als Saxitoxin in Proben vorhanden sind, welche eine spezifische Toxizität belegen.

Die N-1 Hydroxy-Toxine, welche Neosaxitoxin, GTX-1 und GTX-4 beinhalten, haben eine niedrigere Fluoreszenz, jedoch zeigen sie eine hohe spezifische Toxizität an.

Andere Methoden, zum Beispiel Dünnschichtchromatographie, Kapillarelektrophorese und HPLC, basieren auf den Messungen der Fluoreszenz [KITTS, 2001].

3.6.3.2 Chromatographische Techniken mit Detektor

Chromatographie umfasst eine Vielzahl von Techniken, welche gelöste Substanzen während der Passage durch ein poröses Medium durch Differentialmigration auftrennen. In diesen Prozessen werden verschiedene gelöste Komponenten infolge der Differentialaffinität der Komponenten für eine stationäre Phase (fest oder flüssig) oder eine mobile Phase (gasförmig oder flüssig) getrennt.

Die Hauptphänomene, welche für diese Affinität der stationären Phase verantwortlich sind, sind Adsorption, Ionenaustausch, Affinität und die Lösung in einem stationären Lösungsmittel oder einer Matrix. Alle Formen der Chromatographie enthalten mindestens eines dieser Phänomene. Tatsächlich arbeiten in der Regel im Laufe der Anwendung von Chromatographie-Verfahren zwei oder mehrere dieser Phänomene gleichzeitig [DESHPANDE, 2002].

Hochdruckleistungschromatographie (HPLC)

Die HPLC Methode bietet die Möglichkeit zur Ermittlung der in der Probe vorhandenen individuellen PST-Isomere und ist empfindlicher als der Maus-Bioassay. HPLC Verfahren vertreten sensible und präzise Techniken, die für den Umgang mit einer großen Zahl von Proben für die routinemäßige Überwachung geeignet sind [KITTS, 2001].

Die HPLC-Techniken basieren auf der Flüssigchromatographie (LC) und sind die am weitesten verbreiteten nicht Bioassay-Methoden für die Bestimmung von PSP-Verbindungen [VAN EGMOND et al., 2004]. Je nachdem, wie sich die Art der Wechselwirkung zwischen stationärer Phase, mobiler Phase und Substanzgemisch äußert, unterscheidet man in der Flüssigkeitschromatographie folgende Trennmechanismen: Adsorptions-, Umkehrphasen-, Verteilungs-, Ionenaustausch-, Ausschluss- und Affinitätschromatographie [MEYER, 2004].

Der grundlegende Aufbau eines HPLC-Gerätes besteht aus einem Lösungsmittel-Reservoir mit mobiler Phase (1), einer Zuleitung (2), einer Hochdruck-Pumpe (3), einem Einspritzsystem (4), einer Säule (5), einem Detektor (6), Abfall (7) und einer Datenerfassung und -verarbeitung (8) [MEYER, 2004].

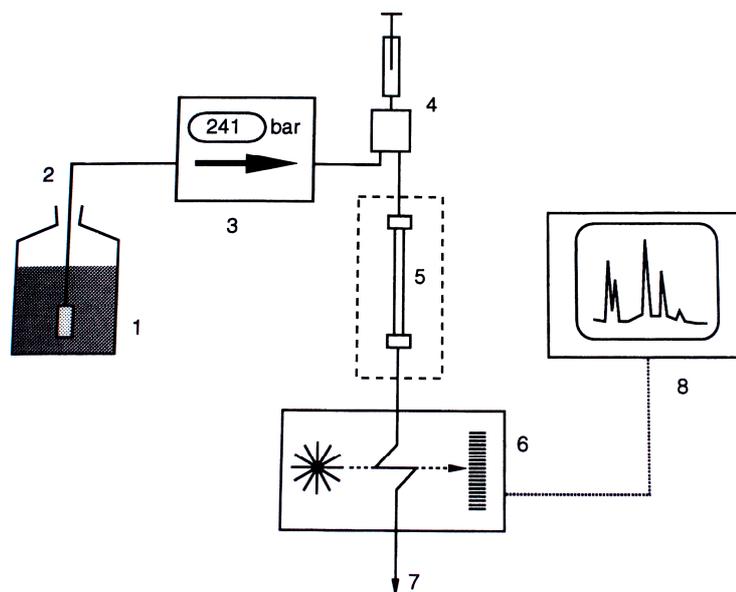


Abb. 33: Darstellung einer HPLC-Apparatur [MEYER, 2004]

Das Prinzip des Ablaufs der HPLC ist sehr ähnlich der GC, abgesehen davon, dass die mobile Phase eine Flüssigkeit anstelle eines Gases ist [DESHPANDE, 2002].

Die HPLC basiert in der Regel auf der Trennung von Toxinen, bei welcher eine Substanz zwischen zwei Phasen, der mobilen Phase (= strömende Phase) und der stationären Phase (= ruhende Phase) in einer Säule verteilt wird. Das heißt, die stationäre Phase ruht in der Säule und die mobile Phase strömt an ihr vorbei [MEYER, 2004]. Das zu trennende Probengemisch wird mit dem Injektor in die Trennsäule injiziert. Anschließend wird der Eluent (= mobile Phase) mit hohem Druck durch die Säule gepumpt, in der sich die stationäre Phase befindet.

Wegen der Wechselwirkungen zwischen der Probe, durch die verschiedenen Trennmechanismen, der stationären Phase und der mobilen Phase werden die verschiedenen Komponenten des Probengemisches unterschiedlich schnell weitertransportiert und so voneinander getrennt. Das bedeutet, dass die Moleküle entweder mit der strömenden mobilen Phase mitgenommen werden oder an der ruhenden stationären Phase hängen bleiben [ZUERN et al. 2008]

Grundsätzlich werden bei der HPLC zwei Arten von Trennungen unterschieden:

- 1.) Normal Phase Chromatographie (NP)
- 2.) Reversed Phase Chromatographie (RP)

Bei der NP-Chromatographie wird in der stationären Phase ein polares Material wie z.B. Silikagel oder Kieselgel verwendet und als mobile Phase ein unpolares Lösungsmittel wie Hexan oder Ether. Bei dieser Trennung eluiert ein unpolares Lösungsmittel langsamer als ein polares. Grundsätzlich kann gesagt werden, dass bei der NP-Chromatographie die polaren Substanzen später eluiert werden als die unpolaren.

Bei der RP-Chromatographie ist es genau umgekehrt. Hier wird als stationäre Phase ein unpolares Material verwendet und in der mobilen Phase ein polares Lösungsmittel wie Wasser oder Alkohol. Bei der Trennung eluiert ein polares Lösungsmittel (z.B. Wasser) langsamer als ein weniger polares (z.B. Acetonitril). Hier kann grundsätzlich gesagt werden, dass unpolare Substanzen später eluiert werden als polare. [MEYER, 2004].

Nach der Auftrennung der Substanzen werden diese mit der mobilen Phase in den spezifischen Detektor transportiert und vom Schreiber als Glockenkurve (=Gaußkurve) dargestellt. Die so entstehenden Kurven nennt man Peaks und alle zusammen ergeben ein Chromatogramm. Durch die unterschiedlichen Retentionszeiten der Substanzen im Gemisch können die Stoffe getrennt werden. Die Retentionszeit t_R ist diejenige Zeit, die vom Einspritzen der Probe bis zum Erscheinen eines Peaks vergeht [MEYER, 2004].

Die meisten Trennsäulen verwenden fein gegliederte Partikel mit einem Durchmesser von 3-10 μm , einige haben gebundene Phasen und andere verwenden Tonerde oder Kieselsäure. Die Säulen sind normalerweise 5-30 cm lang mit kleinen Durchmessern (ungefähr 2-5 mm Innendurchmesser) [MEYER, 2004] [DESHPANDE, 2002].

In der Praxis hatte die HPLC-Methode von Sullivan Schwierigkeiten bei der Trennung von STX und dcSTX gezeigt und wurde daher in den meisten europäischen Laboratorien nicht mehr für die PSP-Analyse verwendet.

Obwohl dieser LC-Ansatz eine interessante Entwicklung war, erforderte das System einen zu hohen Aufwand von Zeit und Geschick, um es routinemäßig zu verwenden. Außerdem war die LC-Technik nicht frei von Problemen [SULLIVAN, 1988].

Ein paar Jahre später wurde auch von anderen Forschern berichtet, dass die LC-Technik nicht ausreichend schnell und stabil war, um während der Algenblüte eine große Zahl von Proben zu bewältigen.

Für eine genaue Quantifizierung ist es unerlässlich, das System kontinuierlich mit PSP-Toxin-Standards zu kalibrieren. Früher war nur ein STX-Standard im Handel erhältlich und eine genaue Schätzung der Beträge der anderen PSP-Toxine in der Mischung war unmöglich. Im Jahr 2003 wurden zertifizierte Standards für STX, neoSTX, GNTX 1-4, GNTX 2 / 3 und 5 im Handel erhältlich und ihre Verfügbarkeit verbesserte wesentlich die Qualität der Daten der LC-Methode.

Große Vorsicht ist beim Wechsel von einem auf einen anderen Standard geboten, da eine Diskontinuität der Daten auftreten könnte. Es wurden bei STX-Konzentrationen von drei verschiedenen Lieferanten Konzentrationsunterschiede bis zu 20% festgestellt [VAN EGMOND et al., 2004].

In einer Pilotstudie, die 2003 vom „Food Analysis Performance Assessment Scheme“ (FAPAS) organisiert wurde, wurden neben Maus-Bioassays auch LC-Methoden zur Erfassung von PSP-Toxinen in gefriergetrockneten Muscheln eingesetzt.

Fünfzehn Laboratorien nahmen an dieser Studie teil und sieben von ihnen wendeten die LC-Methode an. Praktisch alle Laboratorien analysiert das Testmaterial für STX und dcSTX, einige bestimmten auch die Höhe von neoSTX, GNTX1 / 4, GNTX2 / 3, GNTX5, GNTX6, C1 / 2 und C3 / 4. Die Ergebnisse für STX reichten von nicht nachweisbar bis 83 µg /100 g (auf frischer Gewichts-Basis), jene für dcSTX reichte von 25 bis 130 µg/100 g. Das Testmaterial enthielt tatsächlich <3,5 µg /100 g STX und ~ 80 µg/100 g dcSTX.

Eine Analyse der technischen Verfahren zeigte, dass Laboratorien, welche positive Werte für STX fanden, alle siedendes HCl in der Extraktionsphase verwendeten.

Im Gegensatz dazu fanden Laboratorien, welche nicht siedende Essigsäure in der Extraktionsphase verwendeten, kaum oder gar kein Saxitoxin.

Der Grund hierfür war, dass die Extraktion mit siedendem HCl teilweise zur Hydrolyse von bestimmten PSP-Toxinen führte und eine Umwandlung von einigen PSP-Toxinen in giftigere Analoga (z. B. GNTX5 wird in STX) zur Folge hatte.

Das Extraktionsverfahren ohne siedende Essigsäure ist ein milderes Verfahren, welches das Toxin-Profil der Probe praktisch intakt lässt.

Die Probe, die in der FAPAS-Studie verwendet wurde, enthielt kein STX, aber GNTX5. Das Bewusstsein für dieses Phänomen und die Standardisierung der Methodik mag dieses Problem weitgehend lösen und kann zu einer besseren Übereinstimmung der analytischen Ergebnisse führen [EARNSHAW, 2003].

Anders als bei der STX-Bestimmung erfolgt die Analyse von TTX mit Umkehrphasen-HPLC auf einer YMC-Pack AM-314 Säule (6 mm Innendurchmesser x 300 mm) mit zwei konstanten Pumpen für das Elutionsmittel und Reagens und einer Reaktions-Spule (Teflon-Rohr, 3 mm Innendurchmesser x 10 mm). Die Säule wird mit einer Mischung aus 2 mM Natrium 1-Heptanesulfonsäure und 1% Methanol 0,05 M Kaliumphosphat Puffer (pH 7) mit einem Durchsatz von 1 ml/ min gefüllt.

Das Eluat wird mit einem Volumen in Höhe von 3 N NaOH gemischt und in einer Reaktions-Spule auf 100°C erhitzt. Die Intensität der Fluoreszenz wird bei 505 nm mit

einer Erregung von 380 nm gemessen. Die Retentionszeit von TTX wird durch die Verwendung einer authentischen TTX-Lösung in verdünnter Essigsäure (15 µg TTX/ml) ermittelt. Eine Kalibrierungskurve des Toxins wird aus der Dosis-Beziehung zwischen TTX in Konzentrationen von 0,1-1 µg/10 µl und seiner resultierenden Fluoreszenz-Intensität (Peakfläche) hergeleitet. Aus dieser Kurve kann TTX in unbekanntem Proben bestimmt werden. Ein Beispiel für eine solche Kurve wird in Abb. 34 gezeigt. In diesem Fall können mehr als 0,03 µg TTX/10 µl erfasst werden [YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001].

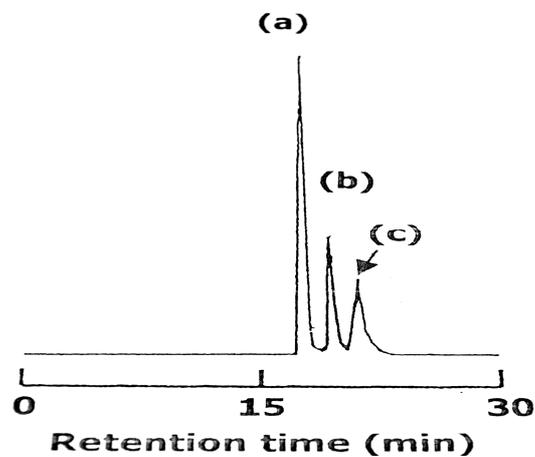


Abb. 34: HPLC-Chromatogramm von TTX: (a) TTX, (b) 4-*epi*TTX, (c) anhydroTTX [YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001].

Die wichtigsten Detektoren, die für die HPLC verwendet werden, sind UV-Fluoreszenz Spektrophotometer und Differential-Refraktometer [DESHPANDE, 2002]. In dieser Arbeit wird genauer auf die Massenspektrometrie eingegangen.

Massenspektrometrie (MS)

Das Massenspektrometer ist wohl das bedeutendste Instrument für die Identifizierung von Verbindungen. In toxischen Analysen wird die Massenspektrometrie zunehmend mit der HPLC verwendet [DESHPANDE, 2002].

Die Anwendung der Massenspektrometrie im Bereich der marinen Biotoxine wurde

während der letzten zwei Jahrzehnte nicht nur durch die Entwicklung der LC-MS-Kopplung, sondern auch durch die Integration von Trennung, Erkennung und Computer-Technologien gefördert. Der Schlüssel für das Wachstum und den Erfolg von LC-MS (einschließlich der LC-Tandem-MS) liegt in der Macht der Information, Zuverlässigkeit, Erschwinglichkeit und Verfügbarkeit von kommerziellen Systemen.

Bereits in den späten 1980er Jahren wurde über die Bestimmung von STX durch LC-MS-Anwendung mit Ionen-Spray-Ionisation als Technik berichtet [VAN EGMOND et al., 2004].

Bei der Einzel-Ionen-Aufnahme (SIM-Modus) und der Fokussierung auf positive Ionen wurde eine Konzentrationsnachweisgrenze von 0,1 μM (1 μL Injektion) aus der Fließinjektionsanalyse geschätzt, das ist etwa fünf Mal empfindlicher als die AOAC Maus-Bioassay. Die Nachweisgrenze für STX bei der Elektrospray-Ionisation ist ähnlich zur Ionenspray-Ionisation, wenn die Fließinjektionsanalyse angewendet wird. Im PST-Spektrum zwischen der Ionenspray- und der Elektrospray-Methode ist jedoch ein sehr kleiner Unterschied [KITTS, 2001] zu erkennen.

Pleasance et al. [1992] berichteten des Weiteren über die Analyse der PSP-Toxine durch Anwendung von LC-MS und CE-MS. LC-MS (SIM-Karte und vollständigen Scan-MS1Modus) wurde für die Überwachung der STX-Reinigung aus isolierten Dinoflagellat-Zellen eingesetzt.

Darüber hinaus wurde die Tandem-Massenspektrometrie (MS-MS) verwendet, um strukturelle Informationen zu erhalten. Mit dieser Technik war es möglich, 10 pg (Pikogramm), welche injiziert wurden, zu erkennen, dies entspricht einer Konzentration von 0,03 μM . Die Verbesserung wurde durch eine Änderung der mobilen Phase in Kombination mit einem reduzierten Volumenstrom erreicht. Obwohl das Bild gut aussah, fehlten Werte für die Linearität und für die Indikatoren der Reproduzierbarkeit. Die Anwendbarkeit einer Fließinjektionsanalyse (FIA) für die Bestimmung von PSP-Toxinen in komplexeren marinen Extrakten wurde mit schwerwiegenden Einschränkungen bewertet [PLEASANCE, 1992].

Jaime et al. erwähnten eine PSP-Quantifizierungs-Methode mit einer Verknüpfung von Ionenaustausch-Chromatographie mit Elektrospray-Ionisierung (ESI)-Massenspektrometrie. Die chromatographische Trennung wurde mit Gradientenelution durchgeführt und die Messungen wurden im SIM-Modus ausgewertet. Der Schwerpunkt lag auf der

Nachweisgrenze und Linearität. Die Nachweisgrenze für die einzelnen PSP-Toxine war vergleichbar mit denen, die durch andere Methoden auf der Grundlage von Ionenpaarchromatographie mit chemischen Oxidation und Fluoreszenzdetektion analysiert wurden und gut geeignet für die Bestimmung von PSP-Toxinen in biologischen Materialien (Regulierungs-Grenzwert für Muscheln und Schalentieren: 800 µg PSP / kg). Linearität wurde durch einen guten Korrelationskoeffizienten ($> 0,99$) nachgewiesen [JAIME et al., 2001].

Bei der Erfassung von TTX konnte das Massenspektrum direkt durch schnellen Atombeschuss, also Sekundärionen-Massenspektrometrie (FAB-SIM), gemessen werden. Für diese Technik wurde ungefähr 0,1 mg TTX und Glycerin als Matrix auf die Probestufe eines Massenspektrometers platziert, gut gemischt und in die Ionen-Kammer des Spektrometers (FAB) eingebracht. Sowohl positive als auch negative Massespektren von TTX wurden dann gemessen.

Wie in Abb. 35 gezeigt wird, weist TTX $(M + H)^+$ und $(M + H - H_2O)^+$ Ionen-Peaks bei m/z 320 und m/z 302 im positiven Massespektrum auf und einen $(M - H)^-$ Peak bei m/z 318 im negativen Spektrum. Diese Technik kann zur Identifizierung reiner Proben aus der TTX Massenzahl 319 verwendet werden [YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001].

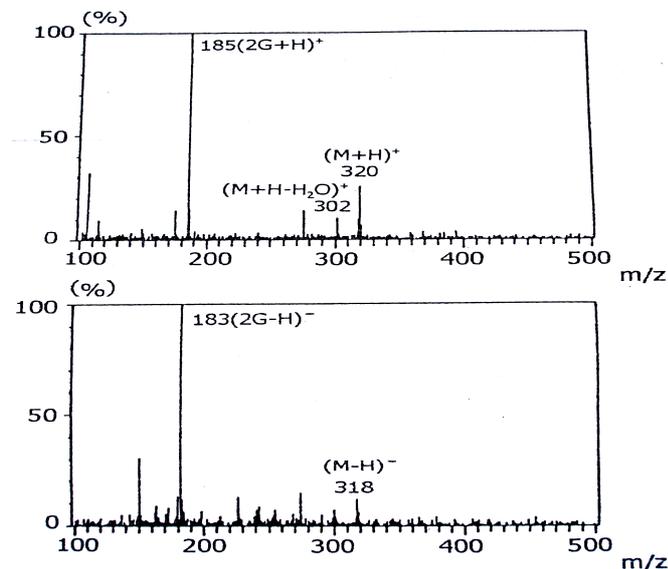


Abb. 35: Positives und negatives Sekundärionen-Massenspektrometrum von TTX
[YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001]

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass im Bereich der PSP-Toxin-Analyse die LC-MS-Analyse in erster Linie qualitative Aspekte betrifft und die konventionelle Anwendung von MS reflektiert, obwohl Tandem-Instrumente verwendet werden [VAN EGMOND et al., 2004].

Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Die Gaschromatographie-Massenspektrometrie wird zur Erkennung von TTX in kontaminierten oder stark verdünnten Proben empfohlen, die schwer zu reinigen sind. Bei dieser Art von Analyse werden TTX und seine Derivate mit einer Alkali-Hydrolyse zu 2-Amino-6-Hydroxy-Methyl-8-Hydroxychinazolin (C_9) zerlegt und dann mit Trimethylsilan (TMS) zu TMS-Derivaten umgewandelt. Diese Derivate werden wie folgt in die GC-MS-Analyse eingeführt: Ein 10 ml Kolben, welcher 0,2 ml TTX-Lösung (25 MU, entspricht etwa 5 μ g TTX) und 0,2 ml 1,5 N NaOH enthält, wird auf 80°C - 90°C für 30 Minuten beheizt, um eine C_9 Basis aus dem Toxin zu erzielen.

Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Reaktionsmischung mit 10% HCl auf pH 3-5 eingestellt und dreimal mit 0,5 ml 1-Butanol extrahiert. Die C_9 Base im Rückstand wird zu TMS-Derivat in Anwesenheit von N,O-bis (Trimethylsilyl) Acetamid, Trimethylchlorsilan und Pyridin (2:1:1) umgewandelt.

Jedes Beispiel von GC-MS mit selektivem Ionen-Monitoring (selected ion monitoring; SIM) (m/z 407, m/z 392, m/z 376) und die daraus resultierenden Massenspektren sind abgebildet in Abb. 36. Jeder Peak des SIM (m/z 407, m/z 392, m/z 376), welcher typisch für diese C_9 Base ist, erscheint in einer Retentionszeit von 14 Minuten und wird mit Spektrometrie bewiesen [YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001].

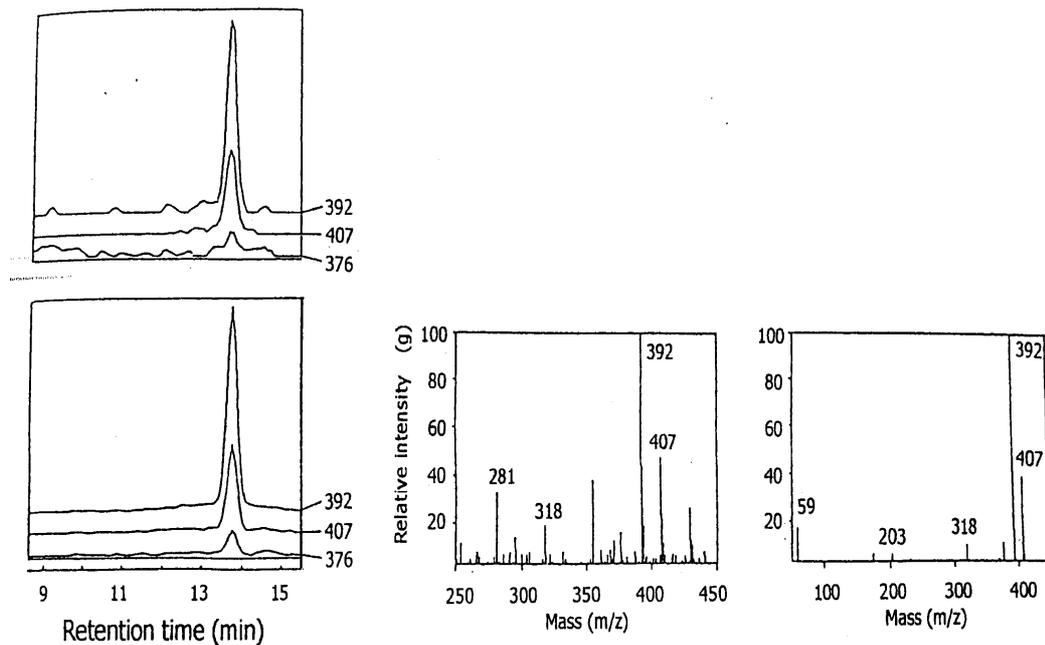


Abb. 36: GC-MS von einer TTX-Fraktion aus einer *Vibrio*-Gruppe
[YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001]

Dünnschichtchromatographie (TLC)

Die TLC-Technik wird auf einer 5 cm x 20 cm beschichteten Kieselgel-Platte (Merck) mit einem Lösungsmittelsystem von Pyridin : Ethyl-Acetat : Essigsäure : Wasser (75:25:15:30), 3-Butanol : Essigsäure : Wasser (2:1:1) oder 1-Butanol : Essigsäure : Wasser (60:15:25) durchgeführt. TTX wird mit dem Weber-Reagenz als rosa Fleck oder nach Besprühen mit 10% KOH gefolgt von einer Erhitzung bei 100°C für 10 Minuten, unter einer UV-Lampe (365 nm) als gelb fluoreszierender Fleck sichtbar. Die RF-Werte von TTX sind 0,7 bei Pyridin : Ethyl-Acetat : Essigsäure : Wasser, 0,45 bei 3-Butanol : Essigsäure : Wasser und 0,21 bei 1-Butanol : Essigsäure : Wasser als Lösungsmittelsystem.

Die TLC-MS-Methode ist eine vielversprechende Nachweismethode für TTX. Für TLC-MS wird eine Hochleistungs-Platte und als Lösungsmittel Pyridin : Ethyl-Acetat : Essigsäure : Wasser (15:5:3:4) verwendet.

Für die Massenspektrometrie wird ein FAB-MS-Gerät, genauer ein JOEL DX-303

Massen-Spektrometer mit einem JOEL DA-5000-Daten-System benutzt. Ein Beispiel für die Analyse von TTX und AnhydroTTX mit diesem System ist in Abb. 37 zu sehen [YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001].

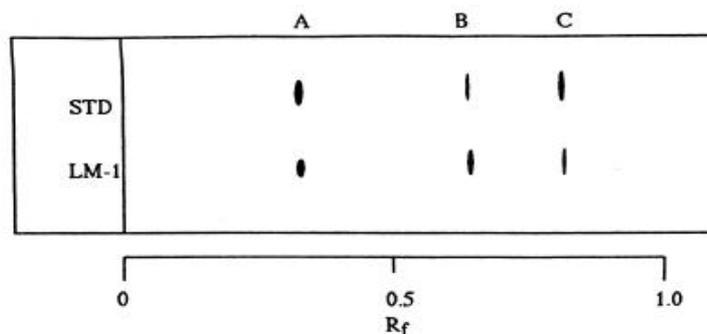


Abb. 37: TLC einer TTX-Fraktion von *Vibrio*-Stämmen (LM-1) isoliert aus dem Darm von *F. vermicularis radiatus* [LEE et al., 2000].

3.6.3.3 Elektrophorese Techniken

Die Elektrophorese ist ein Trennmechanismus, bei dem gelöste ionische Verbindungen in einem elektrischen Feld wegen unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeit aufgetrennt werden [MICHOV, 1995]. Moleküle mit positiver Ladung wandern demnach zur Kathode und Moleküle mit negativer Ladung zur Anode. Die Auftrennung bietet Informationen über die Zusammensetzung von Stoffgemischen, dient also ihrer Analyse (analytische Elektrophorese). Es gibt zahlreiche verschiedene elektrophoretische Trennverfahren wie z. B. Papier-, Gel- oder Kapillarelektrophorese. [CHEMGAPEDIA, 2008a].

Kapillarelektrophorese (CE)

Die Kapillarelektrophorese (CE = capillary electrophoresis) ist eine relativ neue Technik, welche sich im Wesentlichen mit einer schmal (~ 100 µg innerer Durchmesser) fusionierten Silica-Kapillare anstelle des Elektrophoresegels beschäftigt.

Eine Probenmenge im Nanoliterbereich wird am Ende der Säule eingeführt, bevor sie zum Überbrücken von zwei Puffer-Reservoirien gebraucht wird. Wenn dann Hochspannung angelegt wird, wandern die Toxine durch die Säule und können, wenn sie eine UV- oder Fluoreszenz-Zelle passieren, detektiert werden.

Die Technik ist auf viele Verbindungen mit elektrophoretischer Mobilität anwendbar und selbst dort, wo keine Netto-Belastung auftreten kann, ist es möglich, Verbindungen in Micellen einzufangen, welche dann migrieren [VAN EGMOND et al., 2004].

Wright et al. wendeten ein CE-System für die Bestimmung der STX-Standards an, welches an einen Laser-Fluoreszenz-Detektor gekoppelt war. Die Technik erlaubte eine Erkennung von STX im $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ Bereich. Auch wenn das Injektionsvolumen klein war (1 bis 10 nl), die theoretische Nachweisgrenze für Proben lag im $\mu\text{g} / \text{kg}$ -Bereich. Die vorliegenden Nachteile der Technik waren, dass die gleiche Trennung für Pflanzen, Tiere und Pilze mit gemischten Toxinen nicht nachgewiesen wurde. Die Ausrüstung ist nicht im Handel erhältlich und ist teuer, weiters leidet die Methodik unter den gleichen Problemen wie LC, es muss also ein fluoreszierendes Derivat vor der Trennung oder der Erkennung bereit sein [WRIGHT et al., 1989].

Thibault et al. hatten eine CE-Methode für Proben mariner Biota entwickelt. Eine Trennung von neoSTX und STX wurde durch UV-Spektrometrie erreicht und eine Nachweisgrenze von $5 \mu\text{M}$ (ca. $1,5 \mu\text{g} / \text{ml}$) wurde demonstriert. Die Autoren legten nahe, dass die CE-UV-Technik erhebliche Versprechen für das Routine-Screening dieser Toxine in natürlichen Extrakten hält, aber die Nachweisgrenze schien zu hoch für die Verwendung in Überwachungsprogrammen zu sein [THIBAUT et al., 1991].

Bei der Erfassung von TTX durch Elektrophorese wurde ein Mikroliter der TTX-Lösung (10 MU oder $2 \mu\text{g}$ TTX) auf einen $5 \text{ cm} \times 18 \text{ cm}$ Cellulose-Streifen mit $0,08 \text{ M}$ Tris-Puffer (pH-Wert 8,7) aufgebracht und bei $0,8 \text{ mA/cm}$ 20 Minuten elektrophoretisch bestimmt. Zum Nachweis von TTX wird der Streifen wie bei einer TLC behandelt. Bei dieser Art von Elektrophorese bewegt sich TTX in Richtung der Kathode mit einer deutlich kleineren Mobilität als die Mobilität des STX-Standards, welcher unter UV-Licht nach der Behandlung mit Lauge einen blau fluoreszierenden Fleck aufwies [YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001].

Kapillar-Isotachophorese

Im Unterschied zur Elektrophorese erfolgt bei der Isotachophorese (ITP) die Trennung von ionischen Verbindungen im elektrischen Feld durch die elektrophoretische Mobilität bei gleicher Wanderungsgeschwindigkeit [MICHOV, 1995].

Wenn TTX (2,1 µg) in einem Isotachophorese-Gerät angewendet wird, erscheint an der Stelle ein Bereich mit einem potenziellen Wert von 0,32 pro Einheit. Die analytische Zeit beträgt dann weniger als 20 Minuten. Diese Methode ermöglicht eine Bewertung der TTX-Inhalte in rohem Extrakt vom Kugelfisch. Die Nachweisempfindlichkeit für TTX mit Kapillar-Isotachophorese beträgt etwa 0,2 -5 µg, das ist gleichbedeutend mit dem Maus-Bioassay. Dieses Verfahren beseitigt die Notwendigkeit für den Einsatz von lebenden Tieren [YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001].

3.7 Verwendung von TTX in der experimentellen Pharmakologie

Zu den wirksamsten Naturstoffen zählen Toxine tierischen Ursprungs. Durch ihre bekannte und spezifische Wirkungsweise werden sie heutzutage in der experimentellen Pharmakologie für die Erforschung bestimmter zellulärer Strukturen wie Rezeptoren oder Ionenkanäle eingesetzt [PUTZIER und FRINGS, 2002].

Die einzigartige Wirkung von TTX, Aktionspotenziale über eine selektive Hemmung der Natriumkanal-Leitfähigkeit durch Depolarisation zu blockieren, wurde zum ersten Mal in den Axonen des Riesenhummers gefunden.

Neurotoxine, insbesondere das hochgiftige TTX, werden seit langem als Werkzeug zur Untersuchung von Natrium-Kanälen in erregbaren Membranen aufgrund ihrer Spezifität für diese Kanäle genutzt [YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001]. TTX ist ein bequemes pharmakologisches Werkzeug, das zwischen zwei Klassen von spannungsabhängigen Na⁺-Kanälen und zwar jenen, die bei submikromolaren Toxinkonzentrationen blockieren (TTX-empfindliche (TTXE)) und jenen, bei denen der Blockiermechanismus viel höhere Konzentrationen erfordert (TTX-resistent (TTXR)), verwendet werden kann. Diese Unterscheidung hat sich vor allem in Studien von sensorischen Neuronen

der dorsalen Wurzelganglienzellen als nützlich erwiesen, indem alle Nervenzellen TTXE-Ströme aufwiesen, aber nur etwa die Hälfte der kleinen Nervenzellen wiesen einen zusätzlichen TTXR-Strom auf [FARMER et al., 2008].

TTX wurde also verwendet, um nachzuweisen, dass Natrium-Kanäle empfindlich und resistent gegen dieses Toxin sind und unterschiedliche physiologische und pharmakologische Eigenschaften aufweisen. In den Spinalganglien der Ratten sind beide Arten von Kanälen, die unreifen als auch die reifen Nervenzellen, vorhanden, was darauf hindeutet, dass sie beide eine entscheidende Rolle bei der sensorischen Integration spielen könnten. Tatsächlich ist es so, dass verschiedene Arten von Natrium-Kanälen mit in die Vermittlung verschiedener Arten von sensorischen Informationen einbezogen werden. TTX-resistente Natrium-Kanäle spielen zum Beispiel eine größere Rolle in der Schmerzempfindung als TTX-empfindliche, besonders unter chronischen neuropathischen Schmerzbedingungen [YOSHIKAWA-EBESU et al., 2001].

Seit dem Bekanntwerden des bedeutenden Mechanismus von TTX wurde es für mögliche therapeutische Anwendungen herangezogen. Eine mögliche Anwendung ist ein neuroprotektives Medikament in der Behandlung von ischämischen Schäden des Gehirns infolge eines Schlaganfalls. Während das Auftreten von Schlaganfällen von einer raschen lokalen Schädigung im Gehirn begleitet wird, breitet sich der Infarkt vom Punkt der Schädigung langsam aus. So gibt es ein therapeutisches Fenster, in dem Schäden im Peri-Infarkt durch die Gabe des neuroprotektiven Medikaments verhindert oder minimiert werden können [HWANG und NOGUCHI, 2007].

3.8 Risikoanalyse von PSP und TTX

Derzeit beruht die toxikologische Risikobewertung für PSP-Toxine nur auf akuten Toxizitätsdaten. Subchronische und chronische Daten für Tiere als auch für Menschen sind nicht verfügbar.

In der Regel gibt es einen Mangel an toxikologischen Daten vor allem bei wiederholter Exposition. Epidemiologische Daten existieren hauptsächlich durch Vergiftungsfälle. Wenn angemessene wissenschaftliche (toxikologische, epidemiologische) Daten zur

Verfügung stehen, kann eine Risikobewertung durch die Anwendung von allgemein anerkannten Sicherheits- oder Unsicherheitsfaktoren durchgeführt werden. Eine angemessene Reihe von Tier-Daten erlaubt die Ableitung eines „no-observed adverse effect level“ (NOAEL: Höchste Dosis, die auch bei andauernder Aufnahme keine erkennbaren, messbaren, negativen Auswirkungen zeigt [FDA, 2002b]) [VAN EGMOND et al., 2004].

Um anfällige Personen (z. B. Kinder, ältere Menschen, Kranke) zu beschützen, wird normalerweise ein Sicherheitsfaktor von 10 für die Berechnung der TDI-Werte („tolerable daily intake“: tolerierbare tägliche Aufnahme) von Schadstoffen herangezogen, die auf menschlichen Daten basieren. Allerdings ist für PSP wegen der folgenden Einflussfaktoren die Berechnungen kompliziert: auf welcher Ebene sollten die Auswirkungen als "nachteilig" beurteilt werden und ab welcher Ebene ist der tatsächliche NOAEL und LOAEL („lowest observed adverse effect level“: Niedrigste Dosis, bei der im Tierexperiment noch Schädigungen beobachtet wurden [FDA, 2002])? Auf der anderen Seite sind im Datensatz von PSP viele Einzelpersonen vertreten, dies zeigt große Unterschiede in der Empfindlichkeit, deshalb ist ein Sicherheitsfaktor von 10 möglicherweise nicht notwendig. In den meisten Ländern gilt ein Toleranzlevel von 80 µg STX eq/100 g Miesmuschel Fleisch. Wenn der Verzehr von Schalentieren Schätzungen zufolge zwischen 100 und 300 g/Mahlzeit liegt, ist ein Sicherheitsspielraum von < 1 bis 3,8 in Richtung milde Symptome vorhanden und noch wichtiger ein Sicherheitsspielraum von nur 1,9 bis 7,2 zu schweren Vergiftungen oder zum Tod. Diese Spielräume sind also ziemlich klein oder existieren nicht.

Es ist jedoch weder praktikabel noch realistisch, eine sehr geringe Toleranzebene zu ziehen, weil die Nachweisgrenze vom Maus-Bioassay, der am weitesten verbreiteten Methode, um PSP-Toxine festzustellen, etwa bei 40 µg PSP (STX eq)/100 g Schalentier liegt [VAN EGMOND et al., 2004].

4 Zusammenfassung

Die paralytische- und die Kugelfischvergiftung sind schwere und manchmal auch lebensbedrohliche Vergiftungen, welche durch den Verzehr von mit STX oder TTX kontaminierten Muscheln oder Fischen hervorgerufen werden. Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass TTX vom Kugelfisch selbst produziert wird, doch sein Nachweis in bestimmten Kraken, Seesternen und anderen Kreaturen hat darauf hingewiesen, dass TTX durch Bakterien einschließlich *Alteromonas*, *Vibrio* und andere bakterielle Gattungen erzeugt wird. Anders als beim Kugelfisch werden PSP-Toxine (STX und GTX) von toxischen Dinoflagellatarten wie *Alexandrium tamarensis* und *Gymnodinium catenatum*, die von Muscheln als Nahrung aufgenommen werden, produziert. Die chemische Struktur der beiden Toxine unterscheidet sich dadurch, dass STX aus Tetrahydropurin Derivaten besteht und TTX ein Aminoperhydrochinazolin ist, trotzdem weisen sie ähnliche Symptome auf.

PFP und PSP gehören zu den akuten Vergiftungen. Die gesundheitlichen Auswirkungen der episodischen und chronischen Aufnahme der Toxine sind kaum bekannt. Die Symptome beginnen innerhalb von Minuten nach dem Verzehr giftiger Teile mit einem stechenden, kribbelnden Gefühl an den Lippen, der Zunge und in den Fingerspitzen, gefolgt von einem Taubheitsgefühl in den Extremitäten und im Gesicht. Die Vergiftung verläuft weiter mit Übelkeit, Erbrechen, einem unkoordinierten Gang und mit einer nachfolgenden aufsteigenden Lähmung. Es ist derzeit für beide Vergiftungen kein Gegenmittel verfügbar. Deshalb sollten vergiftete Personen künstlich beatmet werden und unterstützende medizinische Versorgung bekommen. Die Symptome beider Vergiftungen entstehen durch die selektive Blockade der Natrium-Kanäle, wodurch der Natrium-Ionen-Einstrom in die Zelle gehemmt wird, was zur Lähmung der betroffenen Muskeln führt. Da dieser Wirkungsmechanismus der Toxine von unermesslichem Wert für die Forschung ist, wird er oft als ein spezifisches pharmakologisches Werkzeug im Studium der Nerven- und Muskel-Physiologie verwendet.

TTX wird seit langem wie STX durch die Maus-Bioassay-Methode bestimmt, diese ist einfach, aber nicht spezifisch für diese Toxine. Spezifischere Methoden, die seit längerem zur Analyse angewendet werden, sind HPLC, GC-MS und HPLC-MS.

5 Summary

The paralytic intoxication as well as the pufferfish poisoning are severe and sometimes even life-threatening. The poison gets in contact with the body through the consumption of contaminated mussels or fish, which contain STX or TTX. For a long time it has been acted on the assumption that TTX was produced by the pufferfish itself, but traces of this poison in octopuses, starfish and other creatures give evidence of TTX originating from bacteria, including species of *Alteromonas*, *Vibrio* and other bacterial genera. Unlike in pufferfish, PSP toxins (STX and GTX) are produced by toxic dinoflagellate species, like *Alexandrium tamarensis*, *Gymnodium catenatum*, which constitute the major food source of mussels. The chemical structure of both toxins varies in STX being a tetrahydropurine derivative and TTX an aminoperhydroquinazoline; despite the conformational differences both cause similar symptoms.

PFP and PSP trigger acute symptoms of poisoning. The effects on health of an episodic and chronic intake of the toxins are not well established. The symptoms start within minutes after the consumption of toxic parts with a tingling sensation on the lips, the tongue and the fingertips, followed by a feeling of numbness in the extremities and in the face. The intoxication proceeds with nausea, vomiting, uncoordinated movement and an increasing paralysis. Presently, there is no antidote available. Due to this, poisoned people should be given artificial respiration and should receive supportive medical care. The symptoms of both intoxications result from the blocking of sodium channels, thereby inhibiting the transport of sodium ions across the cell membrane. This leads to muscle paralysis in the affected regions. Since the mechanism underlying this process has a strong scientific value, it is being applied as a specific pharmacologic tool in the field of physiologic studies of nerves and muscles.

TTX as well as STX can be determined by the mouse bioassay method, which is simple but not specific for those toxins. More specific methods like HPLC, GC-MS and HPLC-MS can also be used for analysis.

6 Literaturverzeichnis

BECK CH. Spannung auf allen Kanälen. Wie Ionen durch die Zellmembran schlüpfen. Biomax 2004; 15: 1-4.

BENZER I. T. Toxicity, Tetrodotoxin. eMedicine, 2007. Online im Internet: URL: <http://www.emedicine.com/emerg/topic576.htm#section~miscella> (Stand: 23.11.07)

BLANCO J, FRANCO J. M, REYERO M. I, MORONO A. PSP detoxification kinetics in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. One- and two-compartment models and the effect of some environmental variables. Mar Ecol Prog Ser 1997; 158: 165-175.

BOCZAR A. B, BEITLER K. M, LISTON J, SULLIVAN J. J, CATTOLICO A. R. Paralytic Shellfish Toxins in *Protogonyaulax tamarensis* and *Protogonyaulax catenella* in Axic Culture. Plant Physiol 1988; 88: 1285-1290.

BUNDESINSTITUT für RISIKOBEWERTUNG. Nationales Referenzlabor zur Überwachung von marinen Biotoxinen, 2008. Online im Internet: URL: <http://www.bfr.bund.de/cd/8803> (Stand: 29.12.08) a

BUNDESINSTITUT für RISIKOBEWERTUNG. Gesetzliche Regelung zu marinen Biotoxinen, 2008. Online im Internet: URL: <http://www.bfr.bund.de/cd/8805> (Stand: 29.12.08) b

CHANG F. C, SPRIGGS D. L, BENTON B. J, KELLER S. A, CAPACIO B. R. 4-Aminopyridine Reverses Saxitoxin (STX)- and Tetrodotoxin (TTX)-Induced Cardiorespiratory Depression in Chronically Instrumented Guinea Pigs. Fundam Appl Toxicol 1997; 38: 75-88.

CHEMGAPEDIA Glossar. Elektrophorese. Online im Internet: URL: <http://www.chemgapedia.de/vsengine/popup/vsc/de/glossar/e/el/elektrophorese.glos.ht>

[ml](#) (Stand: 10. 06. 08) (a)

CHEMGAPEDIA Glossar. Enzyme linked immunosorbent assay. Online im Internet:

URL:

http://www.chemgapedia.de/vsengine/popup/vsc/de/glossar/e/en/enzyme_00032linked_00032immunosorbent_00032assay.glos.html (Stand: 10. 06. 08) (b)

CHEN H. M, LIN C. H, WANG T. M. Effects of 4-Aminopyridine on Saxitoxin Intoxication. *Toxicol. Appl Pharmacol* 1996; 141: 44-48.

CHU F. S, FAN T. S. L. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for saxitoxin in shellfish. *J AOAC* 1985; 68: 13-16.

CHU F. S, HSU K. H, HUANG X, BARRETT R, ALLISON C. Screening of paralytic shellfish poisoning toxins in naturally occurring samples with three different direct competitive enzyme-linked immunosorbent assays. *J Agric Food Chem* 1996; 44: 4034-4047.

DAVIO S. R, FONTELO P. A. A competitive displacement assay to detect saxitoxin and tetrodotoxin. *Anal Biochem* 1984; 141: 199-204.

DE CARVALHO M, JACINTO J, RAMOS N, OLIVEIRA V, PINHO E MELO T, SA J. Paralytic shellfish poisoning: clinical and electrophysiological observations. *J Neurol* 1998; 245(8): 551-554.

DEGUCHI T. Structure and activity in tetrodotoxin derivatives. *Jap J Pharmacol* 1967; 17: 267-278.

DER BROCKHAUS. Ernährung; Gesund essen, bewusst leben. 3. Auflage, F. A. Brockhaus GmbH, Mannheim, 2008; 224, 469.

DESHPANDE S. S. Handbook of Food Toxicology. Marcel Dekker Inc., New York,

Basel, 2002; 120-126, 687-689, 702-713, 729-733.

DOHLE W, EMSCHERMANN P, GÖTTING K. J, GOLDSCHMID A, GREVEN H, HASZPRUNAR G, HAUSMANN K, HERRMANN K, HÜLSMANN N, KAPP H, KLAUSNITZER B, LORENZEN S, PAULUS H, PURSCHKE G, RIEGER R, RUHBERG H, RUTHMANN A, SCHÄFER W, SCHMIKE H. K, STERRER W, TURBEVILLE C, SOEST R, WEYGOLDT P, WESTHEIDE W, XYLANDER W.. Spezielle Zoologie; erster Teil: Einzeller und wirbellose Tiere (Westheide W, Rieger R, Hrsg). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York 1996; 40-41.

DOUGLAS L.P, AYALA E.C, GUZMAN-PEREZ E. S, LOPEZ-GARCIA R, TRUJILLO S. Microbial Toxins in Food: Algal, Fungal, and Bacterial. In: Food Toxicology (Helfrich W, Winter K. C, Hrsg). CRC Press LLC, Florida, 2001; 95-97, 103-104.

EARNSHAW A. Marine Toxins, Pilot Study. Report Food Analysis Performance Assessment Scheme, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, UK, 2003.

EDWARDS N. Saxitoxin; from food poisoning to chemical warfare. 1998. Online im Internet: URL: <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/stx/saxi.htm> (Stand: 10.02.09)

EISING S, GÖRLACH M, TEUBNER O. Das große Buch der Meeresfrüchte. Teubner-Verlag, München, 2005; 99.

FARMER C. E, SMITH K. J, DOCHERTY R. J. Low concentrations of tetrodotoxin interact with tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channels. Br J Pharmacol 2008; 155: 34–43.

FAUST M. A, GULLEDGE R. A. Identifying Harmful Marine Dinoflagellates. Smithsonian Contributions from the United States National Herbarium, 2002; 42:1-144. Online im Internet: URL: <http://botany.si.edu/references/dinoflag/intro.htm> (Stand:

10.04.08)

FLEMING J. J, DU BOIS J. A Synthesis of (+)-Saxitoxin. J Am Chem Soc 2006; 128 (12): 3926-3927.

FOOD and AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Cultured aquatic species programme, *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758), 2008. Online im Internet: URL: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus_edulis (Stand: 10.11.08).

FOOD and DRUG ADMINISTRATION. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. Tetrodotoxin, 2007. Online im Internet: URL: <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap39.html> (Stand: 9.10.07) (a)

FOOD and DRUG ADMINISTRATION. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. Various Shellfish-Associated Toxins, 2007. Online im Internet: URL: <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap37.html> (Stand: 30.11.07) (b)

FOOD and DRUG ADMINISTRATION. High Resolution Images for Northern Puffer (Puffer; *Sphoeroides maculatus*), 2002. Online im Internet: URL: <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/rfe1np.html> (Stand: 15.04.08) (a)

FOOD and DRUG ADMINISTRATION. Guidance for Industry and Reviewers: Estimating the Safe Starting Dose in Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers, 2002. Online im Internet: URL: <http://www.fda.gov/cber/gdlns/dose.pdf> (Stand: 05.02.09) (b)

FOOD and DRUG ADMINISTRATION. Pyrodinium bahamense, 2005. Online im Internet: URL: <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/pyro.gif> (Stand: 30.11.07)

FRINGS ST. Spannungsgesteuerte Natriumkanäle. Heidelberg, 2003. Online im Internet: URL: <http://www.sinnesphysiologie.de/gruvo03/elektro2/naka.htm> (Stand: 23.10.08)

GARTHWAITE I, ROSS K. M, MILES C. O, BRIGGS L. R, TOWERS, N. R, BORRELL T, BUSBY, P. Integrated Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Screening System for Amnesic, Neurotoxic, Diarrhetic, and Paralytic Shellfish Poisoning Toxins Found in New Zealand. In press. J AOAC Int 2001; 84(5): 1643-1648.

GLIBERT M. P., KANA M. T., ANDERSON M. D. Photosynthetic response of *Gonyaulax Tamarensis* during growth in a natural bloom and in batch culture. Mar Ecol Prog Ser 1988; 42: 303-309.

GOSLING E. Bivalves Molluscs, Biology, Ecology and Culture. (Blackwell Publishing) Fishing News Books, 2003; 414-417.

HABERMEHL G. G. Gift-Tiere und ihre Waffen. Springer-Verlag, Berlin, 1994; 15-16.

HALSTEAD W. B. Fish Toxins. In: Foodborne Disease Handbook (Hui Y. H, Kitts D, Stanfield S. P, Hrsg). Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 2001; 23, 25, 39.

HERWIG R. P. Pathogens Transmitted by Seafood. In: Foodborne Disease Handbook (Hui Y. H, Kitts D, Stanfield S. P, Hrsg). Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 2001; 111.

HESKETH J. C. What are ion channels? Ion Channel, Patch Clamp and Electrophysiology Research. 2007. Online im Internet: URL: <http://www.ionchannels.org/> (Stand: 24.10.08).

HINMAN A, DU BOIS J. A Stereoselective Synthesis of (-)-Tetrodotoxin. J Am Chem Soc 2003; 125 (38): 11510-11511.

HUCHO F, WEISE CH. Ligandengesteuerte Ionenkanäle. Angew Chem 2001; 113: 3194 – 3211.

HUANG A. Synthetic Approaches to Tetrodotoxin. Org Lett 2004; 6 (25): 4637–4641.

Online im Internet: URL: organicdivision.org/essays_2004/huang.pdf (Stand: 15.01.09).

HUNNIUS C, AMMON P. T. H. Hunnius pharmazeutisches Wörterbuch. 9. Auflage (Ammon H, Hrsg). de Gruyter, Berlin, 2004; 1439, 1578.

HUSS H.H, ABABOUCHE L, GRAM L. Assessment and management of seafood safety and quality. FAO fisheries and technical paper, Rom, 2003; 444: 19-20, 70-76. Online im Internet: URL: <http://www.fao.org/docrep/006/y4743e/y4743e00.htm> (Stand: 26.09.08).

HUSS H. H. Assurance of seafood quality. FAO fisheries and technical paper, Rom, 1994; 334. Online im Internet: URL: <http://www.fao.org/docrep/003/t1768e/T1768E00.htm> (Stand: 14.01.09)

HWANG D-F, NOGUCHI T. Tetrodotoxin Poisoning; In: Advances in food and nutrition research (Steve L. Taylor, Hrsg.). Academic Press, Amsterdam, 2007; 52: 159-160, 163, 165, 168, 174, 176, 197, 199-201, 207.

ISOBE M, OHYABU N, NISHIKAWA T. First Asymmetric Total Synthesis of Tetrodotoxin. J Am Chem Soc 2003; 125 (29): 8798-8805.

JACOBI P. A, BROWNSTEIN A, MARTINELLI M, GROZINGER K. A Mild Procedure for the Generation of Azomethine Imines. Stereochemical Factors in the Intramolecular 1, 3-Dipolar Addition of Azomethine Imines and a Synthetic Approach to Saxitoxin. J Am Chem Soc 1981; 103 (1): 239-241.

JACOBI P. A, MARTINELLI M, POLANC S. Total Synthesis of (+)-Saxitoxin. J Am Chem Soc 1984; 106 (19): 5594-5598.

JAIM E, HUMMERT C, HESS P, LUCHAS B. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by high-performance ion-exchange chromatography. J Chromatogr A 2001; 929: 43-49.

JOHNSON A. E, SCHANTZ J. E. Seafood Toxins. In: Foodborne Diseases (Cliver O. D, Riemann P. H, Hrsg). Academic Press, London, 2002; 211-213; 220-223.

JOYCE ST. The dead zones: oxygen-starved coastal waters. Environmental health perspectives. 2000; 108 (3): 120-125. Online im Internet: URL: <http://www.ehponline.org/docs/2000/108-3/focus.html> (Stand: 05. 01. 09)

KARSCHIN A, GREGER R. Membranpotential. In: Physiologie (Klinke R, Pape H. C, Silbernagl St, Hrsg). Thieme-Verlag, Stuttgart, 2005, 5. Auflage; 72.

KASUGA F, HARA KUDO Y, MACHII K. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit for Paralytic Shellfish Poisoning Toxins. J Food Hyg Soc Japan 1996; 37(6): 407-410.

KAWATSU K, HAMANO Y, SUGIYAMA A, HASHIZUME K, NOGUCHI T. Development and Application of an Enzyme Immunoassay Based on a Monoclonal Antibody against Gonyautoxin Components of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins. J Food Protection 2002; 65 (8): 1304-1308.

KISHI Y, KANEKO T, NAKATA T, TANINO H. A Stereospecific Total Synthesis of d/l-Saxitoxin. J Am Chem Soc 1977; 99 (8): 2818-2819.

KITTS D. Laboratory methodology for shellfish toxins. In: Foodborne Disease Handbook (Hui Y. H, Kitts D, Stanfield S. P, Hrsg). Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 2001; 188-190.

KOERT U. Die Türen der Zelle: Membranständige Ionenkanäle. Chem unserer Zeit 2003; 37: 430. (a)

KOERT U. Synthetische Ionenkanäle. Chem unserer Zeit 1997; 1: 20. (b)

KOGURE K, TAMPLIN M. L, SIMIDU U, COLWELL R. R. A tissue culture assay for the tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins. Toxicol 1988; 26: 191-197.

LACHMANN P, GREMBLEWSKI-STRATE O. Fische der Karibik, Bestimmungsbuch für Taucher und Schnorchler. BLV Verlagsgesellschaft, München, 1995; 202.

LEE M. J, JOENG D. J, KIM W. S, KIM H. D, KIM C. H, PARK W. W, PARK Y. H, KIM K. S, KIM H. M, KIM D. S. A tetrodotoxin-producing *Vibrio* strain, LM-1, from the puffer fish *Fugu vermicularis radiatus*. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 1698-1701.

LEWIS' DICTIONARY of TOXICOLOGY. Lewis Publishers, Florida, 1998; 1023.

LIEWELLYN E. L. Shellfish Chemical Poisoning. In: *Foodborne Disease Handbook* (Hui Y. H, Kitts D, Stanfield S. P, Hrsg). Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 2001; 82.

LIPP EK, ROSE JB. The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 1997; 16: 620-640.

LÖFFLER G. Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. Springer-Verlag, Heidelberg, 2003, 5. Aufl.; 723.

MARQUARDT H, SCHÄFER S. Lehrbuch der Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2004; 7.

MATSUMURA K. Production of tetrodotoxin in puffer fish embryos. *Environ Toxicol Pharmacol* 1996; 6: 217-219. (a)

MATSUMURA K. Reexamination of tetrodotoxin production by Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 3468-3470. (b)

MEBS D. Gifttiere. Ein Handbuch für Biologen, Toxikologen, Ärzte und Apotheker. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2000; 1, 14-15, 146-148, 150, 129-130.

MEYER R. V. Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2004; 6-9, 15, 22-23, 108-109.

MONS M, VAN EGMOND H.P, SPEIJERS G. J. A. Paralytic shellfish poisoning: A review. RIVM Report 388802 005, 1998; 1-47.

MICHOV B. Elektrophorese: Theorie und Praxis. de Gruyter, Berlin, 1995; 1, 121.

NATIONAL GEOGRAPHIC. Pufferfish, Tetraodontidae. National Geographic Society, 2008. Online im Internet: URL:
<http://animals.nationalgeographic.com/animals/printable/pufferfish.html> (Stand: 17.11.08)

NEUMÜLLER O. A. DUDEN Das Wörterbuch chemischer Fachausdrücke. Dudenverlag, Mannheim, 2003; 66, 98, 115, 181, 584.

PARACELSUS. Septem Defensiones, Selbstverteidigung eines Aussenseiters. Reprint der Ausgabe Basel 1589. Schwabe & Co. Verlag, Basel, 2003; 60-61.

PLAUT I, CHEN T. How small puffers (Teleostei: Tetraodontidae) swim. Ichthyological Research 2003; 50:149-153.

PLEASANCE S, AYER S. W, LAYCOCK M. V, THIBAUT P. Ionspray mass spectrometry of marine toxins. III. Analysis of paralytic shellfish poisoning toxins by flow-injection analysis, liquid chromatography/mass spectrometry and capillary electrophoresis/mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 1992; 6: 14-24.

PUTZIER I, FRINGS ST. Tiergifte in der medizinischen Forschung; Vom Jagdgift zur neuen Schmerztherapie. Biol unserer Zeit 2002; 32: 149-159.

RAHAMIMOFF R, GINSBURG S, BARKAI G, COOK B, EDRY-SCHILLER J, KAISERMAN I, MEIR A, ROLL M, WORDEN M. K, YAKIR N. Ion Channels in

Biological Membranes – General Principles. In: Biomembranes, Structural and Functional Aspects (Shinitzky M, Hrsg). VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1994; 204.

RALONDE R. Paralytic Shellfish Poisoning: The Alaska Problem. Alaska's Marine Resources 1996; 8 (2): 1-19.

RAVEN H. P, EVERT F. R, EICHDORN E. S. Biologie der Pflanzen (Friedl T, Gillet E, Komor E, Lagenfeld-Heyser R, Pfanz H, Uhlarz H, Hrsg). Walter de Gruyter GmbH, Berlin, 2006; 347.

ROTH K. Chemische Delikatesse. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2007; 141.

SCHAPER A, EBBECKE M, ROSENBUSCH J, DESEL H. Fischvergiftung. Deutsches Ärzteblatt 2002; 99: A 1151 – 1158 (Heft 17).

SCHMID F. R, LANG F. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2007, 30. Auflage; 56-57.

SILBERNAGL ST, DESPOPOULOS A. Taschenatlas der Physiologie. Thieme Verlag, Stuttgart, 2003, 6. Aufl.;47.

SIMIDU U, NOGUCHI T, HWANG DF, SHIDA Y, HASHIMOTO K. Marine bacteria which produce tetrodotoxin. Appl Environ Microbiol 1987; 53 (7): 1714-1715.

SOBEL J, PAINTER J. Illnesses caused by Marine Toxins. Food Safety 2005; 41: 1290-1296.

SOMMER U. Biologische Meereskunde. Springer-Verlag, Berlin, 1998; 28.

SULLIVAN J. J. Methods of analysis for DSP and PSP toxins in shellfish: a review. J Shellfish Res 1988; 7: 587-595.

SUMMERS A. Pufferfish; A Fish Story. American Museum of Natural History, 2001. Online im Internet: URL:

http://www.biomechanics.bio.uci.edu/html/nh_biomech/pufferfish/puffer.htm (Stand: 15.04.08)

TAYLOR L. S. Disease Processes in Foodborne Illness. In: Foodborne Diseases (Cliver O. D, Riemann P. H, Hrsg). Academic Press, London, 2002; 3.

TEUSCHER E, LINDEQUIST U. Biogene Gifte, Biologie-Chemie-Pharmakologie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1998; 434-436.

THIBAUT P, PLEASANCE S, LAYCOCK M. V. Analysis of paralytic shellfish poisons by capillary electrophoresis. J Chromatogr 1991; 542: 483-501.

TSUDA K. Über Tetrodotoxin, Giftstoff der Bowlfische. Naturwissenschaften 1966; 53 (7): 171-176.

UNIVERSITY of MARYLAND. Tetrodotoxin: Mode of Action. Chemical Ecology, 2001. Online im Internet: URL:

<http://www.life.umd.edu/grad/MLfsc/zctsim/ionchannel.html> (Stand: 24.10.08)

VAN EGMOND H. P, VAN APELDOORN M. E, SPEIJERS G. J. A. Marine Biotoxins. FAO Food and Nutrition Paper 2004; 80: 1-4; 6-14; 18-32; 219. Online im Internet: URL: <http://www.fao.org/docrep/007/y5486e/y5486e00.HTM> (Stand: 25.09.08)

WRIGHT J. L. C, BOYD R. K, DE FREITAS A. S. W, FALK M, FOXALL R. A, JAMIESON W. D, LAYCOCK M. V, MC CULLOCH A. W, MC IMMES A. G, ODENSE P, PATHA V. P, QUILLIAM M. A, RAGAN M. A, SIM P. G, THIBAUT P, WALTER J. A, GILGAN M, RICHARD D. J, DEWAR D. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. Can J Chem 1989; 67: 481-490.

YAN Q, YU P. H. F, LI H. Z. Detection of tetrodotoxin and bacterial production by *Serratia marcescens*. World J Microbiol Biotechnol 2005; 21: 1255-1258.

YASUMOTO T, YASUMURA D, YOTSU M, MICHISHITA T, ENDO A, KOTAKI Y. Bacterial production of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin. Agric Biol Chem 1986; 50: 793-795.

YOSHIKAWA-EBESU S. M. J, HOKAMA Y, NOGUCHI T. Tetrodotoxin. In: Foodborne Disease Handbook (Hui Y. H, Kitts D, Stanfield S. P, Hrsg). Marcel Dekker Inc., New York, 2001; 277-278, 280, 255-258, 263-266, 269-270.

YU C. F, YU P. H. F. Are puffer fish more toxic in their spawning seasons? Mar Biol 2002; 140: 1053-1057.

ZUERN A, ZIMMERER C, BEZUGLA E, SCHLEICHER K, SALZER R, THIELE ST. Hochdruckflüssigchromatographie. Online im Internet; URL: http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/hplc_detail1.vlu.html
(Stand: 01. 06. 08)

7 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Miriam Santer
Geboren am:	19. Februar 1982
Geburtsort:	Klagenfurt
Staatsbürgerschaft:	Österreich

Schulbildung:

1988 – 1991	Volksschule Reifnitz, 9081 Reifnitz
1991 – 1998	Rudolf-Steiner-Schule, Hubertusstraße 1, 9020 Klagenfurt
1998 - 1999	Bundesoberstufenrealgymnasium
2001 – 2002	Realgymnasium für Berufstätige, Ferdinand-Jergitsch Str. 21, 9020 Klagenfurt
seit Okt. 2002	Studium der Ernährungswissenschaften an der Universität Wien, Althanstraße 14, 1090 Wien

Praktika:

Schuljahr 1996/97: Landwirtschaftspraktikum, Bauernhof Priebernig, Eberstein
 Schuljahr 1996/97: Forstpraktikum, Bauernhof Opriessnig, Brückel
 Schuljahr 1997/98: Kleinbetriebspraktikum, ehemalige Arztpraxis Dr. Kircher, Reifnitz
 Schuljahr 1998/99: Feldmesspraktikum, Flattnitz
 Schuljahr 1998/99: Industriepraktikum, Krankenhaus Wäscherei, Klagenfurt
 Schuljahr 1999/00: Sozialpraktikum, Ferienzentrums Soncek, Slowenien

Sommer 98: Praktikum, Eisstand Casino Velden

Sommer 1999-2005: Praktikum bei der Firma Billa, Reifnitz

Sommer 05: Praktikum bei der Firma Pharmaforce Klagenfurt

(im Bereich Produktion)

Sommer 06: Praktikum bei der Lebensmitteluntersuchungsanstalt, Klagenfurt

(Labortätigkeit)

seit Juni 06: Teil- und Vollzeit beschäftigt als spieltechnische Angestellte bei Casinos
 Austria AG

