

## Paralytic Shellfish Toxins



Die 18 Substanzen zählende Gruppe der *Paralytic Shellfish Toxins* (PST) sind sekundäre Stoffwechselprodukte von Algen und werden vor allem während der Algenblüte („Red Tide“) produziert. Die PST werden dabei in Muscheln angereichert.

Da es sehr schwer einschätzbar ist, wann eine Verseuchung auftritt, muss die Muschelpopulation regelmäßig auf diese Toxine untersucht werden. Die Aufnahme von kontaminierten Muscheln kann zum *Paralytic-Shellfish-Poisoning* (PSP), einer lebensbedrohlichen Erkrankung, führen.

Der Maus-Bioassay als offizielle Methode der AOAC International hat sich beim Nachweis der Algentoxine als unzuverlässig erwiesen, was zu einer Anwendung von physikalischen-chemischen Methoden führte. Die bekannteste HPLC-Nachsäulenderivatisierungs-Methode ist die Oxidation der getrennten Giftstoffe unter alkalischen Bedingungen zu fluoreszierenden Verbindungen.

Sullivan et al. [1] hat diese Methode benutzt um Gonyantoxine 1-6 (GTX1-6), Saxitoxine (STX) und Neosaxitoxine (neoSTX) zu bestimmen, aber nicht die N-Sulfocarbomyl-11-hydroxysulfat Toxine (C1-C4). Oshima et al. [2, 3] hat diese Methode abgewandelt, so dass die drei Toxin-Gruppen getrennt bestimmt werden konnten indem eine isokratische Elution mit 3 unterschiedlichen mobilen Phasen verwendet wurde.

Eine weitere Optimierung von van de Riet et al. [4, 5] hat zu einer kürzeren Analysezeit der 3 Gruppen geführt. Dabei werden HPLC-Gradienten und ein Umschaltventil verwendet.

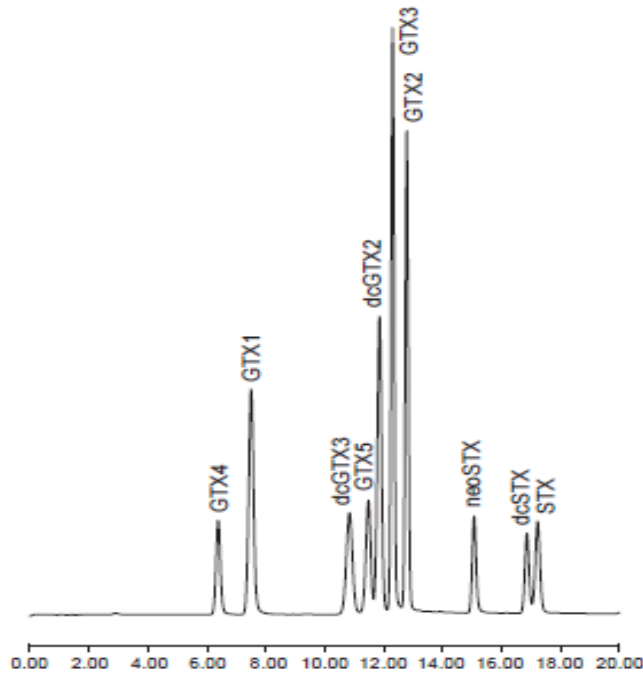
Diese Applikationsnote beschreibt die Benutzung des **PINNACLE PCX** von **PICKERING LABORATORIES** für die HPLC-Nachsäulen-Analytik von *Paralytic Shellfish Toxins*.

### Methodenbeschreibung

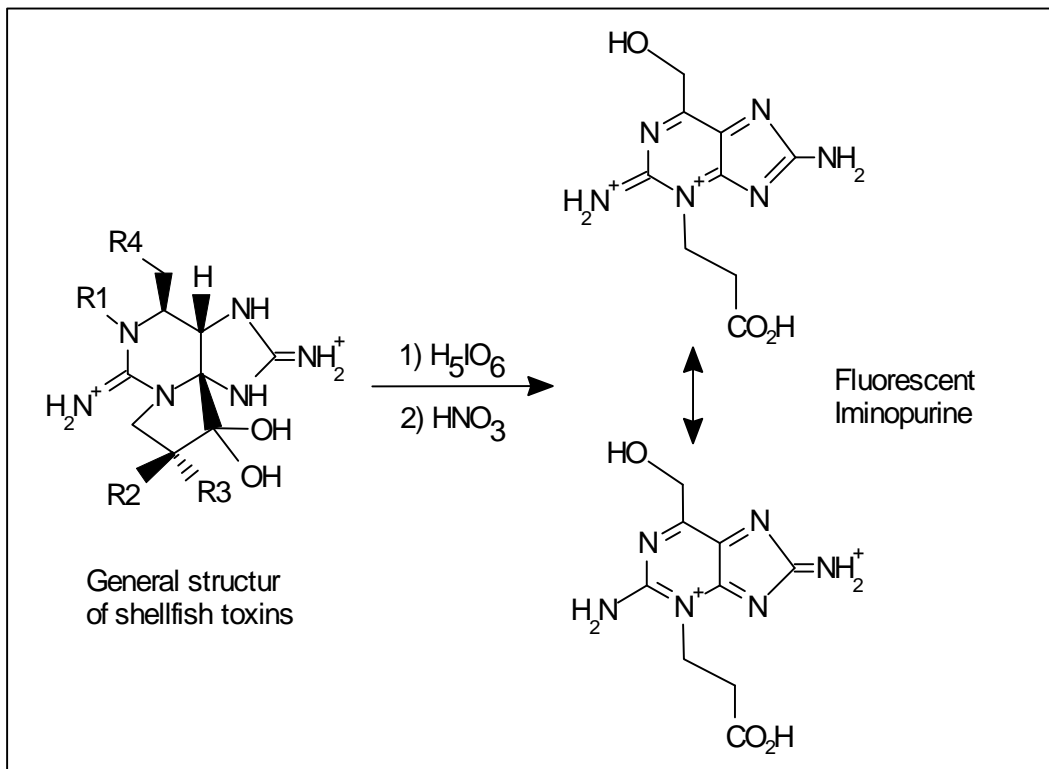
Nach der Trennung über eine RP-Säule werden die Toxine in einer zweistufigen Nachsäulenderivatisierung zu fluoreszierenden Iminopurin-Derivate umgesetzt. Der erste Schritt besteht aus der Oxidation mit Periodsäure im alkalischen Milieu, der zweite ist das Rückstellen des pH-Werts mit Säure. Die Iminopurin-Derivate werden anschließend mit einem Fluoreszenzdetektor gemessen.

Die PST sprechen unterschiedlich stark auf den pH-Wert der Oxidationslösung an (pH 7 – 11). Ebenso unterschiedlich sind die optimalen Wellenlängen der einzelnen Verbindungen für die Fluoreszenzmessung. Man orientiert sich hier am besten an den in der Literatur für die jeweiligen PST angegebenen Werten.

## Chromatogramm



*Chromatogram of GTX and STX mixed working standard*



# APPLIKATIONSNOTE

---

Toxin	N-Sulfocarbamoyl	Decarbamoyl	R1	R2	R3
Saxitoxin	B1	dc-Saxitoxin	H	H	H
Neosaxitoxin	B2	dc-Neosaxitoxin	OH	H	H
Gonyautoxin I	C3	dc-Gonyautoxin I	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Gonyautoxin II	C1	dc-Gonyautoxin II	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Gonyautoxin III	C2	dc-Gonyautoxin III	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H
Gonyautoxin IV	C4	dc-Gonyautoxin IV	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H

LCTech bietet für diese Applikation das geeignete Nachsäulenderivatisierungs-System **PINNACLE PCX** von **PICKERING LABORATORIES** an. Das vollautomatisierte Software-gesteuerte System kann mit jeder beliebigen HPLC-Anlage betrieben werden und wird lediglich zwischen HPLC und Detektor angeschlossen

## HPLC-Bedingungen und Derivatisierungsparameter

<b>HPLC</b>	
Betriebsmodus	Binärer Gradient
Eluent	A. 11 mM Heptansulfonat, 5.5 mM Phosphorsäure, eingestellt auf pH 7,1 mit Ammoniumhydroxid  B. 11 mM Heptansulfonat, 16,5 mM Phosphorsäure, 11,5 % Acetonitril, eingestellt auf pH 7,1 with Ammoniumhydroxid
Entgasung	Helium- oder Vakuum-Entgasung
HPLC-Säule	Zorbax Bonus RP Säule, 3,5 µm, 4,6 x 150 mm
Flussrate	0,8 mL/min
Probeninjektionsvolumen	10 µL
<b>Nachsäulenderivatisierung</b>	
Pinnacle PCX	Zweistufig
Säulenofen	40 °C
Reaktorvolumen	1,0 mL
Reaktortemperatur	85 °C
Reagenz 1	100 mM Phosphorsäure, 5 mM Periodsäure, eingestellt auf pH 7,8 mit 5 M Natriumhydroxid
Reagenz 2	0,75 M Salpetersäure
Flussrate:	0,4 mL/min
<b>Fluoreszenz-Detektion</b>	
Anregungswellenlänge	330 nm
Emissionswellenlänge	390 nm
Zelle	Analytisch; druckstabil bis 7 bar

## HPLC Gradienten Programm

Zeit (Min)	% A	% B
0	100	0
7,9	100	0
8	0	100
18,5	0	100
18,5	100	0
24	100	0

## Literatur

- 1) J.J.Sullivan et. al J.Food Sci. 50(1) (1985) 26-29.
- 2) Yasukatsu Oshima "Post-Column Derivatization Liquid Chromatographic Method for Paralytic Shellfish Toxins." Journal of AOAC International Vol.78, No.2, (1995) 528-532.
- 3) Yasukatsu Oshima, et. al in *Mycotoxins and Phytotoxins* 88, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 319-326.
- 4) Wade A. Rourke, et. al "Rapid Post-Column Methodology for Determination of Paralytic Shellfish Toxins in Shellfish Tissue." Journal of AOAC International Vol.91, No.3, (2008) 589-597.
- 5) Jeffrey M. van de Riet, et. al "Liquid Chromatographic Post-Column Oxidation Method for Analysis of Paralytic Shellfish Toxins in Mussels, Clams, Scallops and Oysters: Single-Laboratory Validation." Journal of AOAC International Vol.92, No. 6, (2009) 1690-1704.

## Bestellinformation

Bestellnummer	Beschreibung
1153-1062	PINNACLE PCX – zweistufig; 1,0 mL Reaktor