

Ersatz des Bioassay zum Nachweis von PSP-Toxinen (Saxitoxin) in Muscheln und Muschelkonserven durch eine chemisch-physikalische Methode = Replacement of the mouse bioassay for the analysis of PSP-toxins (saxitoxin) in mussels and preserved mussels

Autor(en): Rohr, Irène / Zweifel, U. / Schlatter, Ch.
by a ...

Objektyp: Article

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **82 (1991)**

Heft 5

PDF erstellt am: **28.04.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982422>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ersatz des Bioassay zum Nachweis von PSP-Toxinen (Saxitoxin) in Muscheln und Muschelkonserven durch eine chemisch-physikalische Methode

Replacement of the Mouse Bioassay for the Analysis of PSP-Toxins (Saxitoxin) in Mussels and Preserved Mussels by a Physicochemical Method

Irène Rohr, U. Zweifel und Ch. Schlatter

Institut für Toxikologie der ETH und der Universität Zürich, Schwerzenbach

Einleitung

Seit Jahrhunderten kommen immer wieder Vergiftungen nach dem Verzehr von Muscheln vor. Diese werden sehr oft durch Saxitoxin ausgelöst. Dieses Toxin wird von Dinoflagellaten (*Gonyaulax* spp.), Einzellern, die zum Phytoplankton gehören, synthetisiert. Muscheln filtrieren Plankton zur Nahrungsaufnahme aus dem Meerwasser, so dass auf diesem Wege auch *Gonyaulax* in den Muschelkörper gelangt. Diese Dinoflagellaten treten vor allem in den Sommermonaten in Massen im Plankton auf; es bildet sich eine sogenannte Planktonblüte aus, die zur Verfärbung des Meerwassers führt. Die Muscheln speichern das Toxin, ohne selbst Schaden zu nehmen, im Filterapparat und im Hepatopankreas (1).

Der Begriff «Saxitoxin» drückt in der Regel dasselbe aus, was korrekterweise als PSP-Toxine (PSP = paralytic shellfish poisoning) bezeichnet wird. Die Bezeichnung «Saxitoxin» ist von der Muschelart *Saxidomus giganteus* abgeleitet, aus der es erstmals isoliert wurde. Allerdings ist mit «Saxitoxin» nicht nur die Gruppe der PSP-Toxine schlechthin bezeichnet, sondern auch ein definiertes Einzeltoxin aus dieser Gruppe.

Die Struktur von Saxitoxin konnte 1975 von *Schantz* et al. (2) aufgeklärt werden. Die chemische Summenformel ist $C_{10}H_{17}N_7O_4$ und wurde als Perhydropurinring mit zwei Guanidingruppen erkannt. Die Strukturformel ist in Abbildung 1 dargestellt.

Mindestens zwölf weitere Gifte der PSP-Toxine sind bekannt und dem eigentlichen Saxitoxin chemisch nahe verwandt (3).

Die Wirkung dieses Giftes beruht auf dem spezifischen Angriff an erregbaren Membranen. Es blockiert die Natriumkanäle der Zellmembranen. Kennzeichnend für die Vergiftung ist daher die paralytische Wirkung, die bereits kurz nach der Ingestion durch Blockade der Weiterleitung von Impulsen auftritt. Davon sind

motorische und sensible Nerven betroffen, nicht jedoch das zentrale Nervensystem. Die Symptome äussern sich in Prickeln im Bereich der Lippen und des Mundes, die sich in Finger- und Fusspitzen fortsetzen und in Gefühllosigkeit der Glieder sowie Schwäche der Nacken-, Arm- und Beinmuskulatur übergehen kann. Durch völlige Paralyse und Lähmung der Atemmuskulatur sind Todesfälle möglich. In der Literatur sind mehr als 2000 Erkrankungsfälle beschrieben, von denen etwa 10% tödlich verliefen. Finale Stadien werden innerhalb von 24 Stunden erreicht. Bei Überleben der Intoxikation sollen keine Schäden zurückbleiben (4).

Über die letale Dosis beim Menschen findet man Angaben zwischen 0,5 und 10 mg Saxitoxin (5, 6).

Ebenso differieren auch die gesetzlichen Toleranzwerte. Diese liegen zwischen 10 µg/100 g Muschelfleisch (Feuchtgewicht) in Österreich, 40 µg/100 g in Holland und 80 µg/100 g in den USA. Die WHO empfiehlt Massnahmen ab 80 µg/100 g (5).

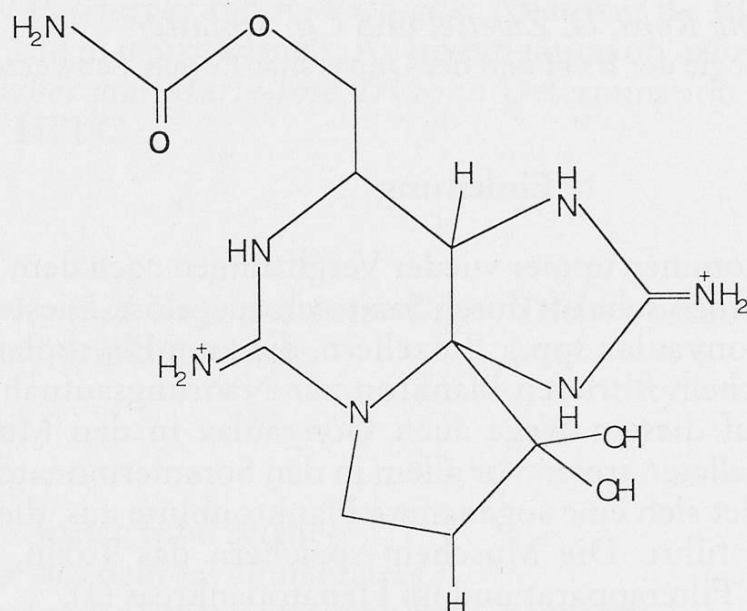


Abb. 1. Strukturformel von Saxitoxin

Problemstellung und Vorgehensweise

Problemstellung

Der Maus-Bioassay ist die anerkannte (Association of Official Chemists AOAC, 1980) und weltweit, so auch in der Schweiz, angewandte Standardmethode zum Nachweis von PSP-Toxinen (paralytic shellfish poisoning) in Muscheln. Dabei wird einer Maus Muschelextrakt intraperitoneal injiziert und die Zeit bis zum Tode gemessen. Der Bioassay hat den Vorteil, in einem relativ einfachen Arbeitsgang alle PSP-Toxine zu erfassen (7).

Da dieser Bioassay aber aus ethischen Gründen problematisch ist, wurde auf dem Gebiet des chemischen Nachweises von Saxitoxin schon seit den frühen

siebziger Jahren geforscht. Zahlreiche Ersatzmethoden zur Bestimmung der PSP-Toxine sind bereits publiziert worden: dünn- (8) und hochdruckflüssigkeitschromatographische (3, 9–11) sowie fluorimetrische (12–15) und enzym-immunologische Methoden (16, 17).

Ein verbindliches chemisch-analytisches Verfahren existiert bis heute in der Schweiz noch nicht.

Da Tierversuche so weit als möglich ersetzt werden sollen und die kantonalen Laboratorien auf eine chemische Methode angewiesen sind, soll mit der vorliegenden Arbeit durch Kombination von bereits bestehenden Methoden ein einfacher Nachweis ausgearbeitet und auf seine Tauglichkeit hin geprüft werden.

Wichtige Kriterien dabei sind, dass die Methode insbesondere keine falsch negativen und auch möglichst wenig falsch positive Ergebnisse liefert und dass sie für die Routine geeignet ist, das heisst, dass sowohl der apparative als auch der materielle und zeitliche Aufwand nicht zu gross ist.

Mit einem einfachen standardisierten Nachweis soll eine Methode zur Verfügung stehen, die sowohl bei der Kontrolle von Stichproben als auch beim erneuten Auftreten einer Vergiftung angewendet werden kann.

Vorgehensweise

Für die Probenvorbereitung wurden im wesentlichen die Methoden von *Hellwig* und *Petuley* (14) und von *Preun* et al. (3) verwendet. Die optimalen Messbedingungen wurden experimentell bestimmt.

Wichtige Bestandteile der Arbeit waren die Prüfung der Methoden, die quantitative Auswertung der Ergebnisse und der Vergleich der Resultate von Bioassay und Fluoreszenzmessung. Eine ähnliche Gegenüberstellung von Ergebnissen aus diesen beiden Methoden findet sich in der Literatur nur bei *Shoptaugh* (15), doch lassen sich diese nicht direkt mit denjenigen der vorliegenden Arbeit vergleichen.

In zusätzlichen Versuchen wurde abgeklärt, ob Saxitoxin auch mittels Dünnschichtchromatographie in Muschelkonserven nachgewiesen werden kann. Es wurde dabei im wesentlichen nach der Methode von *Buckley* et al. (8) gearbeitet.

Material und Methoden für die chemisch-physikalische Analyse

Material

Saxitoxin *Gonyaulax* sp. 1 µmol/ml in 1 ml 0,1 m Essigsäure, Calbiochem. Corporation, San Diego, California, USA

Bio-Rex 70, 50–100 mesh, Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA

Trichloressigsäure, p.a.; Salzsäure rauchend 37%, p.a.

Kaliumhydroxidplättchen p.a.; Essigsäure 100% p.a.; Perhydrol® 30% H₂O₂ p.a.; Kaliumacetat reinst; Pyridin p.a.; Ethylacetat p.a.; HPTLC-Folien, Kieselgel 60 (ohne Fluoreszenzindikator); Spezialindikator pH 4,0–7,0 nicht blutend; alles Merck, Darmstadt, Deutschland

Faltenfilter Ø 125 mm LS 14,5, Schleicher & Schuell AG, Feldbach, Schweiz

Millipore-Filter, Filter-Typ GSWP, Porengrösse 0,22 µm, Millipore SA, Molsheim, Frankreich

Fluoreszenzphotospektrometer: Luminescence spectrometer Perkin Elmer LS 50

Hellma Präzisionsküvetten, Nr. 101 QS, Schichtdicke 10 mm

Messbedingungen: Anregungswellenlänge: 338 nm
Emissionsspektrum: 360–420 nm
Anregungsschlitz-Weite: 2,5 nm
Emissionsschlitz-Weite: 5,0 nm
Messgeschwindigkeit: 350 nm/min

DC-Scanner: Camag TLC-Scanner II mit cats 3-software

Messbedingungen: Quecksilber-Lampe

Fluoreszenz-Messung

Anregungswellenlänge: 366 nm

Untersuchungsmaterial: – am Institut für Toxikologie bereits
aufgearbeitete und mit Bioassay analysierte Muschel-
und Konservenproben aus dem Jahre 1987
– «Mejillones en escabeche»,
Pfahlmuscheln in Marinade, aus Vigo (E)

Methoden

Säulenvorbereitung

250 ml Bio-Rex 70 50–100 mesh werden in einem 800-ml-Becherglas wie folgt aufgeschlämmt:

- 3 x 40 min mit je 160 ml 3 m HCl
- mit dest. Wasser neutral waschen
- 3 x 40 min mit je 160 ml 3 m KOH
- mit dest. Wasser neutral waschen
- 2 x 30 min mit je 160 ml 0,2 m Essigsäure
- mit 0,2 m Essigsäure auf 750 ml auffüllen
- mit Eisessig auf pH 5,2 einstellen (*Vorsicht, das Gleichgewicht stellt sich nicht sofort ein!*)

Das so vorbereitete Material (2 ml) wird in eine Pasteurpipette, die im unteren Ende mit einem Wattebausch verschlossen ist, gespült. Als Reservoir kann eine 20-ml-Einwegspritze, welche mit einem kurzen Schlauchstück als Verbindung auf die Pipette aufgesetzt wird, dienen. Das konditionierte Säulenmaterial sollte im Kühlschrank gelagert werden.

Probenaufbereitung

1. Aufbereitung der Muscheln und Konserven

Der abgetropfte Inhalt einer Konserve oder der essbare Anteil bei Muscheln wird mit 0,1 m HCl 1:1 versetzt und in einem Labormixer oder mit einem Polytron homogenisiert. Die Lösung kann tiefgekühlt aufbewahrt werden.

2. Aufbereitung der homogenisierten Proben

Vom Homogenat werden 6 g mit 9 ml 0,5 m Trichloressigsäure in 0,1 m HCl in ein Becherglas gegeben und mit einem beheizbaren Magnetrührer 10 min bei 100 °C unter Rühren erhitzt. Anschliessend wird die Probe ohne abzukühlen in ein Zentrifugenglas gefüllt und 30 min lang bei 1200 g zentrifugiert. Bei trüben Proben und zur Abtrennung des Fettes wird der Überstand durch ein feuchtes Faltenfilter filtriert, wobei die ersten 2–3 ml verworfen werden.

Für eine Doppelbestimmung werden 2 x 5 ml des Filtrates oder des klaren Zentrifugenüberstandes mit 2,0 m KOH auf pH 5,2 eingestellt (ggf. mit Eisessig zurückstellen) und auf die vorbereiteten Säulen gegeben. Störende Begleitstoffe werden mit je 30 ml 0,2 m Kaliumacetatpuffer pH 5,2, 25 ml destilliertem Wasser und 1,0 ml 0,5 m HCl herausgewaschen. Die Elution der Saxitoxinfraktion erfolgt anschliessend mit 4,0 ml 0,5 m HCl.

Das ganze Eluat wird mit 240 µl 50% KOH-Lösung alkalisiert. Für die Oxidation werden 90 µl 6,0% Wasserstoffperoxidlösung zugegeben, und anschliessend wird die Probe 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss stehen gelassen. Dabei werden die PSP-Toxine vom Typ Saxitoxin zu fluoreszierenden Derivaten oxidiert. Nach Zugabe von 80 µl Eisessig wird die Probe sofort gemessen. Ist diese noch trübe, muss sie vor dem Messen nochmals 5 min bei 1500 g zentrifugiert werden und eventuell bei Bedarf noch durch einen Millipore-Filter (Porengrösse 0,22 µm) filtriert werden.

Standardaufbereitung

Zu je 4 ml 0,5 m HCl werden 100, 200, 300 und 400 ng Saxitoxin/ml zugegeben. Zu diesen Standardlösungen gibt man je 320 µl 50% KOH und 90 µl 6,0% Wasserstoffperoxidlösung und lässt diese ebenfalls 30 min bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss stehen. Nach der Zugabe von 80 µl Eisessig wird sofort gemessen.

Recovery mit Saxitoxin-Standardlösung

4 (1200 ng) bzw. 8 µl (2400 ng) Saxitoxinstandard werden mit 15 ml 0,5 m Trichloressigsäure in 0,1 m HCl in einem Becherglas gemischt und auf einem beheizbaren Magnetrührer während 10 min erhitzt.

Von der abgekühlten Lösung wird für eine Doppelprobe 2 x 5 ml herauspipetiert und mit 2 m KOH auf pH 5,2 eingestellt. Dann werden die Proben auf die Säulen gegeben und wie die Muschelproben weiterbehandelt.

Recovery von Saxitoxin als Zusatz zu Muschelproben

Zu verschiedenen negativen und positiven Muschelproben wird Saxitoxin zugesetzt und diese werden wie unter «Aufbereitung der homogenisierten Proben» behandelt.

Dünnschichtchromatographie

1. Aufbereitung des Standards zur Eichung der Methode

Saxitoxin-Standard wird mit 0,01 m Essigsäure 1:10 und 1:100 verdünnt. Von diesen Verdünnungen sowie auch vom unverdünnten Standard wird je nach gewünschter Konzentration zwischen 1 und 10 µl direkt auf die DC-Platte aufgetragen.

2. Recovery mit Saxitoxin-Standardlösungen

Zu 5 ml 0,5 m Trichloressigsäure in 0,1 m HCl werden 6 µg (20 µl) bzw. 12 µg (40 µl) Saxitoxin zugegeben und 10 min erhitzt. Die abgekühlten Lösungen werden mit 2 m KOH auf pH 5,2 eingestellt und wie unter «Aufbereitung der homogenisierten Proben» beschrieben, weiterbehandelt. Die Eluate mit der Saxitoxin-Fraktion werden mit 50% KOH auf pH 4–5 eingestellt und davon je 20 µl direkt auf die DC-Platte aufgetragen.

3. Probenaufbereitung mit und ohne Saxitoxin-Zusatz

6 ml homogenisierte Probe werden mit 4 ml 0,5 m Trichloressigsäure in 0,1 m HCl gemischt. In ein zweites Becherglas mit dem gleichen Inhalt gibt man noch zusätzlich 36 µg (120 µl) Saxitoxin dazu. Die beiden Bechergläser werden während 10 min bei 100 °C erhitzt. Die Proben werden heiss während 30 min zentrifugiert, anschliessend filtriert und wie unter «Aufbereitung der homogenisierten Proben» weiterbehandelt. Die Eluate mit der Saxitoxin-Fraktion werden mit 50% KOH auf pH 4–5 eingestellt. Von diesen Lösungen werden direkt je 20 µl auf die DC-Platte aufgetragen.

4. DC-Bedingungen

Die DC-Platte, auf der zwecks Eichung immer auch Standard aufgetragen wird, wird in eine gesättigte DC-Kammer mit dem folgenden Laufmittel gestellt: Pyridin (50 ml), Ethylacetat (15 ml), destilliertes Wasser (20 ml) und Eisessig (10 ml).

Ist die Front bei 110–120 mm, kann die Platte herausgenommen werden. Die trockene Platte wird für die Oxidation mit 1,5%iger H₂O₂-Lösung besprüht und während 30 min bei 100 °C gehalten.

Anschliessend kann die Platte gemessen werden. Mit der Quecksilberlampe wird bei 366 nm von jeder Bahn ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Die quantitative Auswertung der entsprechenden Peaks wird über die Fläche vorgenommen.

Bioassay

Methode

Der Bioassay wird nach der AOAC-Methode durchgeführt (7, 18). Im vorliegenden Fall wurden als Versuchstiere männliche Mäuse des Stammes CD-1 verwendet.

Das Fleisch verdächtiger Muscheln wird homogenisiert und ein Aliquot davon mit 0,1 m Salzsäure versetzt (siehe auch «Aufbereitung der Muscheln und Konserven») und das pH auf ca. 3–4 eingestellt. Die angesäuerte Mischung wird 5 min lang zum Sieden gebracht und nachher auf Zimmertemperatur abgekühlt und anschließend auf ein definiertes Volumen aufgefüllt und filtriert. 1 ml des Filtrates wird einer ca. 20 g schweren Maus intraperitoneal eingespritzt. Die Überlebenszeiten dieser Mäuse sollten zwischen 3 und 15 min liegen. Überlebenszeiten über 15 min lassen keine sicheren quantitativen Aussagen zu. Gleichzeitig ist eine Testserie (Eichung) mit einer Saxitoxin-Standardlösung durchzuführen. Die Empfindlichkeit der einzelnen Mäusestämme auf Saxitoxin ist sehr unterschiedlich. Nach AOAC-Vorschrift entspricht 1 Mäuseeinheit derjenigen Toxinmenge, durch die eine 20 g schwere Maus nach 15 min getötet wird. Deshalb muss zur Umrechnung von Mäuseeinheiten in Mikrogrammäquivalente laborintern bestimmt werden, wieviel Nanogramme Saxitoxin einer Mäuseeinheit entsprechen. Im vorliegenden Versuch wurde die Eichung mit reinem verdünntem Saxitoxin-Standard bei nur einer Konzentration vorgenommen, da der ungefähre Gehalt der Proben bereits aus chemischen Analysen bekannt war. Die fünf Proben nKo 1–5 (neue Konserve) wurden aus statistischen Gründen je 5 x gemessen. Pro Versuchstier erhält man ein Resultat.

Zur Berechnung der Ergebnisse muss mittels Gewichtskorrekturtabellen (7) das unterschiedliche Gewicht der Tiere auf 20 g normiert werden. Mit Hilfe der Eichwerte und der Tabelle nach *Sommer* (7) lässt sich sodann aus den Überlebenszeiten der Mäuse die Saxitoxinmenge der Proben berechnen.

Schwierig ist es, die genaue Überlebenszeit der Mäuse festzustellen. Als Überlebenszeit wird der Zeitpunkt des letzten Atemzuges der Testmaus gewertet. Dieser ist jedoch bei den schwachen Bewegungen der bereits bewusstlosen Tiere kaum wahrnehmbar.

Ein weiteres Problem ist die Aufbereitung von marinade- oder saucehaltigen Konserven, in welchen viel Natriumchlorid enthalten ist. Kochsalz hat eine stark antagonistische Wirkung gegenüber Saxitoxin. Es wurde gezeigt, dass die Natriumionen die Giftwirkung von Saxitoxin im Tierversuch drastisch herabsetzen (19), was mit dem Wirkungsort des Saxitoxins in der Nervenmembran erklärt wird.

Um sicher zu gehen, dass die unterschiedlichen Resultate bei der Fluoreszenz und des Bioassay nicht allein auf die antagonistische Wirkung des Kochsalzes, welches in den Konserven vorhanden ist, zurückzuführen sind, wurde noch folgender Versuch durchgeführt: Das unoxidierte Eluat der Säule der positiven Probe nKo 3 wurde auf pH 3–4 eingestellt und direkt je 1 ml 2 Mäusen injiziert. Die

eingespritzte Probenmenge entsprach einem Viertel derjenigen Menge, welche bei den vorhergehenden Bioassays verwendet wurde.

Resultate

Recovery

Die Recovery von Saxitoxin-Standard, bei einem Zusatz von 40 bzw. 80 µg/100 g, lag durchschnittlich bei 54%.

Versuche, bei denen der erste Milliliter Salzsäure, der unmittelbar vor der Elution auf die Säule gegeben wird (siehe unter «Aufbereitung der homogenisierten Proben»), sowie eine Nachelution mit 4 ml Salzsäure, die ebenfalls oxidiert und gemessen wurden, haben ergeben, dass darin nur Spuren von fluoreszierenden Substanzen enthalten sind.

Bei Proben, welchen 100 bzw. 200 µg Saxitoxin/100 g Probe zugesetzt wurden, lag die Wiederfindungsrate zwischen 35 und 50%, das heisst 65–94% im Vergleich zu den Versuchen mit Saxitoxin allein ohne Muschelfleisch.

Bei der Berechnung der Resultate wurde eine Recovery von 54% verwendet.

Resultate von Proben, welche im Bioassay bereits analysiert worden waren

Tabelle 1 zeigt Resultate von Proben, welche alle aus dem Jahre 1987 stammen. Die Ergebnisse des Bioassay stammen aus demselben Jahr, die Fluoreszenzmessungen (FM) wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

Bei den FM wurde jeweils ein Spektrum (360–420 nm) aufgenommen. Die Anregungswellenlänge lag bei 338 nm, das Emissionsmaximum zwischen 378 und 385 nm. Zur Blindwertbestimmung wurde das Spektrum von Wasser aufgenommen.

Bei sämtlichen im Bioassay negativen Proben wurden auch mit der FM nur Spuren von fluoreszierenden Stoffen gefunden. Es darf mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass der Saxitoxin-Gehalt in diesen Muschelproben unter 5 µg/100 g Fleisch liegt.

Bei den im Bioassay positiven Proben wurden mittels FM ebenfalls nur positive Werte gefunden, die aber um den Faktor 2,5–5,2 (Korrekturfaktor KF) höher lagen als diejenigen des Bioassay.

Mit den Messungen der vereinigten Proben 217/218/219, die wie alle anderen positiven Proben aus dem spanischen Ort Vigo stammten, sollte in erster Linie die Reproduzierbarkeit getestet werden, da nur bei dieser Probe noch genügend Material für mehrere Messungen vorhanden war.

Tabelle 1. Analysenresultate aus FM und Bioassay

Proben-Nr.	µg/100 g im Bioassay	µg/100 g mit Fluoreszenz	KF
1	negativ	< 5	
6	negativ	< 5	
8	negativ	< 5	
159	negativ	< 5	
160	negativ	< 5	
161	negativ	< 5	
162	negativ	< 5	
163	negativ	< 5	
194	54	146	2,7
195	110	282	2,6
19	40	101	2,5
46	40	208	5,2
92	80	224	2,8
217/218/219		139	3,5
217/218/219		127	3,2
217/218/219		149	3,7
217/218/219	40	145	3,6
217/218/219		127	3,2
217/218/219		154	3,9
217/218/219		$\bar{x} = 140, VK = 8$	$\bar{x} = 3,5$

Die Resultate der Analysen, welche an mehreren Tagen durchgeführt wurden, zeigen nur kleine Abweichungen untereinander. Auch diese Werte liegen alle um den Faktor 3,2–3,9 (KF) über dem Wert des Bioassay.

Resultate der Proben nKo 1–nKo 5

Aus einem Batch positiver Muschelkonserven, welcher im Jahre 1987 beschlagnahmt worden war (Ablaufdatum Ende 1991), waren noch 5 ungeöffnete Dosen (nKo 1–nKo 5) vorhanden.

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse aus dem Bioassay sowie aus der FM. Der Bioassay wurde an einem einzigen Tag durchgeführt, die Resultate der FM stammen von verschiedenen Tagen.

Die Saxitoxin-Gehaltberechnungen beim Bioassay erfolgten nach der Sommer'schen Tabelle (7).

Aus der Tabelle 2 kann entnommen werden, dass die Werte der Doppelbestimmungen (DP 1 und 2) der Proben bei der FM teilweise weit auseinander liegen. Der Durchschnitt dieser Ergebnisse ergab jedoch immer wieder Werte, die im Bereich der übrigen Resultate lagen, bei denen die Doppelbestimmungen nur geringfügig voneinander abwichen.

Tabelle 2. Analysenresultat von Bioassay und FM

Proben-Nr.	Zeit bis zum Tod	Bioassay µg/100 g	DP 1	DP 2	Ø FM µg/100 g	KF
nKo 1	4'30"	86	519	606	562	
nKo 1	4'30"	90	490	465	478	
nKo 1	4'35"	84	607	560	590	
nKo 1	4'15"	93	570	523	547	
nKo 1	4'40"	82	375	394	358	
nKo 1	—	—	416	440	430	
nKo 1		$\bar{x} = 87, VK = 5$			$\bar{x} = 499, VK = 16$	5,7
nKo 2	4'40"	86	414	166	290	
nKo 2	4'20"	93	286	301	294	
nKo 2	4'00"	97	427	379	403	
nKo 2	5'40"	68	329	372	351	
nKo 2	4'10"	93	281	323	302	
nKo 2	—	—	281	301	291	
nKo 2		$\bar{x} = 87, VK = 14$			$\bar{x} = 322, VK = 14$	3,7
nKo 3	3'00"	147	716	446	581	
nKo 3	3'00"	143	560	544	550	
nKo 3	2'55"	150	613	588	600	
nKo 3	3'20"	125	628	513	570	
nKo 3	2'45"	168	492	604	548	
nKo 3	—	—	563	536	550	
nKo 3		$\bar{x} = 147, VK = 10$			$\bar{x} = 567, VK = 4$	3,9
nKo 4	7'45"	50	370	341	355	
nKo 4	4'45"	86	530	527	528	
nKo 4	5'30"	72	610	465	537	
nKo 4	4'10"	97	440	431	436	
nKo 4	5'00"	79	486	480	483	
nKo 4	—	—	373	410	392	
nKo 4		$\bar{x} = 77, VK = 22$			$\bar{x} = 455, VK = 16$	5,9
nKo 5	3'00"	154	386	504	440	
nKo 5	3'10"	132	668	665	666	
nKo 5	2'55"	154	594	511	552	
nKo 5	3'30"	122	565	455	510	
nKo 5	3'30"	118	541	495	518	
nKo 5	—	—	483	561	552	
nKo 5		$\bar{x} = 136, VK = 12$			$\bar{x} = 540, VK = 14$	4,0

Der zusätzliche Bioassay zur Abklärung des Einflusses des Kochsalzes, welcher unter «Bioassay» erwähnt ist, fiel negativ aus. Die Eluatmenge, die von Probe nKo 3 je zwei Mäusen injiziert wurde, hatte keinen Effekt. Die beiden Mäuse zeigten auch nach 15 min keine Vergiftungserscheinungen.

Resultate der Dünnschichtchromatographie

Die Nachweisgrenze mit DC liegt bei 10 ng Saxitoxin auf der Platte, was umgerechnet ca. 150 µg/100 g Muschelfleisch entspricht. Die Eichgerade war im Bereich von 10–900 ng linear. Höhere Konzentrationen wurden nicht gemessen.

Die Recovery mit Saxitoxin-Standard-Lösungen (siehe «Recovery mit Saxitoxin-Standardlösungen») lag mit 67% etwas höher als bei der Gesamtfluoreszenzmessung. Die R_f -Werte des Fluoreszenzsignals lagen beim Saxitoxin-Standard bei 0,58, bei den Proben zwischen 0,58 und 0,64.

Bei der Aufbereitung der am stärksten positiven Probe (nKo 3) konnte im DC der Saxitoxin-Peak zwar noch eindeutig identifiziert werden, die Menge lag jedoch mit 10 ng gerade an der Nachweisgrenze.

Diskussion

Aus den Resultaten geht eindeutig hervor, dass die chemisch-physikalische Methode mittels Gesamtfluoreszenzmessung zuverlässig ist. Bei keiner der analysierten Proben konnten falsch positive oder falsch negative Resultate beobachtet werden.

Die Recovery von 54% liegt in dem bereits von anderen Autoren erwähnten Bereich. So berichtet *Luckas* (11) davon, dass bei der Elution des Kationenaustauschers mit einem Elutionsmittel, das Salzsäure enthält, noch bis zu 50% Saxitoxin auf der Säule bleiben.

Die Eichgerade, die bei jeder Messung mittels Saxitoxin-Standard (siehe unter «Standardaufbereitung») ermittelt wurde, war im Bereich bis zu 400 ng/ml Messlösung linear. Höhere Konzentrationen wurden nicht geprüft.

Die Reproduzierbarkeit der Resultate scheint probenabhängig zu sein. Während bei den Proben 217/218/219 und nKo 3 die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse keine Schwierigkeiten bereitete, zeigten die Proben nKo 1, nKo 2, nKo 4 und nKo 5 von Tag zu Tag verhältnismässig grosse Schwankungen. Übermässige Abweichungen bedingt durch einen unterschiedlichen Analysenablauf können ausgeschlossen werden. Die Erklärung für die unterschiedliche Reproduzierbarkeit der einzelnen Proben liegt vermutlich bei den Proben selbst.

Wahrscheinlich treten bei Konserven mehr Probleme mit der Reproduzierbarkeit auf als bei Frischmuscheln, da durch die Marinade und die Gewürze, in welchen die Muscheln eingelegt sind, wesentlich mehr Störstoffe vorhanden sind.

Betrachtet man die Variationskoeffizienten (VK) der Resultate von FM und Bioassay (Tabelle 2), liegen diese alle in einem ähnlichen Bereich. Die Resultate des chemisch-physikalischen Nachweises von Saxitoxin sind somit etwa gleich genau wie diejenigen des Bioassay. Positiv zu vermerken ist dazu noch, dass die Nachweisgrenze bei der Fluoreszenzmessung wesentlich tiefer liegt (5 µg/100 g) als beim Bioassay (40 µg/100 g).

Bereits andere Autoren haben die Beobachtung gemacht (3, 15), dass mittels Fluoreszenz durchwegs höhere Werte gemessen werden als beim Bioassay. Eine direkte Gegenüberstellung von Resultaten aus den beiden Methoden findet sich jedoch nur bei *Shoptuagh* (15). Auch sie findet fast durchwegs erhöhte Werte, jedoch nur um maximal 50% gegenüber den Ergebnissen aus dem Bioassay. Die Erkenntnisse dieser Arbeit lassen sich jedoch aus folgenden Gründen nicht mit den vorliegenden Ergebnissen vergleichen: Erstens wurde für die Fluoreszenzmessung eine nach *Shoptuagh* modifizierte Methode von *Bates* und *Rapoport* angewendet, und zweitens stammten jene Muscheln aus dem Gebiete von New England und weisen sehr wahrscheinlich eine andere Toxinzusammensetzung auf als die in diesem Versuch verwendeten spanischen Muscheln.

Die erhöhten Werte werden hauptsächlich darauf zurückgeführt, dass nicht nur Saxitoxin, sondern auch die dem Saxitoxin strukturell verwandten Gonyautoxine und das Neo-Saxitoxin fluoreszieren (22). Da die akute Toxizität dieser Gifte aber, mit Ausnahme des Neo-Saxitoxins, wesentlich geringer ist als diejenige des Saxitoxins (3, 20), die Fluoreszenz aber zumindest gleich intensiv wenn nicht stärker ist, ergeben sich zwangsläufig die beobachteten Abweichungen zwischen den Resultaten der FM und des Bioassay. Dieser Umstand ist wohl der Hauptgrund dafür, dass die Ergebnisse bei dieser Art von chemischem Nachweis um den Faktor 3–5 höher sind als die toxische Wirkung beim Bioassay.

Was die verschiedenen Toxine und ihr Vorkommen in Muscheln betrifft, ist zu bemerken, dass sich die einzelnen Dinoflagellatenstämme in ihrem Toxinbildungsvermögen erheblich unterscheiden (21). Hinsichtlich der Giftigkeit der Muscheln wurden starke regionale Unterschiede festgestellt. Man geht davon aus, dass jeder Stamm sein eigenes Toxinspektrum aufweist.

Werden nun vorwiegend Muscheln aus der gleichen Region untersucht (was in der Schweiz meist zutrifft, da diese mehrheitlich aus Spanien aus der Region von Vigo importiert werden), kann davon ausgegangen werden, dass das Toxinmuster dieser Muscheln relativ konstant bleibt und so auch die erhöhten Werte der Fluoreszenzmessung mittels Division durch einen konstanten Faktor (KF) korrigiert werden können. Bei den Resultaten aus Tabelle 1 liegt dieser Korrekturfaktor mehrheitlich zwischen 2,5 und 3,9, bei den Ergebnissen aus Tabelle 2 zwischen 3,7 und 5,9.

Die Differenz zwischen den beiden Tabellen diesbezüglich kann damit begründet werden, dass bei den Proben aus Tabelle 1 zwischen dem Bioassay und der Fluoreszenzmessung vier Jahre liegen. Obwohl die Proben bei -20°C tiefgeköhlt gelagert worden waren, ist anzunehmen, dass im Probenmaterial Abbaureaktionen zur Reduktion des Gehaltes der PSP-Toxine geführt haben. Bei den Resultaten aus Tabelle 2 wurden alle Analysen innerhalb weniger Tage durchgeführt. Daher entspricht der Korrekturfaktor aus Tabelle 2 besser den wirklichen Verhältnissen. Andere Gründe, die ebenfalls zu erhöhten Werten bei der FM führen können, sind – vor allem bei Konserven – andere Inhaltsstoffe, die ebenfalls fluoreszieren, aber nicht toxisch sind.

Der Einfluss des Kochsalzes, der beim Bioassay antagonistisch zum Saxitoxin wirkt (19), könnte ebenfalls für die höheren Ergebnisse bei der FM mitverantwort-

lich sein. Dass dies aber nicht der alleinige Grund für die erhöhten Werte ist, konnte mittels Bioassay gezeigt werden (siehe unter «Methode»). Das Eluat, das den Mäusen gespritzt wurde, enthielt kein Salz mehr und entsprach einem Viertel der üblichen Probenmenge. Wäre in diesem Eluat die bei der FM gemessene Menge Saxitoxin tatsächlich vorhanden gewesen, so hätte dies innerhalb von 4 Minuten zum Tod der Mäuse geführt. Da diese aber auch nach 15 Minuten noch keine Vergiftungssymptome zeigten, kann daraus der Schluss gezogen werden, dass der Effekt des vorhandenen Kochsalzes sicher weniger als 50% der Erhöhung ausmacht.

Bei den Dünnschichtversuchen konnten die Ergebnisse von *Buckley et al.* (8) teilweise bestätigt werden. Der R_f -Wert für Saxitoxin von 0,58 entspricht dem von *Buckley* ermittelten Wert. Auch die Nachweisgrenze von 10 ng konnte bestätigt werden.

Was im Gegensatz zu *Buckley* bei diesen Proben nicht beobachtet wurde, war eine Auftrennung der verschiedenen Toxine. Es konnte nur ein einziger Peak bei der erwarteten Saxitoxin-Position gefunden werden.

Mit diesen Resultaten wird eindeutig, dass der dünnschichtchromatographische Nachweis gegenüber der Gesamtfluoreszenzmessung keine Vorteile besitzt. Die Nachweisgrenze liegt mit $150 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ um den Faktor 30 höher als bei der FM. Da mit den vorliegenden Proben keine Auftrennung der verschiedenen Toxine stattgefunden hat, liefert die Dünnschichtchromatographie auch keine zusätzlichen Informationen.

Für die Routineanwendung der Fluoreszenzmessung wird vorgeschlagen, für die Berechnung des Saxitoxins einen Korrekturfaktor von 4 zu wählen. Dies bedeutet, dass alle mittels Fluoreszenzmessung erhaltenen Resultate noch durch den Faktor 4 dividiert werden müssen, um den Gehalt an Saxitoxin in der jeweiligen Probe zu ermitteln. (Für diese Empfehlung wurden nur die Resultate aus Tabelle 2 berücksichtigt.) In Grenzfällen können mit Hilfe mehrerer Messungen die Resultate statistisch besser gesichert werden. Ein Bioassay an einer einzelnen Maus wird in einem solchen Fall nicht empfohlen, da dieses Resultat nicht mehr Klarheit bringen würde.

Ein anderer Lösungsvorschlag, bei welchem der Korrekturfaktor umgangen werden könnte, wäre, den Grenzwert nicht für Saxitoxin, sondern generell für alle *PSP-Toxine* festzulegen. Da diese bei der Fluoreszenzmessung gesamthaft erfasst werden, wäre ein solcher Grenzwert bei der Anwendung des hier vorgestellten Nachweises wesentlich geeigneter. Die Resultate der FM müssten nicht mehr in Abhängigkeit des Bioassay beurteilt, sondern könnten direkt für die Beurteilung der Muscheln verwendet werden.

Ausgehend von dem für den Biotest festgelegten Grenzwert von $80 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ Muschelfleisch, welcher in unserem Probenmaterial einer Gesamtfluoreszenz von $320 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ entspricht, wird als Grenzwert für die Gesamt-PSP-Toxine $300 \mu\text{g}$ Saxitoxin-Fluoreszenzäquivalente/100 g vorgeschlagen. Dies entspricht der Toxizität von $75 \mu\text{g}$ Saxitoxin/100 g. Diese Angaben gelten vorderhand für spanische Muscheln.

Als Schlussfolgerung ergibt sich somit, dass der hier vorgestellte chemisch-physikalische Nachweis der PSP-Toxine mittels Fluoreszenzmessung einen guten Ersatz für den Bioassay darstellt: Die Ergebnisse sind dem Bioassay gleichwertig und die Durchführung der Methode ist einfach, schnell und für die Routine gut geeignet.

Zusammenfassung

Ein bereits bestehendes chemisch-physikalisches Nachweisverfahren für PSP-Toxine in Muscheln durch Gesamtfluoreszenzmessung wurde geprüft und leicht modifiziert.

Anhand von Analysen positiver und negativer Proben, deren Gehalt von Tierversuchen her bereits bekannt war, wurden die Resultate quantitativ ausgewertet und den Ergebnissen aus dem Bioassay gegenübergestellt.

Die konstant höheren Werte aus der Fluoreszenzmessung wurden hauptsächlich auf das Vorhandensein von Toxinen zurückgeführt, die weniger giftig sind als Saxitoxin und deswegen im Bioassay weniger gut erfasst werden, die aber gleichwohl fluoreszieren.

Die aus der Fluoreszenz gewonnenen Resultate können nun entweder durch einen konstanten Faktor dividiert werden, um so den Gehalt an Saxitoxin zu ermitteln, oder es kann ein Grenzwert für alle PSP-Toxine zusammen festgelegt werden, womit die Resultate aus der Fluoreszenzmessung für die Beurteilung der Muschelproben direkt verwendet werden können. Der Nachweis von Saxitoxin mit Dünnschichtchromatographie bringt gegenüber der Gesamtfluoreszenzmessung keine Vorteile.

Obwohl die Ergebnisse von Bioassay und Fluoreszenzmessung unterschiedlich scheinen, konnte gezeigt werden, dass der chemisch-analytische Nachweis ein guter Ersatz für den Bioassay ist.

Résumé

Une méthode physicochimique pour l'analyse des toxines PSP dans les moules par la détermination de la fluorescence a été examinée et légèrement modifiée.

Les résultats de l'analyse d'échantillons d'une teneur de toxines connue ont été évalués et comparés avec ceux du bioassay (souris).

Les valeurs régulièrement plus élevées, obtenu lors de la détermination de la fluorescence, sont dues à la présence de toxines moins toxiques que la saxitoxine. C'est pour cette raison que ces substances fluorescentes sont moins bien détectables par le bioassay.

Les résultats de la méthode de fluorescence peuvent soit être divisés par un facteur constant afin d'obtenir la teneur en saxitoxine, soit on fixe une valeur limite pour toutes les toxines PSP ensemble ce qui permet d'évaluer directement les échantillons de moules. La détermination de la saxitoxine par chromatographie sur couche mince n'apporte pas d'avantages par rapport à la méthode de fluorescence.

Il a été démontré que l'analyse physicochimique peut très bien remplacer le bioassay, ceci malgré le fait que les résultats des deux méthodes soient quelque peu différents.

Summary

A chemical-analytical method for PSP-toxins in mussels using fluorescence measurement was evaluated and slightly modified.

The results of the analysis of samples with known PSP-toxin content were evaluated and compared with results obtained with the mouse bioassay.

The consistently higher values of the fluorescence method were mainly due to the presence of toxins that are less toxic than saxitoxin and therefore less readily detectable in the bioassay, but which are nevertheless fluorescent.

The results of the fluorescence method can either be divided by a constant factor to arrive at the content of saxitoxin or a limit value for all PSP-toxins together can be established.

The analysis of saxitoxin by thin-layer chromatography has no advantages over the fluorescence method.

Despite the somewhat different results of the two methods, the fluorescence measurement is a good and ethical replacement for the mouse bioassay.

Literatur

1. *Reuhl, J. und Mebs, D.*: Vergiftungen durch Muscheln. *Med. Mschr. Pharmazeuten* **5**, 132–136 (1991).
2. *Schantz, E.J. et al.*: The structure of saxitoxin. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 1238–1239 (1975).
3. *Preun, J. et al.*: Eine einfache Methode zur routinemässigen Überprüfung von Muscheln und Muschelprodukten auf Saxitoxin durch HPLC mit Fluoreszenzdetektion. *Deut. Lebensm.-Rundschau* **84**, 114–116 (1988).
4. *Fülgraff, G.*: Lebensmitteltoxikologie, UTB 1515, S. 223–225. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart 1989.
5. *Halstead, B.W. and Schantz, E.J.*: Paralytic shellfish poisoning. WHO Offset Publication, No. 70. WHO, Genf 1984.
6. *Zweifel, U.*: Toxikologisches Institut der ETH und der Universität Zürich, persönliche Mitteilung.
7. *Official Methods of Analysis*, AOAC, Arlington, VA, 13th Ed. 18.079–18.085 (1980).
8. *Buckley, L.J. et al.*: Isolation of *Gonyaulax tamarens* toxins from soft shell clams (*Mya arenaria*) and a thin-layer chromatographic-fluorimetric method for their detection. *J. Agric. Food Chem.* **24**, 107–111 (1976).
9. *Jonas-Davies, J. et al.*: Semi-automated method for analysis of PSP (paralytic shellfish poisoning) toxins in shellfish. *J. Food Science* **49**, 1506–1509 (1984).
10. *Sullivan, J.J. and Iwaoka, W.T.*: High pressure liquid chromatographic determination of toxins associated with paralytic shellfish poisoning. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **66**, 297–303 (1983).
11. *Luckas, B.*: Die Bestimmung von Saxitoxin in Muschelkonserven durch HPLC mit Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion. *Deut. Lebensm.-Rundschau* **83**, 379–381 (1987).
12. *Bates, H.A. and Rapoport, H.*: A chemical assay for saxitoxin, the paralytic shellfish poison. *J. Agric. Food Chem.* **23**, 237–239 (1975).
13. *Bates, H.A., Kostriken, R. and Rapoport, H.*: A chemical assay for saxitoxin. Improvements and modifications. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 252–253 (1978).

14. *Hellwig, E. und Petuley, F.*: Bestimmung von Saxitoxin in Muschelkonserven. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* **171**, 165–169 (1980).
15. *Shoptaugh, N.H. et al.*: Use of fluorometry for the determination of *Gonyaulax tamarens* var. *excavata* toxins in New England shellfish. *J. Agric. Food Chem.* **29**, 198–200 (1981).
16. *Fun, S.C. and Fan, T.S.L.*: Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for saxitoxin in shellfish. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **68**, 13–16 (1985).
17. *Renz, V. und Terplan, G.*: Ein enzymimmunologischer Nachweis von Saxitoxin. *Archiv Lebensmittelhyg.* **39**, 25–26 (1988).
18. *Adams, W.N. and Miescier, J.J.*: Fish and other marine products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **63**, 1336–1343 (1980).
19. *Hashimoto, Y.*: Marine toxins and other bioactive marine metabolites, 39–59. Japan Scientific Societies Press, Tokyo 1979.
20. *Kao, C.Y. and Levinson, S.R.*: Tetrodotoxin, saxitoxin and the molecular biology of the sodium channel. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **479**, 52–67 (1986).
21. *Schulze, K.*: Muschelvergiftung durch Algentoxine. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **98**, 383–387 (1985).
22. *Shimizu, Y. et al.*: Analysis of toxic mussels (*Mytilus* sp.) from the Alaskan Inside Passage. *J. Agric. Chem.* **26**, 878–881 (1978).

Irène Rohr
 U. Zweifel
 Prof. Dr. med. et Dr. phil. II Ch. Schlatter
 Institut für Toxikologie der ETH und der
 Universität Zürich
 Schorenstrasse 16
 CH-8603 Schwerzenbach