

Masterarbeit
im Studiengang
Biotechnologie



LC-MS/MS basierte Analyse von Amphidinolen und weiteren marinen Phycotoxinen

Marvin Wellkamp
Matrikelnummer 31506

Erstprüfer: Prof. Dr. Boris Koch
Zweitprüfer: Dr. Bernd Krock

17. Februar 2020

Danksagung

Im Vorfeld möchte ich mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

Zunächst bedanke ich mich ganz herzlich bei Dr. Bernd Krock, der stets ein offenes Ohr für alle Belange praktischer und theoretischer Art hatte und mir bei aufkommenden Fragen hilfreich zur Seite stand. Außerdem danke ich ihm für die Ermöglichung der Teilnahme an der Forschungsfahrt mit der RV *Akademik*. Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Boris Koch dafür, dass er mich auf die ausgeschriebene Masterarbeit hingewiesen und diese schließlich seitens der Hochschule professionell betreut hat.

Herzlicher Dank gilt außerdem den weiteren Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe „Ökologische Chemie“ des Alfred-Wegener-Instituts für Polar- und Meeresforschung, allen voran Thomas Max und Annegret Müller für die technische Unterstützung und Einweisung in diverse Laborgeräte.

Den Crew-Mitgliedern und anderen Teilnehmern der erwähnten Forschungsfahrt, besonders Violeta und Nataliya Slabakova vom *Institute of Oceanology - Bulgarian Academy of Sciences*, danke ich für die tolle Zeit auf dem Schwarzen Meer und der Bereitstellung der benötigten Ausrüstung.

Nicht zuletzt gebührt meinen Eltern für die andauernde mentale und finanzielle Unterstützung während meines Studiums besonders großer Dank.

Zusammenfassung

Marine Phycotoxine werden von verschiedenen Planktonspezies produziert und weisen ein breites Wirkungsspektrum und eine hohe strukturelle Diversität auf, sodass sie in weitere Untergruppen kategorisiert werden.

Der erste Abschnitt dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem Auftreten von Schalentier-Toxinen an der Westküste des Schwarzen Meeres, welche große Auswirkungen auf die ansässige Muschelfischerei und -Aquakultur haben können. In einer vom 15. Mai bis 04. Juni 2019 andauernden Feldkampagne wurden 41 Stationen mithilfe eines 20 µm-Planktonnetzes beprobt und anschließend durch Flüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenzdetektion (engl. *liquid chromatography with fluorescence detection*, LC-FD) und Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) auf diverse Schalentier-Toxine untersucht. Bis auf Domoinsäure konnten alle erwarteten Toxine detektiert werden, wobei Yessotoxin in besonders großer Menge nachgewiesen wurde. Während mit der Probennahme durch Netzzüge die meisten Schalentier-Toxine abgedeckt werden konnten, erfolgte die Detektion von Azaspirosäuren (AZA) durch eine zusätzliche Probennahme. Dazu wurde an 79 Stationen Wasser aus definierten Tiefen filtriert und die Rückstände auf dem Filter mittels LC-MS/MS untersucht. Dieses besonders sensitive und für AZA spezialisierte Verfahren wurde erstmalig im Schwarzen Meer angewendet. Dabei konnten trotz verschiedener Gründe, welche für ein Auftreten von Azaspirosäuren im Schwarzen Meer sprechen, keine Azaspirosäuren detektiert werden.

Im zweiten Abschnitt wurde eine LC-MS/MS-basierte Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von Amphidinolen in Biomasse der Gattung *Amphidinium* entwickelt. Amphidinole stellen eine Klasse von Phycotoxinen dar, die einerseits bedeutende pharmazeutische Effekte aufweisen, andererseits durch ihre lytische Aktivität mit auftretenden Fischsterben in Verbindung gebracht werden. Zur Identifizierung bekannter Amphidinole und deren Quantifizierung wurde das „Selected Reaction Monitoring“ verwendet, während die Detektion bisher unbekannter Amphidinole über den Neutralverlust-Scan erfolgte. In fünf von neun analysierten Proben konnten verschiedene bekannte Amphidinole nachgewiesen sowie Angaben über den Toxingehalt pro Zelle gemacht werden. Zudem wurden 16 unbekannte Amphidinol-ähnliche Substanzen detektiert und massenspektrometrisch charakterisiert. Von diesen scheinen 12 Substanzen Derivate bekannter Amphidinole zu sein, während zwei Substanzen vollkommen neue Amphidinole und zwei Substanzen glykosilierte Formen darstellen. Dies ist der erste Nachweis von glykosilierten Phycotoxinen.

Abkürzungsverzeichnis

AM	Amphidinol
ASP	Amnesische Schalentiervergiftung (engl. <i>amnesic shellfish poisoning</i>)
AZA	Azaspirosäure (engl. <i>azaspiracid</i>)
CAR	Carteraol
CTD	Leitfähigkeits-, Temperatur-, Tiefensonde (engl. <i>conductivity temperature depth</i>)
CFP	Ciguatera Fischvergiftung (engl. <i>ciguatera fish poisoning</i>)
DA	Domoinsäure (engl. <i>domoic acid</i>)
dc-	decarbamoyl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DSP	Diarrhöische Schalentiervergiftung (engl. <i>diarrhetic shellfish poisoning</i>)
DTX	Dinophysistoxin
EPI	verbesserter Produktionen-Scan (engl. <i>enhanced product ion scan</i>)
FD	Fluoreszenz-Detektion
GD	Goniodomin
GYM	Gymnodimin
HAB	schädliche Algenbüte (engl. <i>harmful algal bloom</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatographie</i>)
KAR	Karatungiol
LC	Flüssigkeitschromatographie (engl. <i>liquid chromatographie</i>)
LP	Luteophanol

LS	Lingshuiol
LU	Lumineszenz-Einheiten (engl. <i>luminescence units</i>)
MS	Massenspektrometer
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
NEO	Neosaxitoxin
NL	Neutralverlust (engl. <i>neutralloss</i>)
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (engl. <i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)
NT	Netzzug (engl. <i>new tow</i>)
NWG	Nachweisgrenze
OA	Okadasäure (engl. <i>okadaic acid</i>)
-P	-Phosphat
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PSP	Paralytische Schalentiervergiftung (engl. <i>paralytic shellfish poisoning</i>)
PTX	Pectenotoxin
SIR	Selected Ion Recording
S/N	Signal/Rausch (engl. <i>signal-to-noise</i>)
SRM	Selected Reaction Monitoring
SP	Symbiopolyol
SPX	Spirolid
STX	Saxitoxin
THF	Tetrahydrofuran
U	Unbekannte Substanz
YTX	Yessotoxin

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Zusammenfassung	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Gefährliche Algenblüten	1
1.2 Schalentier-Toxine im Schwarzen Meer	4
1.3 Algengattung <i>Amphidinium</i>	9
1.4 Amphidinole und Verwandte	10
1.5 Aufgabenstellung und Zielsetzung	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Probenherkunft und Probennahmen	15
2.1.1 Schalentier-Toxine im Schwarzen Meer	15
2.1.2 Amphidinol-Methodenentwicklung	18
2.2 Probenextraktion	20
2.2.1 Schalentier-Toxine im Schwarzen Meer	20
2.2.2 Amphidinol-Methodenentwicklung	21
2.3 Flüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenz-Detektion (LC-FD) . . .	23
2.4 Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)	24
2.4.1 Messung von lipophilen Toxinen	26
2.4.2 Messung von Domoinsäure	28
2.4.3 Messung von Azaspirosäuren	28
2.4.4 Messung von Amphidinolen/Methodenentwicklung	30
3 Ergebnisse und Diskussion	33
3.1 Schalentier-Toxine im Schwarzen Meer	33
3.1.1 PSP-Toxine	33
3.1.2 Lipophile Toxine inklusive Domoinsäure	34
3.1.3 Azaspirosäuren	44
3.2 Amphidinol-Methodenentwicklung	45
3.2.1 Adduktbildung von Amphidinolen	46
3.2.2 Typische Fragmentierung von Amphidinolen	47

3.2.3	Messtechnische Parameter	56
3.2.4	Detektion von bekannten Amphidinolen mittels SRM	59
3.2.5	Detektion von unbekanntem Amphidinolen mittels Neutralver- lust	62
3.2.6	Quantifizierung der gefundenen Amphidinole	86
4	Fazit und Ausblick	91
	Literaturverzeichnis	102
	Abbildungsverzeichnis	102
	Tabellenverzeichnis	105
	Anhang	106
	Anlage 1: Quantifizierungsdaten der lipophilen Toxine	106
	Anlage 2: Strukturen von Amphidinolen mit Carbonylgruppe	109
	Anlage 3: Produktions-Spektren zur Bestätigung der mittels SRM detek- tierten Substanzen	111
	Anlage 4: Quantifizierungsdaten der Amphidinole	121
	Eidesstattliche Erklärung	122

1 Einleitung

„Da verwandelte sich alles Nilwasser in Blut. Die Fische im Nil starben und der Nil stank, sodass die Ägypter kein Nilwasser mehr trinken konnten.“

Exodus 7, 20-21

1.1 Gefährliche Algenblüten

Bei schädlichen Algenblüten (engl. *harmful algal blooms*, HABs) handelt es sich um eine massenhafte Vermehrung von meist einer spezifischen Art, welche zu einer Bedrohung für aquatische Ökosysteme werden kann (Hallegraeff, 1993). Der zeitlich versetzte mikrobielle Abbau der massenhaft gebildeten Biomasse führt in Gewässern zu einer starken Sauerstoffzehrung, wodurch Organismen mit aerober Lebensweise ersticken. Verschiedene Algenarten sammeln sich außerdem flächendeckend an der Wasseroberfläche, was zur Bildung eines lichtundurchlässigen Teppichs führt und somit den Tod phototropher Lebewesen zur Folge hat. Außerdem können einige Algenarten diverse Toxine produzieren, welche als Phycotoxine bezeichnet werden und als Bedrohung für weitere Lebensformen gelten. Gefährliche Algenblüten treten nicht nur in Ozeanen und Meeren auf, sondern können auch in Inlandsgewässern wie Seen und Flüssen vorkommen. Dort stellen sie neben bisher sehr gut erforschten und kontrollierten chemischen Belastungen eine weitestgehend unbekannte Bedrohung dar (Brooks et al., 2016). Da diese Arbeit sich jedoch mit marinen Phycotoxinen beschäftigt, werden im Süßwasser auftretende Toxine nicht weiter behandelt. Von den in marinen Gewässern ca. 5000 vorkommenden Algenarten sind in etwa 300 Arten in der Lage Algenblüten auszubilden (FAO, 2004). Bereits in den frühen 90er-Jahren wurde ein globaler Anstieg sowohl in Abundanz, Intensität und geographischer Verbreitung von schädlichen Algenblüten festgestellt (Hallegraeff, 1993). Auch in den kommenden Jahren ist ein weiterer Anstieg zu erwarten (Wells et al., 2015). Diese Entwicklung ist sowohl natürlicher als auch anthropogener Ursachen geschuldet. Durch natürlich auftretende Stürme und vorhandene Meeresströmungen breiten sich Algenblüten von ihrem Ursprungsort aus und können kilometerweit transportiert werden (Glibert et al., 2005). Extrem weite Entfernungen werden jedoch hauptsächlich durch das Ballastwasser von Schiffen zurückgelegt, wodurch endemischen Arten neue Gebiete zugänglich gemacht werden und somit eine globale

Ausbreitung von HABs zur Folge hat (Butrón et al., 2011). Als wichtigster Faktor für das vermehrte Auftreten von HABs werden inzwischen der menschenverursachte Klimawandel und der erhöhte Nährstoffeintrag gemacht (Heisler et al., 2008; Anderson, 2014; Glibert & Burford, 2017). Steigende Temperaturen und erhöhte Stickstoff- und Phosphorkonzentrationen durch Abwässer, Landwirtschaft und küstennahe Industrie steigern das Wachstum von Mikroalgen und das daraus folgende Auftreten von HABs drastisch (Brookes & Carey, 2011).

Von den 300 Arten, welche zur Algenblüte fähig sind, bilden wiederum ungefähr 75 Arten komplexe Biotoxine, welche ein erhebliches Gefahrenpotential darstellen. Einerseits werden sie durch mikrobiellen Abbau freigesetzt und reichern sich in Wasser und Luft an, andererseits werden sie über den Verzehr direkt in das Nahrungsnetz integriert (Preiß-Weigert, 2018). Diese Toxine sind sowohl für Fische, Vögel, Säugetiere als auch teilweise für den Menschen schädlich. Sie besitzen eine große Vielfalt in Größe, chemischer Struktur und Wirkungsweise, sodass die marinen Phycotoxine auf verschiedener Basis in Untergruppen kategorisiert werden können.

Dabei ist zwischen zwei grundlegenden Typen von Phycotoxinen zu unterscheiden: Zum einen gibt es die Gruppe der klassischen Schalentier-Toxine (engl. *shellfish toxins*), welche von Filtrierern akkumuliert werden, in hoher Dosis in das Nahrungsnetz gelangen und schließlich beim Menschen unterschiedliche Krankheiten auslösen (van Dolah, 2000). Diese Krankheiten werden als Schalentier-Vergiftungen zusammengefasst. Die Schalentier-Toxine sind hoch divers und können je nach Struktur, Löslichkeit, Wirkung oder Krankheitssymptom in verschiedene Untergruppen unterteilt werden. Auf der anderen Seite gibt es Phycotoxine, welche eine lytische Wirkung besitzen und für plötzlich auftretende Fisch- und Tiersterben in marinen Umgebungen verantwortlich gemacht werden (Place et al., 2012; Murray et al., 2015). Lytische Wirkung tritt jedoch nur bei wenigen Phycotoxingruppen auf, wodurch auch die strukturelle Diversität der lytischen Toxine weitaus geringer ist als die der Schalentier-Toxine. Bisher wird lediglich den Amphidinolen, Karlotoxinen und Prymnesinen jene lytische Aktivität zugesprochen (Mooney et al., 2010). Gleichzeitig sind jene bioaktiven Substanzen aufgrund ihrer Potenz und/oder ihres besonderen Wirkungsmechanismus ständiger Gegenstand aktueller Pharmazie- und Arzneimittelforschung, beispielsweise in der Krebsforschung (Espiritu et al., 2017; Martínez et al., 2019).

HABs führen bezüglich der weltweit kontinuierlich steigenden Fischerei und Aquakultur (FAO, 2018) zu erheblichen wirtschaftlichen Schäden, indem beispielsweise Massensterben von Fischen (sowohl in Aquakulturen als auch freilebend) auftreten. So sind in Texas von 1985 bis 2010 etwa 34 Millionen Fische mit einem geschätzten

Wert von 13 Millionen US-Dollar in 33 verschiedenen Gewässern aufgrund von Algenblüten durch die Art *Prymnesium parvum* verendet (Southard et al., 2010). Auch an der Ostküste Tasmaniens kam es im Oktober 2012 zu einer toxischen Dinoflagellatenblüte, welche einen Schaden von 23 Millionen Dollar verursachte (Hallegraeff et al., 2017). Eine Zeitdauer von auftretenden Algenblüten lässt sich dabei schwer festlegen. Während einige Algenblüten nach relativ kurzer Zeit wieder verschwinden, kam es beispielsweise von Oktober 2017 bis Anfang 2019 zu einer 1,5-Jahre anhaltenden Algenblüte vor Florida (Abbildung 1) (NOAA, 2019).



Abbildung 1. Eine gefährliche Algenblüte färbt die Südwestküste Floridas rot. Die ungewöhnlich lang anhaltende Algenblüte begann im Oktober 2017 und verschwand im Winter 2018/19. (Foto: Ben Depp/nationalgeographic.com)

Um den immer häufigeren und intensiveren HABs und den von ihnen ausgehenden Bedrohungen besser entgegen wirken zu können, werden verschiedene Vorhersage-Systeme entwickelt. Diese sind jedoch lokal begrenzt, wie z.B. das *Gulf of Mexico HAB Operational Forecast System* (GOMX HAB-OFS). Dazu werden Satelliten-Daten und Transport-Modelle verwendet, welche mögliche Blütenbewegungen simulieren. Diese Informationen werden an die zuständigen Abteilungen der Umgebung weitergeleitet, um Probennahmeprogramme zu starten, welche ungewöhnlich hohe Chlorophyll-Konzentrationen als gefährliche Algenblüte bestätigen oder revidieren können (NOAA, 2015).

1.2 Schalentier-Toxine im Schwarzen Meer

Die Schalentier-Toxine erhielten ihren Namen durch den Verzehr verschiedener Schalentiere wie Muscheln, Krebsen und Hummern, welcher schließlich zu Vergiftungen und diversen Krankheitserscheinungen führte. Muscheln und andere Organismen filtern zur Nahrungsaufnahme große Mengen an Wasser und nehmen dabei toxische Algen auf. Die Toxine werden im Gewebe der Muschel akkumuliert, ohne diese selbst zu schädigen, und gelangen somit weiter in das Nahrungsnetz (Abbildung 2).

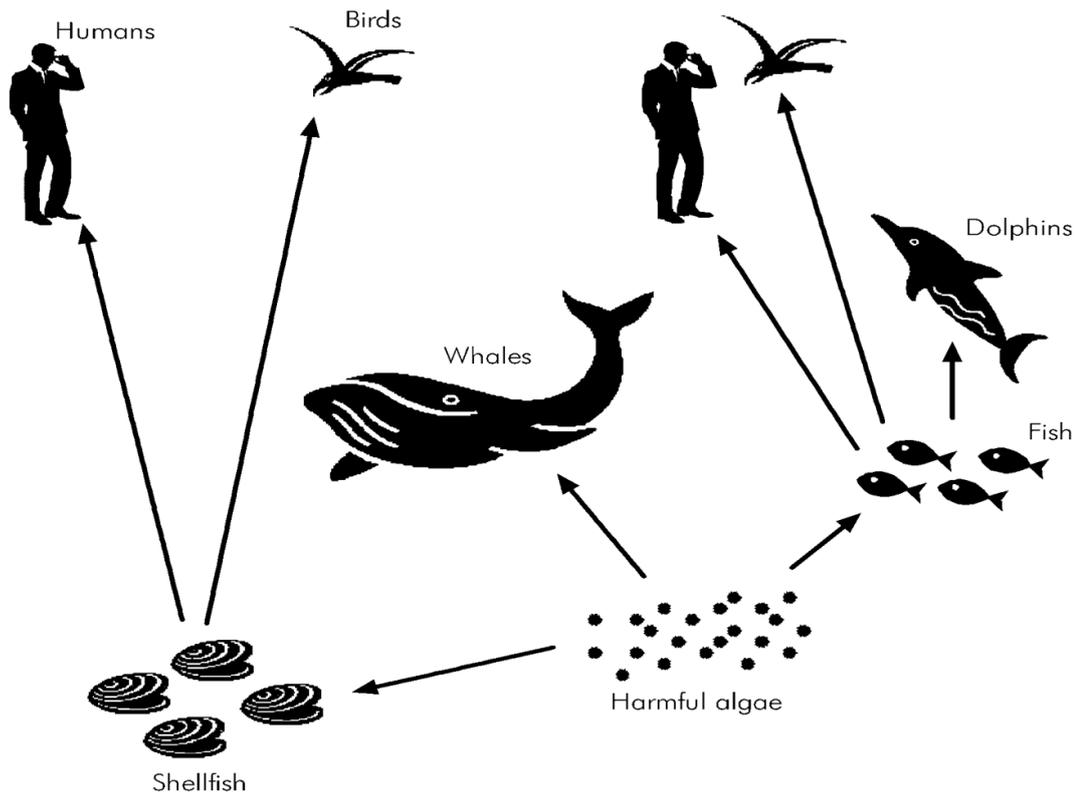


Abbildung 2. Durch verschiedene Transportvektoren erreichen Schalentier-Toxine in hoher Dosis den Menschen, Vögel und marine Säugetiere (Gerssen et al., 2010)

Bei Konsum solcher kontaminierten Organismen gelangen die Toxine in den menschlichen Körper und lösen dort verschiedene Krankheiten aus. Die bekanntesten Formen sind dabei die Diarrhöische Schalentiervergiftung (engl. *diarrheic shellfish poisoning*, DSP), die Amnesische Schalentiervergiftung (engl. *amnesic shellfish poisoning*, ASP), die Neurotoxische Schalentiervergiftung (engl. *neurotoxic shellfish poisoning*, NSP), die Paralytische Schalentiervergiftung (engl. *paralytic shellfish poisoning*, PSP) und die Schalentiervergiftung durch Azaspirosäuren (engl. *azaspiracid shellfish poisoning*, AZP). Zu den mildereren Krankheitserscheinungen zählen oftmals Kopfschmerzen, Schwindel, Atembeschwerden, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö und

Schüttelfrost. Je nach Stärke und Art der Vergiftung können aber auch Symptome wie Halluzinationen, Verlust des Kurzzeitgedächtnisses und Lähmungen bis hin zu Atmungs- und Herzversagen auftreten (Botana, 2008). Um sowohl wirtschaftliche als auch gesundheitliche Risiken einschätzen zu können, wurde das *Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms*-Programm (GEOHAB) gegründet und in den meisten Ländern und Staatengemeinschaften Kommissionen oder Organisationen zur Erforschung des richtigen Umgangs mit Schalentier-Toxinen beauftragt. Beispiele dafür sind die weltweit agierende *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) und die auf die EU beschränkte *European Food Safety Authority* (EFSA), die in ihren zusammenfassenden Artikeln die Problematik der Schalentier-Toxine und darauf ergriffene Maßnahmen wie Gesetze, Monitoring-Programme, Grenzwerte und Nachweismethoden beschreiben (FAO, 2004; EFSA, 2009b).

Obwohl Schalentier-Toxine und deren Auswirkungen auf die Umwelt weitestgehend schon seit mehreren Dekaden bekannt sind, werden dennoch immer wieder neue Toxine an teilweise zuvor nicht untersuchten Standorten entdeckt. So konnten beispielsweise in jüngster Vergangenheit verschiedene neue Toxine der Azaspirosäuren-Gruppe charakterisiert werden (Krock et al., 2015; Kim et al., 2017), nachdem im Jahr 2009 *Azadinium spinosum* als erster Primärproduzent der Azaspirosäuren identifiziert wurde (Tillmann et al., 2009). Auch das Schwarze Meer gilt als ein Standort, an dem Untersuchungen zu Schalentier-Toxinen bisher kaum durchgeführt wurden. Das Schwarze Meer stellt dabei durch seine Isolation von den Weltozeanen ein einzigartiges marines System dar. Durch die umliegenden Staaten und Flüsse wie die Donau wird es stark von Süßwasser gespeist, was eine geringe Salinität von etwa 18 und eine vertikale Stratifizierung zur Folge hat (Izdar & Murray, 1991). Vor allem die Stratifizierung der Wassersäule gilt laut Smayda (1997) als essentieller Faktor bei der Entstehung von gefährlichen Algenblüten durch Dinoflagellaten, da diese sensibel auf Turbulenzen und die daraus entstehenden Scherkräfte reagieren (Anderson, 1998). Aus jenen potentiell auftretenden Dinoflagellaten-Blüten kann eine hohe Produktion von Schalentier-Toxinen resultieren. Parallel dazu lässt sich entlang der Küstengebiete des Schwarzen Meeres, beispielsweise in Bulgarien, eine starke Muschelfischerei und -aquakultur nachweisen. So wurden im Jahr 2015 3100 t der Mittelmeer-Miesmuschel *Mytilus galloprovincialis* kultiviert (Peteva et al., 2018c), was einen Gesamtanteil von 28 % der totalen Aquakulturproduktion Bulgariens entspricht (Ministry of Agriculture and Food, 2016). Trotz steigender Muschelfischerei und -Aquakultur und den für das Algenwachstum positiven Umweltparametern haben die meisten Anrainerstaaten des Schwarzen Meeres dieses bisher kaum bis gar

nicht auf Schalentier-Toxine untersucht. Erst seit dem Jahr 2015 wurden in bulgarischen Gewässern regelmäßig Proben auf marine Biotoxine überprüft. In Muschelfleisch konnten bisher einige PSP-Toxine (Kalinova et al., 2015) sowie Yessotoxin, Domoinsäure und Pectenotoxin 2 (Peteva et al., 2018a,b,d) nachgewiesen werden. In Planktonproben wurden lediglich Domoinsäure und Pectenotoxin 2 gefunden. Eine spezielle Untersuchung auf Azaspirosäuren, welche unter anderem im geographisch angrenzenden Mittelmeer detektiert worden sind (Luo et al., 2018), fand ebenfalls noch nicht statt. Im benachbarten Land Rumänien wurden bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch keine Untersuchungen auf Schalentier-Toxine durchgeführt. Auch in weiteren Anrainerstaaten des Schwarzen Meeres, wie der Ukraine, der Türkei und Georgien, fand das konkrete Messen von Algentoxinen bisher kaum oder gar nicht statt. In der Türkei wurde lediglich eine Studie zum Toxinprofil von Muscheln durchgeführt, in welcher von einem Auftreten von Domoinsäure berichtet wurde (Gunsen et al., 2008). In ukrainischen und georgischen Gewässern wurden bisher keine direkten Toxinmessungen durchgeführt. Es wurde lediglich ein vor der Krim entnommene *Pseudo-nitzschia*-Stamm kultiviert, in dessen Extrakt schließlich Domoinsäure nachgewiesen werden konnte (Besiktepe et al., 2008). Nahe der russischen Küste gibt es hingegen einige Untersuchungen, in denen sowohl lipophile Toxine wie Okadasäure, Dinophysistoxin 1, Pectenotoxine und Yessotoxine, als auch verschiedene Gonyautoxine gefunden wurden (Vershinin et al., 2006; Morton et al., 2007, 2009).

Die Schalentier-Toxine werden oft nach dem hervorrufenden Vergiftungssyndrom kategorisiert, können aber auch nach ihren chemischen Eigenschaften, ihrer Löslichkeit und den daraus resultierenden Analysemethoden kategorisiert werden. Da in dieser Arbeit auch nach Toxinen gesucht wurde, welche sich nicht eindeutig einem Vergiftungssyndrom zuordnen lassen, wurden sie nach Löslichkeit und Analysemethode kategorisiert: Die meisten der für diese Arbeit relevanten Schalentier-Toxine ließen sich in Methanol lösen und anschließend mit Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie messen. Dazu gehören Azaspirosäuren (engl. *azaspiracids*, AZA), Domoinsäure (engl. *domoic acid*, DA), Goniodymine (GD), Gymnodimine (GYM), Okadasäure (engl. *okadaic acid*, OA), Dinophysistoxine (DTX), Pectenotoxine (PTX), Pinnatoxine (PnTx), Spirolide (SPX) und Yessotoxine (YTX). Dabei handelt es sich bis auf die Domoinsäure, welches einen hydrophilen Charakter hat, um lipophile Toxine. Die erwähnten Toxine sind unter anderem für verschiedene Krankheiten wie die Amnesische und Diarrhöische Schalentiervergiftung sowie für die Schalentiervergiftung durch Azaspirosäuren verantwortlich. Die für die Paralytische Schalentiervergiftung verantwortlichen hydrophilen Toxine (Saxitoxin (STX) und dessen Derivate) ließen sich hingegen in Essigsäure lösen und wurden anschlie-

ßend mittels Flüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenz-Detektion gemessen. Sie werden in der weiteren Arbeit als PSP-Toxine bezeichnet. Die folgende Abbildung 3 gibt einen Überblick über den Aufbau der wichtigsten Vertreter jener Schalentier-Toxin-Untergruppen, nach denen im Rahmen dieser Arbeit gesucht wurde.

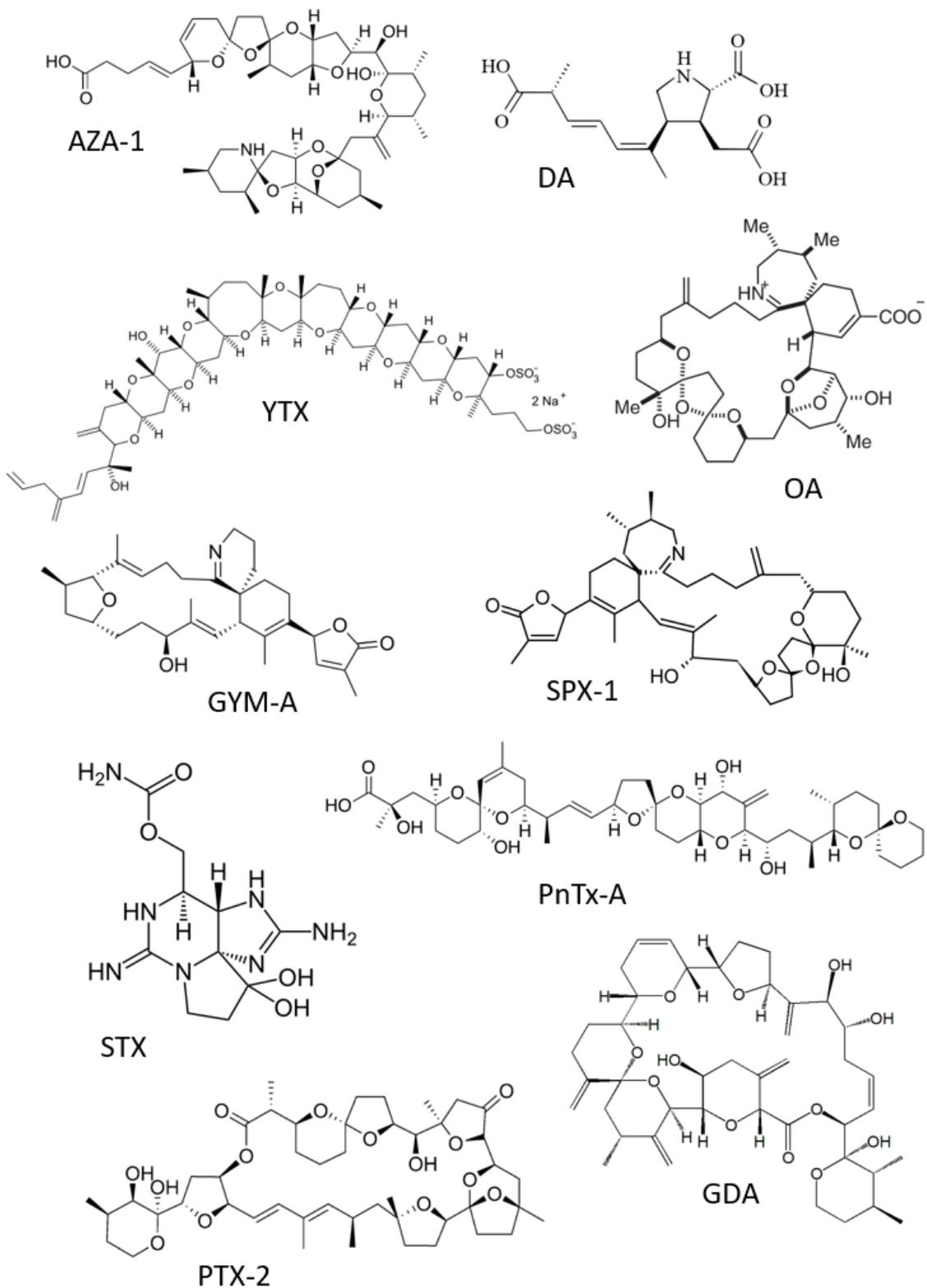


Abbildung 3. Strukturen unterschiedlicher Schalentier-Toxine, nach denen im Rahmen dieser Arbeit gesucht wurde.

1.3 Algengattung *Amphidinium*

Amphidinium (griech. *amphi*: rund herum, auf beiden Seiten; *dino*: neutral] ist eine weltweit vorkommende Gattung von Dinoflagellaten, welche trotz ihrer genetischen Diversität eine hoch konservierte Morphologie besitzt (Karafas et al., 2017). Sie kommt sowohl freilebend benthisch als auch als Endosymbiont von beispielsweise dem Plattwurm *Pseudaphanostoma luteocoloris* (Doi et al., 1997) oder der Schirmqualle *Mastigias papua* (Hanif et al., 2010) vor. Die Gattung produziert eine Vielzahl verschiedener Polyketide mit unterschiedlichen toxikologischen Eigenschaften (zusammengefasst in Murray et al., 2012). Zu diesen gehören Makrolide wie die Amphidinolide, kurze lineare Polyketide wie die Amphidine und langkettige Polyketide wie die Amphidinole, auf denen der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt. Verschiedene Berichte lassen vermuten, dass Algenblüten von *Amphidinium* direkt mit zu dieser Zeit auftretenden Fischsterben zusammenhängen (Murray et al., 2015; Mandal et al., 2011) und die produzierten Toxine den Effekt der Ciguatera Fischvergiftung (engl. *ciguatera fish poisoning*, CFP) verstärken (Baig et al., 2006; Rhodes et al., 2010).

Die Gattung wurde 1859 mit der Art *Amphidinium operculatum* als Typspezies erstmalig beschrieben (Claparède & Lachmann, 1859). Die nackten Zellen sind nicht gepanzert und dorsoventral abgeflacht, wobei das Epikon 1/3 der Zelllänge oder weniger beträgt (Abbildung 4). Die Taxonomie wurde 2004 durch Jørgensen et al. (2004) und Murray et al. (2004) neu definiert und überarbeitet. Demnach zählen inzwischen nur noch Spezies mit einem kleinen, halbmondförmigem oder dreieckigem, in der Regel links abgelenktem Epikon zur Gattung *Amphidinium*.



Abbildung 4. Lichtmikroskopaufnahme von *Amphidinium carterae* (Quelle: marinespecies.org, 16. Februar 2020)

Die veraltete Definition von *Amphidinium* beinhaltete in etwa 120 Arten (Murray & Patterson, 2002). Von diesen erfüllen lediglich 20 Arten die neu definierten Kriterien, welche als „wahre Gattung *Amphidinium sensu stricto*“ bezeichnet werden. Die übrigen ca. 100 Arten werden bis zur genaueren Untersuchung unter der Gattung „*Amphidinium sensu lato*“ zusammengefasst (Jørgensen et al., 2004).

Die genaue Artbestimmung von *Amphidinium* gestaltet sich aufgrund von morphologischer Ähnlichkeit äußerst schwierig und ist ständiger Gegenstand aktueller Forschung (Jørgensen et al., 2004; Murray et al., 2012; Karafas et al., 2017). Die langkettigen Amphidinole und deren Verwandte wurden vor allem in den Arten *A. klebsii* (z.B. Satake et al., 1991), *A. carterae* (z.B. Molina-Miras et al., 2018) oder in unidentifizierten Arten (*A. sp.*, z.B. Washida et al., 2006) gefunden. Anhand der Art *A. klebsii* ist die Unklarheit bezüglich der Speziesidentifizierung besonders gut zu beschreiben. Ursprünglich wurden die Arten *Amphidinium klebsii* Kofoid & Swezy und *Amphidinium klebsii* N.Carter beschrieben. Während die Art *Amphidinium klebsii* N.Carter inzwischen als Synonym für *A. carterae* angesehen wird (Lassus et al., 2016), wird *Amphidinium klebsii* Kofoid & Swezy in der *AlgaeBase* noch als eigenständige Art geführt (Guiry & Guiry, 2019). Die Spezies wurde jedoch bereits synonym für Stämme von *A. operculatum*, *A. gibbosum*, *A. massartii* und *A. carterae* verwendet (Murray et al., 2004). Karafas et al. (2017) empfiehlt aufgrund dem Fehlen charakteristischer Merkmale *A. klebsii* als akzeptierte taxonomische Einheit zu streichen. Die hingegen gut untersuchte und anerkannte Art *A. carterae* wächst besonders schnell in Kulturen, wodurch sie sich mit der Zeit als Modellorganismus für Untersuchungen an Dinoflagellaten etablierte. So wurde beispielsweise die erste genetische Transformation an Dinoflagellaten (Te et al., 1998) oder die Entdeckung des ersten Polyketidsynthase-Genclusters von Dinoflagellaten (Kubota et al., 2006) an jener Art beschrieben.

1.4 Amphidinole und Verwandte

Aus *Amphidinium* konnten neben einer Vielzahl von Amphidinolen noch weitere, langkettige Polyketide isoliert werden. Dazu gehören die Colopsinole A-E, die Luteophanole A-D, Amphezanol A, die Amdigenole A, E und G, Lingshuiol sowohl ohne Suffix als auch die Lingshuiole A und B, Symbiopolyol (Enantiomer von Lingshuiol B), die Karatungiole A und B, Carteraol E und die Amphidinoketide 1 und 2 (zusammengefasst in Murray et al., 2012). Die erstmalige Beschreibung der allgemeinen Amphidinolstruktur erfolgte mit der Entdeckung von Amphidinols 1 (Abbildung 5) durch Satake et al. (1991), welches den ersten Vertreter einer neuen Grup-

pe von Polyhydroxy-Polyen-Verbindungen darstellte. Nach der Entdeckung weiterer ähnlicher Strukturen wird der Aufbau inzwischen durch zwei Tetrahydropyranringe, verbunden durch eine C₆-Kette, einem mehrfach ungesättigten Alkyl-Arm und einem langen Polyhydroxy-Arm charakterisiert (Nuzzo et al., 2014). Strukturelle Unterschiede zwischen den Molekülen treten in den Längen der Arme und der Anzahl und Position von Doppelbindungen und Hydroxylgruppen auf. Zusätzlich können an dem Polyhydroxyteil verschiedene Verbindungen, wie beispielsweise Sulfatester oder Ringstrukturen vorhanden sein.

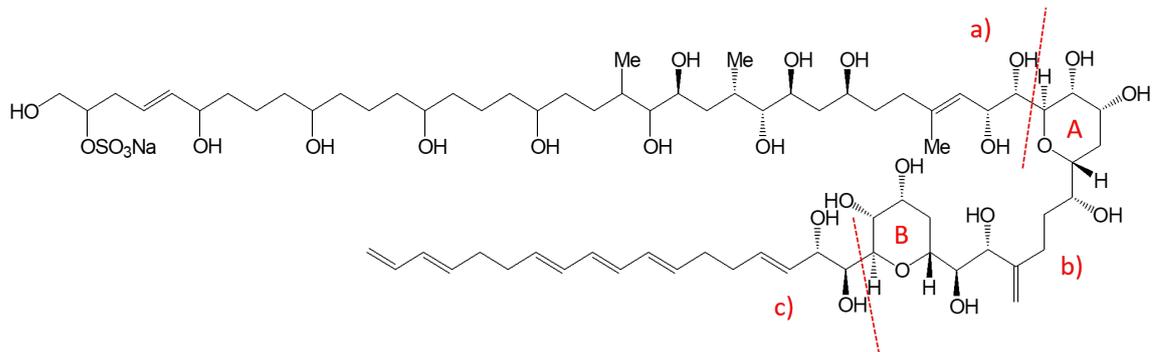


Abbildung 5. Strukturformel von Amphidinol 1 (AM1). Diese beinhaltet charakteristisch für die Amphidinolfamilie einen Polyhydroxyteil (a), zwei durch eine C₆-Kette verbundene Tetrahydropyranringe (b) und einen Polyenteil (c). Am Polyhydroxyteil befindet sich in diesem Fall eine Sulfatgruppe.

Mitglieder der Amphidinolfamilie sind nach dieser Definition Amphidinole (AM), Luteophanole (LP), Lingshuiole (LS), Symbiopolyole (SP), Karatungiole (KAR) und Carteraole (CAR). Die ebenfalls zu den langkettigen Polyketiden gehörenden Amdigenole (AMD) nehmen eine Sonderstellung ein. Die extrem großen Moleküle Amdigenol A und E setzen sich aus zwei Amphidinol-Kerneinheiten zusammen, wodurch die Vermutung entsteht, dass es sich dabei um Dimere von Amphidinolen handelt. Amdigenol G ist hingegen ein direktes Amphidinol-Analog (Inuzuka et al., 2014). Die genannten Moleküle besitzen eine Vielzahl biologischer Aktivitäten. Zusammen mit den von der Gattung *Karlodinium* produzierten Karlotoxinen und den von der Gattung *Prymnesium* produzierten Prymnesinen bilden die Amphidinole die Gruppe der lytischen Phycotoxine (Mooney et al., 2010). Die meisten Mitglieder der Amphidinolfamilie sind antifungal und hämolytisch aktiv. Eine Ichthyotoxizität liegt wegen der kiemenschädigenden Funktion der strukturell verwandten Karlotoxine ebenfalls nahe. Es wurden auch cytotoxische, antimikrobielle, antidiatomeeische und einige weitere Wirkungen festgestellt. Die folgende Tabelle 1 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die bioaktiven Eigenschaften jener Moleküle.

Tabelle 1. Mitglieder der Amphidinolfamilie und deren bisher untersuchten bioaktiven Eigenschaften. (M) - nach Molina-Miras et al. (2018), (S) - nach Satake et al. (2017), (+) - nur in sehr hoher Dosis

	antifungal	hämolytisch	cytotoxisch	weiteres
AM1	+	+	k.A.	k.A.
AM2	+	+	+	antidiatomeen, antikanzerogen
AM3	+	+	k.A.	antidiatomeen
AM4	+	+	+	antidiatomeen
AM5	+	+	k.A.	antidiatomeen
AM6	+	+	k.A.	antidiatomeen
AM7	+	+	k.A.	k.A.
AM9	+	+	+	k.A.
AM10	+	+	+	k.A.
AM11	+	+	+	k.A.
AM12	+	+	+	k.A.
AM13	+	+	+	k.A.
AM14	(+)	(+)	k.A.	k.A.
AM15	(+)	(+)	k.A.	k.A.
AM17	-	+	k.A.	k.A.
AM18	+	k.A.	k.A.	k.A.
AM19	-	k.A.	k.A.	k.A.
AM20(M)	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
AM20(S)	-	+	k.A.	k.A.
AM21	-	+	k.A.	k.A.
AM22	+	+	+	antikanzerogen
AMA	+	k.A.	k.A.	k.A.
AMB	-	k.A.	k.A.	k.A.
LPA	-	k.A.	k.A.	antimikrobiell
LPB	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
LPC	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
LPD	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
LS	k.A.	k.A.	+	k.A.
LSA	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
LSB	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
SP	k.A.	k.A.	k.A.	evtl. antiinflammatorisch
KARA	+	k.A.	k.A.	antiprotozoetisch
KARB	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
CARE	+	k.A.	-	ichthyotoxisch
AMDA	k.A.	k.A.	+	inhibiert Öffnung von Ca ₂ ⁺ -Kanälen
AMDE	k.A.	k.A.	k.A.	inhibiert Öffnung von Ca ₂ ⁺ -Kanälen
AMDG	k.A.	k.A.	k.A.	inhibiert Öffnung von Ca ₂ ⁺ -Kanälen

1.5 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Detektion mariner Phycotoxine und lässt sich inhaltlich in zwei Abschnitte unterteilen.

Der erste Teil basiert auf einer vom 15. Mai bis zum 04. Juni durchgeführten Forschungsreise auf dem Schwarzen Meer. Im Rahmen dieser Ausfahrt wurden Planktonproben aus bulgarischen und rumänischen Gewässern auf das Vorhandensein verschiedener Schalentier-Toxine untersucht, welche erheblichen Einfluss auf die ansässige Muschelfischerei und -Aquakultur sowie den Gesundheitszustand der konsumierenden Menschen haben. Dazu gehört die Gruppe der lipophilen Toxine, welche Okadasäure, Dinophysistoxine, Pectenotoxine, Yessotoxine, Gymnodimine, Goniodimine Spirolide und Azaspirosäuren einschließt. Außerdem wurden die Proben auf Domoinsäure, einem Vertreter der hydrophilen Toxine, untersucht. Für die Detektion dieser Toxine wurde Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) verwendet. Des Weiteren wurde die Toxingruppe untersucht, welche für die Paralytische Schalentiervergiftung (PSP) verantwortlich gemacht wird, bestehend aus Saxitoxin und dessen Derivaten. Der Nachweis dieser Toxine erfolgte durch Flüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenzdetektion (LC-FD). Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde ein besonderes Augenmerk auf die Azaspirosäuren gelegt, welche bisher zwar im Rahmen üblicher Toxinuntersuchungen im Schwarzen Meer berücksichtigt, jedoch noch nie durch ein zweifaches Filtrationsverfahren aufkonzentriert worden sind, wodurch die Sensitivität der Untersuchungen erheblich gesteigert wurde.

Bezogen auf die Ergebnisse bisheriger Schalentier-Toxin-Untersuchungen im Schwarzen Meer lassen sich folgende Hypothesen aufstellen: Im Jahr 2019 lassen sich in den bulgarischen Gewässern, wie bereits in den Vorjahren, Yessotoxin, Domoinsäure und Pectenotoxin 2 nachweisen. Außerdem wird angenommen, dass diese Toxine auch in den bisher nicht untersuchten rumänischen Gewässern aufgrund ähnlich vorherrschender Bedingungen und geringer räumlicher Distanz vorkommen. Darüber hinaus wird die Fragestellung überprüft, ob die an der Küste Russlands gefundenen Toxine ebenfalls in dem Untersuchungsgebiet entlang der Westküste vorkommen. Die letzte Hypothese besagt, dass durch das besonders sensitive Verfahren zur Azaspirosäuren-Detektion und wegen des Auftretens dieser Toxine im geographisch angrenzenden Mittelmeer auch im Schwarzen Meer Azaspirosäuren nachgewiesen werden können.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit einer Methodenentwicklung zur Identifikation und Quantifizierung von Amphidinolen und deren Derivaten in unbekann-

ten Algenproben. Amphidinole werden von der Dinoflagellaten-Gattung *Amphidinium* produziert und weisen verschiedene biologische Aktivitäten auf. Zusammen mit den Karlotoxinen und Prymnesinen zählen die Amphidinole zu den lytischen Phycotoxinen. Darüber hinaus wird beispielsweise von ichthyotoxischen, antifungalen, cytotoxischen und antimikrobiellen Eigenschaften berichtet. In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl neuer Amphidinole mit unterschiedlich starken biologischen Aktivitäten entdeckt und charakterisiert. Aufgrund dem Fehlen einer sensitiven, standardisierten analytischen Methode zur Identifikation und Quantifizierung von Amphidinolen, wie sie beispielsweise für Schalentier-Toxine und seit kurzer Zeit für Karlotoxine (Krock et al., 2017) existiert, wurde die Erforschung der spezifischen Wirksamkeit verschiedener Analoga, die Erforschung allelochemischer Wechselwirkungen und die Auswirkungen von Amphidinolen auf Umwelt und Menschen erschwert. Bisher wurde die Entwicklung einer solchen Methode vor allem durch das Fehlen von verfügbaren Standards gehemmt. Durch den Erhalt eines aufgereinigten, jedoch nicht-zertifizierten Standards von F. García-Camacho, Universität Almería, Spanien, welcher aus dem *Amphidinium carterae* Stamm ACRN03 isoliert werden konnte (Molina-Miras et al., 2018), sollte erstmals eine auf LC-MS/MS basierende Methode zur Identifikation und Quantifizierung von bekannten Amphidinolen erstellt werden. Darüber hinaus sollte durch den Einsatz unterschiedlicher Scanmodi des Tandem-Massenspektrometers eine Methode zur einfachen und schnellen Detektion bisher unbekannter Amphidinole entwickelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Probenherkunft und Probennahmen

2.1.1 Schalentier-Toxine im Schwarzen Meer

Die Feldproben entstammen der Forschungsreise mit der RV *Akademik* auf dem Schwarzen Meer. Die dreiwöchige Expedition startete am 15. Mai 2019 im Hafen von Warna, Bulgarien (43°10' N, 27°56' E) und endete dort am 04. Juni 2019. Es wurde lediglich in bulgarischen und rumänischen Gewässern geforscht, sodass sich das Untersuchungsgebiet auf den westlichen Teil des Schwarzes Meeres beschränkte (Abbildung 6).

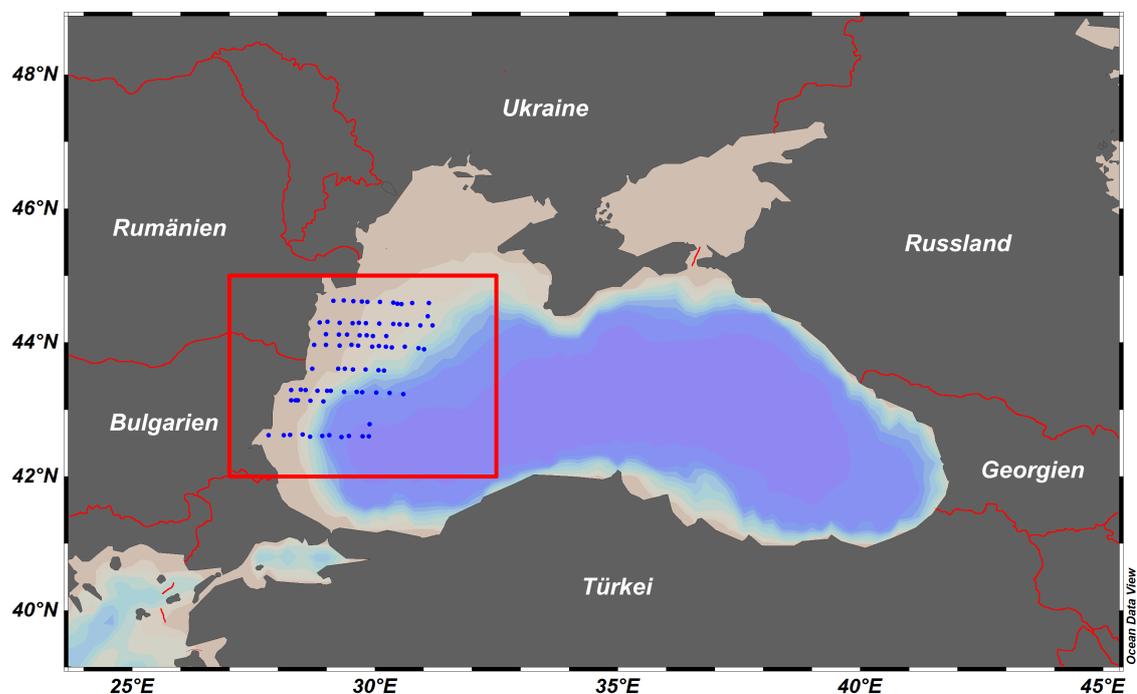


Abbildung 6. Das Schwarze Meer mit Anrainerstaaten. Beprobte Stationen sind durch blaue Punkte innerhalb des rot markierten Untersuchungsgebiets dargestellt.

Während der Expedition wurden täglich durchschnittlich sechs Stationen angefahren. An erster und letzter Station des Tages wurden sowohl Proben mittels Planktonnetz als auch mittels CTD-Wasserschöpfer genommen. An zwei bis drei dazwischenliegenden Stationen wurde lediglich Wasser aus der CTD beprobt. Die genaue Verteilung von Stationen und eingesetzter Untersuchungsmethode kann Abbildung 7 entnommen werden.

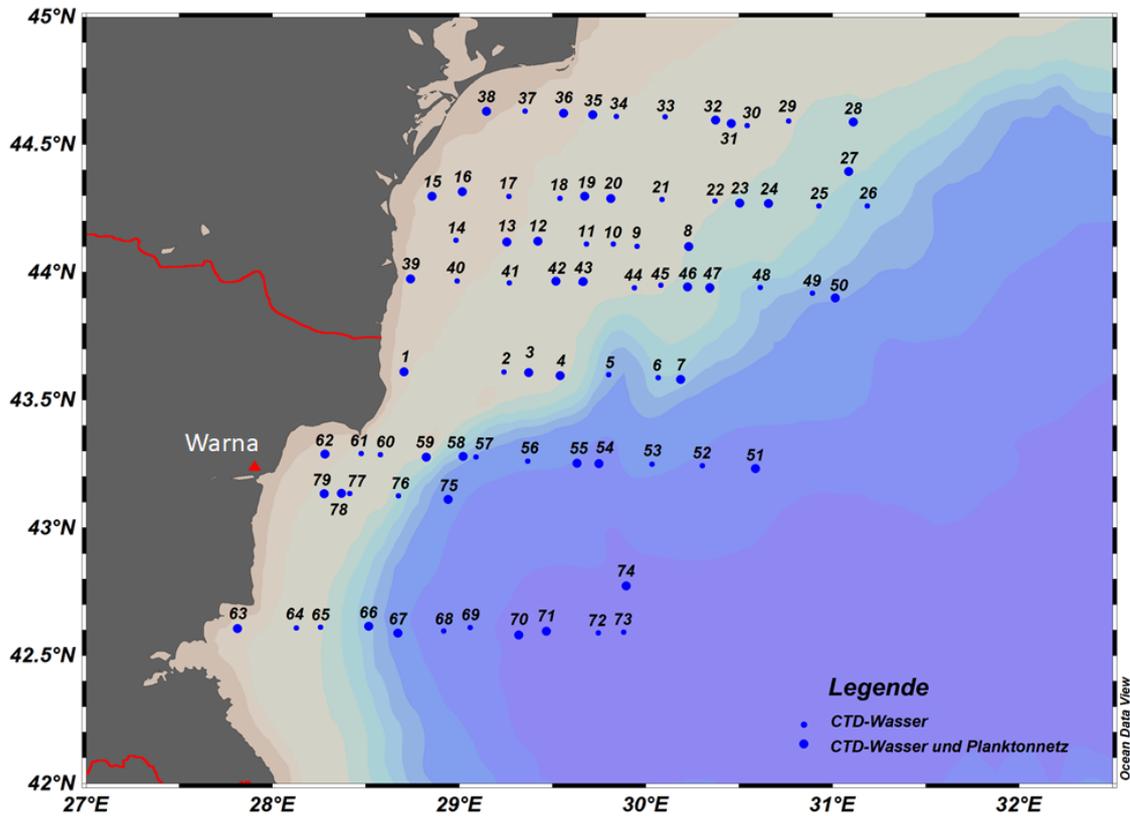


Abbildung 7. Beprobte Stationen innerhalb bulgarischer und rumänischer Gewässer. Der Start- und Zielhafen lag in Warnă, Bulgarien. Insgesamt wurde an 79 Stationen das CTD-Wasser beprobt und an 41 Stationen das Planktonnetz zu Wasser gelassen.

Das Planktonnetz mit einer Porenweite von $20\ \mu\text{m}$ wurde zweimal täglich zu Wasser gelassen. Im Regelfall wurde die Wassersäule von 20 m bis zur Oberfläche bei einer Geschwindigkeit von $0,5\ \text{m s}^{-1}$ beprobt. Bei niedriger Wassertiefe wurde das Netz zur Vermeidung von Schäden lediglich bis auf 10 m Tiefe abgeseilt. Die Proben aus dem Netzzug dienten der Untersuchung mehrerer Toxine, welche für verschiedene Erkrankungen verantwortlich sind. Dazu gehören lipophile Toxine, welche u.a. für die Diarrhöische Schalentiervergiftung verantwortlich sind, Domoinsäure, welche die Amnesische Schalentiervergiftung verursacht und hydrophile Toxine, welche die Paralytische Schalentiervergiftung hervorrufen. Das Netz wurde mit Seewasser abgespült und der Inhalt in eine Flasche abgefüllt. Das Volumen wurde zur späteren Vergleichbarkeit und Berechnung von Gesamtgehalten in der Regel auf 1,01 (maximal 2,01) mit filtriertem Seewasser (FSW) aufgefüllt (V_{Netzzug}). Zur Herstellung des filtrierten Seewassers wurde frisches Seewasser über einen $3\ \mu\text{m}$ Membran-Polycarbonat-Filter (Whatman® Nuclepore Track-Etch Membrane, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) bei einem Vakuum von $-200\ \text{mbar}$ filtriert. Von der Netzzug-Probe wurden $200\ \mu\text{l}$ an eine bulgarische Kollegin zur mikroskopischen

und genomischen Untersuchung weitergegeben. Der Rest wurde über einem Siebturm, bestehend aus einem 200 μm -, 50 μm - und 20 μm -Sieb, fraktioniert. Die drei Fraktionen wurden jeweils in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit filtriertem Seewasser auf 30 ml aufgefüllt und die Inhalte anschließend zu gleichen Teilen auf jeweils zwei weitere 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt, sodass identische Proben sowohl für die Analyse der lipophilen Toxine (inklusive Domoinsäure) als auch für die Analyse der PSP-Toxine zur Verfügung standen. Vor dem Separieren wurde auf eine vollständige Homogenisierung der Proben geachtet und der schnell auftretende Bodensatz durch Schütteln zurück in Lösung gebracht. Im Anschluss wurden die insgesamt sechs Zentrifugenröhrchen bei 5289 x g für 20 min zentrifugiert (JOUAN Italia Srl PK130, Rodano, MI, Italien) und der Überstand abdekantiert. In einigen Fällen war nach Abnehmen des groben Überstands eine weitere Zentrifugation bei 5289 x g für 10 min notwendig, um restliche Schwebstoffe aus dem übrigen Überstand zu pelletieren. Nach erneutem Abdekantieren wurden die Pellets resuspendiert und quantitativ in jeweils ein 2 ml Kryovial überführt. Nach erneuter Zentrifugation bei 16 163 x g für 15 min (Sigma 1-14, Osterode, Deutschland) wurden die Überstände abgenommen und die Pellets bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Sowohl an den Stationen des Netzzugs als auch an zwei bis drei weiteren Stationen pro Tag wurden mit den Wasserschöpfern der CTD jeweils das Oberflächenwasser (0 - 5 m), das Chlorophyllmaximum (i.d.R. 5 - 50 m) und eine dritte Tiefe mit einem Volumen von jeweils 5 l beprobt. Diese Proben sollten auf Azaspirosäuren und auf DNA der Gattungen *Azadinium* und *Amphidoma*, welche zu den AZA-Produzenten gehören, untersucht werden. Das Wasser aus den unterschiedlichen Tiefen wurde zunächst mit Hilfe eines 20 μm -Siebs vorfiltriert und schließlich in einem Eimer vereinigt. Sowohl für die Analyse von Azaspirosäuren als auch für die DNA-Analyse wurde ein dokumentiertes Volumen ($V_{\text{filtriert}}$: minimal 0,74 l, maximal 4,0 l) über einen 3 μm Membran-Polycarbonat-Filter bei einem Vakuum von -200 mbar filtriert. Die noch feuchten Filter wurden unter zur Hilfenahme zweier Pinzetten jeweils mit der Rückseite an die innere Wand eines 50 ml Zentrifugenröhrchen befestigt. Der Filter für die Azaspirosäuren-Untersuchung wurde anschließend vorsichtig mit einem Milliliter Methanol (99,4%, Marvel Ltd., Plowdiw, Bulgarien) gespült. Das Methanol wurde erneut mit einer Pipette aufgezogen und der Filter erneut gespült. Der Vorgang wurde bis zur vollständigen Entfärbung des Filters wiederholt. Der Methanolextrakt wurde schließlich in ein 2 ml Kryovial überführt und bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Dem Zentrifugenröhrchen, welches den DNA-Filter enthielt, wurden 30 ml filtriertes Seewasser hinzugefügt. Es wurde darauf geachtet, dass der zunächst an der Wand befindliche Filter sich nun freischwimmend in der

Wassersäule befand. Daraufhin wurde das Zentrifugenröhrchen für eine Minute gevortext, der Filter entfernt und das Röhrchen bei 5289 x g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das resuspendierte Pellet in ein 2 ml Kryovial überführt. Das Zentrifugenröhrchen wurde mit 500 µl Extraktionspuffer SL1 (NucleoSpin Soil Kit, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gespült und die restlichen Zellen ebenfalls quantitativ in das Kryovial überführt. Dieses wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.1.2 Amphidinol-Methodenentwicklung

Zur eigentlichen Methodenentwicklung standen 10,5 µg Luteophanol D zur Verfügung. Dieses Material wurde von F. García-Camacho, Universität Almería, Spanien, bereitgestellt und aus dem *Amphidinium carterae* Stamm ACRN03 isoliert (Molina-Miras et al., 2018). Der pulverförmige Standard wurde in 800 µl Methanol gelöst, sodass die Konzentration der Standardlösung in etwa 13 ng/µl betrug.

Insgesamt wurden Proben von neun verschiedenen *Amphidinium* Stämmen untersucht. Die Stämme CCMP1314(A), CCMP1314(B), ACRN02, ACRN03, DN241EHU und A01BR wurden wie auch das Standardmaterial von der Universität von Almería bereitgestellt. Mit Ausnahme des zuletzt genannten Stamms wurden lediglich die Rückstände, welche nach Verdampfung des Algenextrakts entstanden und die Amphidinole enthalten, in einer Braunglasflasche empfangen. Tabelle 2 zeigt die Eigenschaften, unter denen die Algen in Spanien kultiviert und geerntet wurden. Der Stamm A01BR wurde als geerntetes Pellet empfangen und selbst extrahiert (s. Abschnitt 2.2). Darüber hinaus wurden drei *Amphidinium* Stämme untersucht, welche von Kollegen aus Mexiko isoliert und in den Laboren des Alfred-Wegener-Instituts kultiviert wurden (AA39, AA40, AA60). Informationen zu den Kulturbedingungen dieser Stämme sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 2. Kulturbedingungen und Eigenschaften der untersuchten *Amphidinium carterae* Proben aus Spanien

	CCMP1314 (A)	CCMP1314 (B)	ACRN02	ACRN03	DN241- EHU
Art	<i>A. carterae</i> <i>Hulburt</i>	<i>A. carterae</i> <i>Hulburt</i>	<i>A.</i> <i>carterae</i>	<i>A.</i> <i>carterae</i>	<i>A.</i> <i>carterae</i>
Probenahme- stelle	Falmouth, Massachu- setts, Atl. Ozean	Falmouth, Massachu- setts, Atl. Ozean	La Réunion, Ind. Ozean	La Réunion, Ind. Ozean	Mallorca, Mittel- meer
Kultur- medium	F/2 Guillard	F/2 Guillard	mod. K- Medium	mod. K- Medium	F/2 Guillard
Temperatur [°C]	19	19	19	19	19
Bestrahlungs- stärke [$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	60	60	60	60	60
Erntezeit- punkt	frühe stationäre Phase	frühe stationäre Phase	frühe sta- tionäre Phase	frühe sta- tionäre Phase	frühe stationäre Phase
Zelldichte [Zellen/ml]	690000	500000	400000	100000	792000
Volumen [ml]	20	20	25	100	13
Zellzahl	$13,8 \times 10^6$	10×10^6	10×10^6	10×10^6	$10,3 \times 10^6$

Tabelle 3. Kulturbedingungen und Eigenschaften der untersuchten *Amphidinium* Proben aus Mexiko

	AA39	AA40	AA60
Art	<i>A. sp.</i>	<i>A. sp.</i>	<i>A. sp.</i>
Probenahmestelle	Balandra, Golf von Kalifornien	Balandra, Golf von Kalifornien	Veracruz, Golf von Mexiko
Kulturmedium	1/10 K-Medium	1/10 K-Medium	1/10 K-Medium
Temperatur [°C]	24	24	24
Bestrahlungsstärke [$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	70	70	70
Erntezeitpunkt	späte stationäre Phase	späte stationäre Phase	späte stationäre Phase
Zelldichte [Zellen/ml]	30000	10000	3000
Volumen [ml]	300	300	180
Zellzahl	9×10^6	3×10^6	$0,54 \times 10^6$

2.2 Probenextraktion

2.2.1 Schalentier-Toxine im Schwarzen Meer

In den Laboren des Alfred-Wegener-Instituts Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung wurden die Proben der Ausfahrt weiter aufgearbeitet. Zur Extraktion der PSP-Toxine wurden dem Zellpellet zunächst 400 µl 0,03 M Essigsäure (p.a., Merck, Darmstadt, Deutschland) und 0,9 g Lysing Matrix D (Thermo Savant, Illkirch, Frankreich) hinzugefügt. Nach Verschließen und Vortexen des Kryovials wurden die Zellen durch kontinuierliche, vertikale Winkelbewegungen bei maximaler Geschwindigkeit (6,5) für 45 s in einem Bio 101 FastPrep Gerät (Thermo Savant, Illkirch, Frankreich) lysiert. Anschließend wurden feste Zellreste und die Lysing Matrix D durch Zentrifugation bei 16 100 x g und 10 °C für 5 min (Eppendorf 5415 R, Hamburg, Deutschland) von dem Essigsäureextrakt getrennt. Dieser wurde in einen Zentrifugationsfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm (Milipore Ultrafree, Eschborn, Deutschland) überführt und bei 16 100 x g und 10 °C für 1 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde abschließend in ein *high performance liquid chromatography* (HPLC)-Probengefäß (Vial, crimp, 2 ml, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) transferiert, mit einem Deckel mit Gummi-Septum (11 mm Silver Aluminium Crimp Cap, PTFE/red rubber septa, Agilent Technologies) verschlossen und bis zur Messung bei -20 °C gelagert. In wenigen Fällen betrug das Volumen des Extraktes weniger als die zuvor hinzugefügten 400 µl, sodass er zur Erhöhung des Füllstands in ein kegelförmiges HPLC-Probengefäß (Vial, crimp top, micro sampling, Agilent Technologies) überführt wurde.

Die Extraktion von lipophilen Toxine glich bis auf wenige Ausnahmen der Extraktion von PSP-Toxine. Jedoch wurde als Extraktionsmittel Methanol (HPLC-grade, Merck) statt Essigsäure verwendet und die Probengefäße mit einem Deckel mit Silikon-Septum verschlossen (11 mm Silver Aluminium Crimp Cap, PTFE/silicone septa, Agilent Technologies).

Zur Weiterverarbeitung der in Methanol gelösten AZA-Proben wurde das Methanol zunächst unter Zuhilfenahme von Stickstoff vollständig verdampft. Die trockenen Proben wurden mit 300 µl Aceton (HPLC-grade, Merck) versetzt und für 30 s gevortext. Der Extrakt wurde in einen Zentrifugationsfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm überführt und bei 16 100 x g und 10 °C für 1 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde abschließend in ein kegelförmiges HPLC-Probengefäß überführt und mit einem Deckel mit Silikon-Septum verschlossen. Die DNA-Filter wurden zunächst nicht weiter bearbeitet und bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Amphidinol-Methodenentwicklung

Die Proben der *Amphidinium carterae* Stämme CMP1314A, CCMP1314B, ACRN02, ACRN03 und DN241EHU wurden bereits extrahiert geliefert. Die in den Braunglasflaschen befindlichen Rückstände wurden dreimal mit jeweils 400 μ l Methanol gelöst und in ein HPLC-Probengefäß überführt. Das Methanol wurde unter einem Abzug mit Stickstoff vollständig verdampft. Die Rückstände wurden anschließend mit 100 μ l Methanol gelöst und in einen Zentrifugationsfilter mit einer Porengröße von 0,45 μ m überführt. Die HPLC-Probengefäße wurden nochmals mit 50 μ l Methanol gespült und die entstandenen Extrakte ebenfalls in den Zentrifugationsfilter überführt. Die Extrakte wurden bei 16 100 x g und 10 °C für 1 min zentrifugiert, um Schwebstoffe zu entfernen. Abschließend wurden die Filtrate in kegelförmige HPLC-Probengefäße überführt und mit einem Deckel mit Silikon-Septum verschlossen. Die Proben wurden bis zur Messung bei –20 °C gelagert.

Die Probe des Stamms A01BR wurde als trockenes Pellet in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen empfangen. Nach der Zugabe von 5 ml Methanol wurde das Pellet 1 min mit einem Ultraschallstab (SONOPLUS HD2070 MS72, Bandelin electronic, Berlin, Deutschland) bei 70% Cycle und 72% Power aufgeschlossen. Durch kurzes Vortexen wurden die sich an der Röhrchenwand befindenden Zellen zurück in die Lösung gespült und die Ultraschallbehandlung unter denselben Einstellungen wiederholt. Anschließend wurde die Probe bei 5250 x g für 5 min abzentrifugiert (Allegra X-15 R Laborzentrifuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland), um feste Zellbestandteile zu pelletieren. Der Überstand wurde zu gleichen Teilen auf vier HPLC-Probengefäße aufgeteilt und mit Deckeln mit Silikon-Septum verschlossen. Diese wurden bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert. Von einer Aliquote wurden 300 μ l abgenommen und in einen 0,45 μ m Zentrifugationsfilter überführt. Nach der Zentrifugationsfiltration bei 16 100 x g und 10 °C für 1 min wurde die Probe in ein kegelförmiges HPLC-Probengefäß gegeben und mit einem Deckel mit Silikon-Septum verschlossen. Da die Messung der zentrifugationsfiltrierten Probe keine positiven Ergebnisse lieferte, wurden die vier Extrakte vereinigt und aufkonzentriert. Dazu wurden die Extrakte in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen vereinigt (ca. 4,5 ml) und das Methanol schrittweise mit Stickstoff verdampft. Sobald das Volumen innerhalb des Zentrifugenröhrchens um 1 ml gesunken war, wurde die Probe gevortext, um die an der Wand befindlichen Rückstände in die Lösung zu spülen. Dies wurde solange wiederholt, bis das Methanol komplett verdampft war und sich die Rückstände im unteren Teil des Zentrifugenröhrchens befanden. Diese wurden schließlich mit 500 μ l Methanol gelöst und zu gleichen Teilen auf zwei HPLC-Probengefäße aufgeteilt. Das Zentrifugenröhrchen wurde anschließend zweimal mit

jeweils 100 µl Methanol gespült und dieses ebenfalls auf die zwei HPLC-Probengefäße aufgeteilt. Somit konnte das anfängliche Volumen von ca. 4,5 ml in vier Gefäßen auf 700 µl in zwei Gefäßen reduziert werden. Von einem der zwei Aliquote wurden anschließend 200 µl nach dem bereits erwähnten Schema zentrifugationsfiltriert und bis zur Messung bei -20°C gelagert.

Die Stämme AA39, AA40 und AA60 wurden in Kulturen in 500 ml Flaschen im Alfred-Wegener-Institut gehalten. Volumina, Zelldichten und Medium sind in Tabelle 3 dargestellt. Zunächst wurden die Kulturen gleichmäßig auf 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und die Flaschen zweimal mit jeweils 50 ml 1/10 K-Medium ausgespült, welches ebenfalls in die Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Die AA39- und AA40-Kulturen wurden jeweils auf acht Röhrchen und die AA60-Kultur auf sechs Röhrchen aufgeteilt. Die Proben wurden bei $5250 \times g$ für 15 min in einer Allegra X-15 R Laborzentrifuge (Beckman Coulter GmbH) pelletiert und der Überstand zurück in die 500 ml Flaschen dekantiert. Die Pellets der jeweiligen Kulturen wurden in dem verbliebenen Medium resuspendiert und quantitativ in jeweils einem Röhrchen vereinigt. Anschließend wurden die Proben erneut bei $5250 \times g$ für 15 min abzentrifugiert und die Überstände ebenfalls zurück in die 500 ml Flaschen dekantiert. Die Pellets wurden erneut resuspendiert und quantitativ in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Durch eine weitere Zentrifugation bei $16\,100 \times g$ und 10°C für 15 min konnte das verbliebene Medium abgenommen und die Pellets somit vollständig getrocknet werden. Zur eigentlichen Extraktion der trockenen Zellpellets wurden diese in 500 µl Methanol gelöst und jeweils quantitativ in ein 2 ml Kryovial überführt. Dem wurden 0,9 g Lysing Matrix D hinzugefügt und die Vials verschlossen und gevortext. Die Zellen wurden dann durch kontinuierliche, vertikale Winkelbewegungen bei maximaler Geschwindigkeit (6,5) für 45 s in einem Bio 101 FastPrep Gerät lysiert. Anschließend wurden feste Zellreste und die Lysing Matrix D durch Zentrifugation bei $16\,100 \times g$ und 10°C für 5 min von dem Methanolextrakt getrennt. Dieser wurde in einen Zentrifugationsfilter mit einer Porengröße von $0,45 \mu\text{m}$ überführt und bei $16\,100 \times g$ und 10°C für 1 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde abschließend in ein HPLC-Probengefäß transferiert und mit einem Deckel mit Silikon-Septum verschlossen. Aufgrund der Größe der Pellets der Stämme AA39 und AA40 wurden diese ein zweites Mal extrahiert, indem ein weiteres Mal 500 µl Methanol hinzugegeben und die folgenden Schritte erneut durchgeführt wurden. Die Filtrate nach der Zentrifugationsfiltration wurden mit den Filtraten der ersten Extraktion vereint. Um vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurden die Extrakte aller drei Stämme mit Stickstoff abgedampft und die Rückstände abschließend mit 200 µl Methanol gelöst. Die Proben wurden bis zur Messung bei -20°C gelagert.

Die zurückdekantierten Überstände der Stämme AA39, AA40 und AA60 wurden ebenfalls auf Amphidinole untersucht. Dessen Extraktion wurde freundlicherweise von Frau Annegret Müller übernommen. Das zugrundeliegende Protokoll befindet sich als Excel-Datei („Extraktion Kulturüberstände.xlsx“) auf der beiliegenden CD.

2.3 Flüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenz-Detektion (LC-FD)

Zur Messung von PSP-Toxinen wurde Flüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenz-Detektion (*liquid chromatographie with fluorecence detection*, LC-FD) genutzt. Das LC1100 Serien System (Agilent Technologies) umfasst einen G1379A Entgaser, eine G1311A quaternäre Pumpe, einen G1329A Autosampler, einen G1330B Autosampler-Thermostat, einen G1316A Säulen-Thermostat und einen G1321A Fluoreszenz-Detektor. Das System ist verbunden mit einer PCX 2500 Nachsäulenderivatisierungs-Einheit (Pickering Laboratories, Mountain View, CA, USA). Das benötigte Wasser wurde deionisiert und auf eine Qualität von mindestens $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ gereinigt (Milli-Q, Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland). Eluent A enthielt 6 mM 1-Octansulfonsäure und 6 mM 1-Heptansulfonsäure (beide Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in 40 mM Ammoniumphosphat (HPLC-grade, Merck). Die Lösung wurde mit verdünnter Phosphorsäure (p.a., Applichem, Darmstadt, Deutschland) auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt und mit 0,75 % Tetrahydrofuran (THF) (HPLC-grade, Merck) versetzt. Eluent B enthielt 13 mM 1-Octansulfonsäure in 50 mM Phosphorsäure und wurde mit Ammoniumhydroxid (25 %, HPLC-grade, Merck) auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Zusätzlich wurden dem Eluenten 15 % (v/v) Acetonitril (HPLC-grade, Merck) und 1,5 % THF hinzugefügt. Die Flussrate betrug 1 ml min^{-1} mit folgendem Gradienten: 0 min, 100 % A isokratisch bis 15 min, Wechsel auf 100 % B bis 16 min, isokratisch B bis 35 min, Wechsel auf 100 % A bis 36 min, isokratisch 100 % A bis 45 min (= Gesamtlaufzeit). Der Autosampler-Thermostat wurde auf eine Temperatur von 8°C eingestellt und das injizierte Volumen betrug $20 \mu\text{l}$. Die Trennung erfolgte durch eine Luna C18 rp Säule (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) mit einer Länge von 250 mm, einem Innendurchmesser von 4,6 mm und einem Partikeldurchmesser von $5 \mu\text{m}$. Als Vorsäule wurde eine Phenomenex SecuriGuard verwendet. Die Nachsäulenderivatisierung erfolgte zunächst durch 10 mM Periodsäure (Sigma) in 550 mM Ammoniumhydroxid bei einer Flussrate von $0,4 \text{ ml min}^{-1}$ und einer Temperatur von 50°C . Anschließend wurde das Eluat mit 0,75 M Salpetersäure (p.a., Applichem) bei einer Flussrate von $0,4 \text{ ml min}^{-1}$ weiter derivatisiert. Die Messung der Toxine erfolgte über einen Dual-Monochromator

Fluoreszenz-Detektor bei einer Extinktionswellenlänge von 333 nm und einer Emissionswellenlänge von 395 nm. Die Datenerfassung und -bearbeitung erfolgte durch die Software HP ChemStation. Zur Identifikation und Quantifizierung der Toxine wurde ein PSP-Mischstandard verwendet, welcher folgende Komponenten enthielt: Saxitoxin (STX), Neosaxitoxin (NEO), decarbamoyl-Saxitoxin (dcSTX), Gonyautoxin 1-5 (GTX-1-GTX-5) und decarbamoyl-Gonyautoxin 2 und 3 (dcGTX-2, dcGTX-3). Diese Einzelstandards stammen vom *Institute of Marine Biology*, Halifax, NS, Kanada. Die Nachweisgrenze (NWG) wurde als dreifaches Signal/Rausch-Verhältnis (engl. *signal-to-noise-ratio*, S/N-Verhältnis) definiert und nach Formel 1 berechnet.

$$NWG \text{ [ng/}\mu\text{l]} = \frac{3 \cdot c_{\text{Standard}} \text{ [ng/}\mu\text{l]}}{S/N} \quad (1)$$

Toxinmengen und Nachweisgrenzen bei Proben dieser Art werden jedoch üblicherweise in Nanogramm pro Netzzug angegeben (engl. *net tow*, NT). Zur Berechnung der Nachweisgrenzen wurden dementsprechend die Formeln 2 und 3 verwendet.

$$NWG \text{ [ng/NT]} = NWG \text{ [ng/}\mu\text{l]} \cdot \frac{V_{\text{Extrakt}} \text{ [}\mu\text{l]} \cdot V_{\text{Netzzug}} \text{ [ml]}}{V_{\text{AliquotPSP}} \text{ [ml]}} \quad (2)$$

$$V_{\text{AliquotPSP}} \text{ [ml]} = \frac{V_{\text{Netzzug}} \text{ [ml]} - 200 \text{ ml}}{2} \quad (3)$$

Das Extraktionsvolumen entspricht dabei dem Volumen der Essigsäure, mit dem das Zellpellet extrahiert wurde (i.d.R. 400 μl , vgl. Abschnitt 2.2.1). Das Volumen des Netzzuges entspricht dem Volumen, auf das der Inhalt der Netzzugflasche aufgefüllt wurde (i.d.R. 1,0l, maximal 2,0l, vgl. Abschnitt 2.1.1). Das Volumen des PSP-Aliquots entspricht stets dem halben Netzzugvolumen, nachdem 200 ml an die bulgarische Kollegin gegeben wurden (vgl. Abschnitt 2.1.1).

2.4 Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Zur Messung der Amphidinole, der lipophilen Toxine inklusive Azaspirosäuren als auch der Domoinsäure wurde Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC[®]) gekoppelt mit Tandem Quadrupole Massenspektrometrie verwendet. Das UPLC-System umfasst einen AQUITY UPLC Säulenofen, einen AQUITY I UPLC Class

Autosampler und eine AQUITY I UPLC Class binäre Pumpe. Die Trennung erfolgte durch eine Purospher® STAR RP-18 endcapped (2 µm) Hibar® HR 50-2.1 UPLC-Säule der Firma Merck. Zum Schutz der Säule wurde eine 0,5 µm OPTS-SOLV® EXP™ Vorsäule von Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland verwendet. Dieses System ist an das Xevo® TQ-XS Massenspektrometer (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland) gekoppelt. Mit Hilfe der Software Masslynx (Version 4.2, Waters) wurden die Daten erfasst und analysiert. Um die Toxine eindeutig zu identifizieren wurden neben den im „Selected Reaction Monitoring“ (SRM) definierten Massenübergängen zusätzlich die Retentionszeiten der Toxine aus den Standards mit denen im Probenmaterial verglichen. Es erfolgte eine Betrachtung der Chromatogramme, welche die Summe aller auftretenden Toxine nach dem Zeitpunkt ihrer Elution in einer Probe widerspiegeln. Mithilfe der Daten aus den SRM-Scans und der Software TargetLynx XS (Waters) wurden gefundene Toxine quantifiziert und Nachweisgrenzen berechnet. Zur Quantifizierung war die Erstellung einer Auswertemethode notwendig. Nach Festlegung der Übergänge zu den entsprechenden Toxinen wurden bis auf die ausgeschaltete Glättungs-Funktion die Standardeinstellungen verwendet. Die Nachweisgrenze wurde generell als dreifaches S/N-Verhältnis definiert und wie zuvor nach Formel 1 (siehe Abschnitt 2.3) berechnet. Das S/N-Verhältnis wurde mithilfe der TargetLynx Software bestimmt. Dabei wurden die Optionen „N0 Extra Processing“, „Peak to Peak“, „Use (n-1) for RMS“ und „Use Underlying Raw Data“ verwendet. Je nach Probenart bot es sich an, zusätzliche Nachweisgrenzen, bezogen auf andere Parameter, zu berechnen. Diese Berechnungen sind in den einzelnen Unterabschnitten angegeben.

Außerdem wurden vor allem bei den Amphidinolmessungen, aber auch teilweise bei Messungen der Proben aus dem Schwarzen Meer, Produktionen-Spektren („Enhanced Product Ion“-Scans, EPI-Scans) aufgenommen. Diese dienten einerseits zur eindeutigen Identifizierung von bekannten Substanzen, indem die aufgenommenen charakteristischen Fragmentierungsmuster mit denen der Literatur verglichen wurden. Andererseits konnten durch die Produktionen-Spektren Rückschlüsse auf die Struktur gezogen werden, um dadurch unbekannte Substanzen besser beschreiben zu können. Nachfolgend werden die verschiedenen Eluenten, Gradienten und Massenspektrometernethoden für die unterschiedlichen Toxin-Analysen beschrieben. Die für alle Messungen identischen Einstellungen des Massenspektrometers sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4. Massenspektrometrische Parameter für die Messung von Amphidinolen, lipophilen Toxinen inklusive Azaspirosäuren und Domoinsäure

Ionenquelle	
Kapillarspannung [kV]	2,00
Kegelspannung [V]	45
Verdampfungstemperatur [°C]	600
Gasfluss	
Verdampfung [l/h]	1000
Kegel [l/h]	150
Zerstäuber [bar]	7,0
weiteres	
Autosampler-Thermostat [°C]	8
Säulentemperatur [°C]	40

2.4.1 Messung von lipophilen Toxinen

Für die Messung von lipophilen Toxinen wurde Reinstwasser, versetzt mit 2,5 mM Ameisensäure (99 %, p.a., Merck) und 6,7 mM Ammoniak als Eluent A verwendet und ein Acetonitril-Reinstwasser-Gemisch (9/1 v/v), versetzt mit 6,7 mM Ammoniak als Eluent B verwendet. Der Gradient war wie folgt: Initialisiert wurde die Messung mit 70 % A und einem Fluss von $0,2 \text{ ml min}^{-1}$ bis 1,5 min, gefolgt von einem linearen Gradienten bis 3,5 min auf 10 % A und einem Fluss von $0,6 \text{ ml min}^{-1}$. Dieser Zustand wurde bis 4,0 min gehalten und der Gradient anschließend bei gleichbleibender Flussrate isokratisch auf Anfangsbedingungen bis 4,1 min zurückgebracht. Diese Einstellungen wurden bis 5,0 min (= Gesamtlaufzeit) beibehalten. Zur Identifikation und Quantifizierung der lipophilen Toxine wurden verschiedene, zerti-fizierte Standardlösungen verwendet. Dies waren Gymnodimin A (GYM-A), 13-Desmethylspirolid C (SPX-1), Okadasäure (OA), Dinophysistoxin-1 und -2 (DTX-1, DTX-2), Pectenotoxin 2 (PTX-2), Yessotoxin (YTX) und Azaspirosäure 1 (AZA-1). GYM-A, SPX-1, OA und PTX-2 wurden wie die PSP-Standards vom *Institute of Marine Biology* aus Kanada bezogen, während DTX-1, DTX-2, YTX und AZA-1 aus der Laboratorio CIFGA S.A., Lugo, Spanien stammen. Außerdem wurde ein Goniodomin A (GD-A) Standard verwendet, welcher aus *Alexandrium pseudogonyaulax* von A. Andersen (Krock et al., 2018) isoliert wurde. Die nachfolgende Tabelle 5 zeigt die gescannten Toxine und die entsprechenden Übergänge. Diese Methode war bereits vorhanden und wurde nicht selbst erstellt. Die Nachweisgrenze [pg/ μl] wurde dabei nach Formel 1 (siehe Abschnit 2.3) berechnet, während die Nachweisgrenze [pg/NT] nach Formel 2 berechnet wurde. Je nach Volumen des Netzzuges ergaben sich dabei jeweils eine maximale und eine minimale Nachweisgrenze.

Tabelle 5. Untersuchte lipophile Toxine inklusive zugehöriger Quantifizierungs- und Qualifizierungsübergänge. Mit einem „?“ gekennzeichnete Toxine sind bekannt, wurden jedoch noch nicht vollständig charakterisiert.

Toxin	Quant.- Übergang (m/z)	Qual.- Übergang (m/z)	Toxin	Quant.- Übergang (m/z)	Qual.- Übergang (m/z)
AZA-1	842→824	-	PnTx-G	694→164	-
AZA-2	856→838	-	PnTx-F	766→164	-
AZA-3	828→810	-	PTX-2	876→213	-
DTX-1	836→237	-	PTX-11	892→213	-
DTX-2	822→223	-	PTX-12	874→213	-
GD-A	786→733	786→607	PTX-2sa	894→213	-
GYM-A	508→490	-	SPX-1	692→164	-
GYM-B	524→506	-	SPX-A	692→150	-
GYM-C	524→506	-	SPX-B	694→150	-
GYM-D	524→506	-	SPX-C	706→164	-
GYM-E	526→508	-	SPX-D	708→164	-
12-Me- GYM-A	522→504	-	SPX-G	692→164	692→150
16- desMe- GYM-D	510→492	-	SPX-27- OH-13- desMe-C	694→180	-
GYM-?	540→522	-	SPX- 13,19- didesMe- C	926→908	-
GYM-?	542→524	-	SPX-20- desMe-D	694→150	-
GYM-?	548→530	-	20-Me- SPX-G	706→164	-
GYM-?	564→546	-	YTX	570→467	570→396
GYM-?	582→564	-	homo- YTX	1174→979	-
OA	822→223	-	45-OH- YTX	1176→981	-
OA-d8	946→223	-	homo-45- OH-YTX	1190→977	-
PnTx-E	784→164	-			

2.4.2 Messung von Domoinsäure

Zur Messung von Domoinsäure wurden die Konzentrationen von Ameisensäure und Ammoniak in Eluent A gegenüber der Messung für lipophile Toxine von 2,5 mM/6,7 mM auf 9,5 mM/10,0 mM angehoben. Reines Acetonitril stellte den Eluenten B dar. Die Flussrate für die Domoinsäuremessung betrug konstant $0,2 \text{ ml min}^{-1}$ und der Gradient war wie folgt: Initialisiert wurde die Messung mit 99 % A mit einem anschließenden linearen Gradienten auf 5 % A bis 5,0 min. Dieser Zustand wurde bis 8,5 min gehalten, worauf der Gradient auf Anfangsbedingungen mit 99 % A bis 9 min zurückgebracht wurde. Zur Identifikation und Quantifizierung wurde ein zertifizierter Domoinsäure-Standard von Laboratorio CIFGA S.A. verwendet. Die Methode enthielt den Quantifizierungsübergang 312→266 und den Qualifizierungsübergang 312→193. Die Nachweisgrenze [pg/µl] wurde dabei nach Formel 1 (siehe Abschnitt 2.3) berechnet, während die Nachweisgrenze [pg/NT] nach Formel 2 berechnet wurde. Je nach Volumen des Netzzuges ergaben sich dabei jeweils eine maximale und eine minimale Nachweisgrenze.

2.4.3 Messung von Azaspirosäuren

Die Eluenten für die AZA-Messung setzten sich aus Reinstwasser (Eluent A) bzw. einem Acetonitril-Reinstwasser-Gemisch (90 %) (Eluent B) zusammen, jeweils versetzt mit 6,7 mM Ammoniak. Letzteres lag als 25 %iges Ammoniumhydroxid vor. Der Gradient entsprach dem der Messung von lipophilen Toxinen (siehe Abschnitt 2.4.1). Es wurde eine SRM-Methode verwendet, welche nach allen Azaspirosäuren scannt, die direkt von Dinoflagellaten produziert werden und nicht erst durch den Metabolismus in der Muschel entstehen. Von diesen Metaboliten wurde lediglich nach AZA-3 und AZA-7 gesucht, da diese in der Lebensmittelindustrie ebenfalls kontrolliert werden (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2005). Die untersuchten Azaspirosäuren mit den jeweiligen Massenübergängen sind in Tabelle 6 dargestellt. In manchen Fällen tritt ein Übergang nicht nur bei einem, sondern bei mehreren Toxinen auf. In diesen Fällen wurde neben dem eigentlichen Quantifizierungsübergang ein zusätzlicher Qualifizierungsübergang verwendet. Einige Azaspirosäuren kommen außerdem in phosphatierter Form (-P) vor und sind somit 80 Da schwerer als die nicht-phosphatierten Azaspirosäuren. Diese Methode war bereits vorhanden und wurde nicht selbst erstellt.

Tabelle 6. Untersuchte Azaspirosäuren inklusive zugehöriger Quantifizierungs- und Qualifizierungsübergänge. Mit einem „?“ gekennzeichnete Toxine sind bekannt, wurden jedoch noch nicht vollständig charakterisiert.

Toxin	Quant.- Übergang (m/z)	Qual.- Übergang (m/z)	Toxin	Quant.- Übergang (m/z)	Qual.- Übergang (m/z)
AZA-?	920→804	920→348	AZA-58	828→810	-
AZA-?	928→910	928→348	AZA-59	860→842	-
AZA-1	842→824	842→672	AZA-60	828→810	828→348
AZA-2	856→838	856→672	AZA-62	870→852	-
AZA-3 (Metabolit)	828→810	828→658	AZA-1-P	922→904	-
AZA-7 (Metabolit)	858→840	-	AZA-2-P	936→918	936→802
AZA-11	872→854	872→362	AZA-7-P	938→920	-
AZA-33	716→698	-	AZA-11-P	952→934	952→818
AZA-34	816→798	-	AZA-33-P	796→778	-
AZA-35	830→812	830→362	AZA-34-P	896→878	-
AZA-36	858→840	858→348	AZA-35-P	910→892	-
AZA-37	846→828	846→348	AZA-36-P	938→920	-
AZA-38	830→812	830→348	AZA-37-P	926→908	-
AZA-39	816→798	816→348	AZA-38-P	910→892	-
AZA-40	842→824	-	AZA-39-P	896→878	-
AZA-41	854→836	854→670	AZA-40-P	922→904	-
AZA-42	870→852	870→360	AZA-41-P	934→916	-
AZA-43	828→810	-	AZA-42-P	950→932	-
AZA-50	842→824	842→348	AZA-50-P	922→904	-
AZA-51	858→840	858→348	AZA-51-P	938→920	-
AZA-52	830→812	830→348	AZA-52-P	910→892	-
AZA-53	830→812	830→348	AZA-53-P	910→892	-
AZA-54	870→852	-	AZA-54-P	950→932	-
AZA-55	868→850	868→362	AZA-59-P	940→922	-
AZA-56	884→866	-	AZA-62-P	950→932	-
AZA-57	844→826	-			

Zur Identifikation und Quantifizierung der Azaspirosäuren wurde eine zertifizierte AZA-1 Standardlösung aus der Laboratorio CIFGA S.A. verwendet. Die Nachweisgrenze wurde wie zuvor als dreifaches S/N-Verhältnis definiert und nach Formel 1 (siehe Abschnitt 2.3) berechnet. Toxinmengen und Nachweisgrenzen bei Proben, welche aus dem filtrierten Meerwasser aus den Wasserschöpfern stammen, werden jedoch üblicherweise pro Liter Meerwasser angegeben. Dies wurde nach folgender Formel berechnet:

$$NWG \text{ [ng/l]} = \frac{NWG \text{ [ng/}\mu\text{l]} \cdot V_{\text{Extrakt}} \text{ [}\mu\text{l]}}{V_{\text{Filtration}} \text{ [l]}} \quad (4)$$

Das Extraktionsvolumen entspricht dabei dem Acetonvolumen, mit dem die abgedampften AZA-Rückstände gelöst wurden (300 μl , vgl. Abschnitt 2.2.1), während das Filtrationsvolumen dem Volumen des Wassers entspricht, welches über den Filter gelaufen ist (0,74 bis 4,01, vgl. Abschnitt 2.1.1).

2.4.4 Messung von Amphidinolen/Methodenentwicklung

Die Methodenentwicklung erfolgte auf Basis der Methode nach Krock et al. (2017), in der auf einem HPLC-MS/MS-System Karlotoxine gemessen wurden. Diese sind strukturell eng mit den Amphidinolen verwandt und besitzen ähnliche physikalische und chemische Eigenschaften, sodass davon ausgegangen wurde, dass jene Parameter und Einstellungen auch für die Amphidinolmessung zu Erfolgen führen sollten. Die hier getesteten Parameter wurden schließlich für die Aufnahme von SRM-, Neutralverlust- (engl. *neutralloss*, NL) und EPI-Scans verwendet. Für die SRM- und NL-Methodenentwicklung waren neben den hier aufgeführten messtechnischen Parametern theoretische Information und Gedankengänge notwendig, welche im Ergebnisteil unter Abschnitt 3.2 erläutert werden.

Die Nachweisgrenze wurde erneut als dreifaches S/N-Verhältnis definiert und nach Formel 1 berechnet. In einigen Proben war die Zellzahl bekannt, sodass die Nachweisgrenze auch in Pikogramm pro Zelle angegeben werden konnte. Dazu wurde die Formel 5 verwendet.

$$NWG \text{ [pg/Zelle]} = NWG \text{ [pg/}\mu\text{l]} \cdot \frac{V_{\text{Extrakt}} \text{ [}\mu\text{l]}}{\text{Zellzahl}} \quad (5)$$

Chromatographische Parameter

Zunächst wurden für die Messungen die Eluenten nach Krock et al. (2017) verwendet. Dabei setzte sich Eluent A aus Reinstwasser, versetzt mit 2 mM Ammoniumformiat und 50 mM Ameisensäure, zusammen. Ein Acetonitril-Reinstwasser-

Gemisch (95/5 v/v), ebenfalls versetzt mit 2 mM Ammoniumformiat und 50 mM Ameisensäure, stellte Eluent B dar. Der Gradient aus der HPLC-Karlotoxin-Methode wurde auf das UPLC-System angepasst und die Gesamtlaufzeit von 23 min auf 5 min verringert. Anschließend wurde ein zweites Eluentenpaar getestet, welches standardmäßig am UPLC-MS/MS-System für die Messung verschiedener Schalentier-Toxine verwendet wird und von Waters für die Messung jener Toxine empfohlen wurde (Gerssen et al., 2013). Dabei setzte sich Eluent A aus Reinstwasser und 6,7 mM Ammoniak zusammen, während als Eluent B ein Acetonitril-Reinstwasser-Gemisch (9/1 v/v), versetzt mit 6,7 mM Ammoniak verwendet wurde. Die Flussrate betrug konstant $0,6 \text{ ml min}^{-1}$ und der zunächst verwendete Gradient war wie folgt: Initialisiert wurde die Messung mit 70 % A bis 1,5 min, gefolgt von einem linearen Gradienten bis 3,5 min auf 10 % A. Dieser Zustand wurde bis 4,0 min gehalten und der Gradient anschließend isokratisch auf Anfangsbedingungen bis 4,1 min zurückgebracht. Diese Einstellungen wurden bis 5,0 min (= Gesamtlaufzeit) beibehalten. Die Anteile der Eluenten A und B wurden hierbei häufig variiert, um unterschiedliche Ergebnisse zu erzielen und um auf verschiedene Probleme zu reagieren. So wurde beispielsweise der anfängliche Anteil von Eluent A von 70 % auf 80 %, 85 % und 90 % erhöht.

Neben den Eluenten und Gradienten wurde außerdem das benötigte Injektionsvolumen untersucht. Dabei wurden vom Luteophanol-D-Standard und den vorliegenden Proben zwischen $0,5 \mu\text{l}$ und $2 \mu\text{l}$ injiziert und überprüft, mit welchem minimal möglichen Volumen ein gutes Ergebnis erzielt werden konnte. Dies schließt einen eindeutigen Peak im Chromatogramm und ein erfolgreiches Produktions-Spektrum ein.

Massenspektrometrische Parameter

An den Grundeinstellungen des Massenspektrometers wurden keine Veränderungen vorgenommen, sodass für die Methodenentwicklung stets die Einstellungen aus Tabelle 4 verwendet wurden. Für die spezifische Untersuchung von Amphidinolen war speziell die Kollisionsenergie entscheidend. Diese trägt maßgeblich zur Fragmentierung der Substanzen bei, weshalb sie für die Identifizierung von Amphidinolen mittels Produktions-Scan und die darauf aufbauende SRM-Methode von hoher Bedeutung ist. Daher wurde die Kollisionsenergie im umfangreichen Maß getestet und untersucht. Dies geschah zunächst an dem Luteophanol-D-Standard, welcher im Produktions-Scan mit Kollisionsenergien zwischen 15 eV und 100 eV fragmentiert wurde. Dabei sollten Produktions-Spektren entstehen, welchen den Spektren zu anderen Amphidinolen aus der Literatur ähnlich sehen. Bei später gefundenen

Amphidinolen wurden ähnliche Tests durchgeführt, um zu überprüfen, ob alle Toxine innerhalb dieser Toxinklasse unter gleichen Bedingungen ähnliche Ergebnisse liefern. Ein für die Methodenentwicklung weiterer untersuchter Parameter war die verwendete Scanzeit, aus welcher die Zahl der Messpunkte pro Peak und damit die Auflösung resultiert. Sowohl für die SRM- als auch für die NL-Methode wurde die Scanrate so gewählt, dass die Zahl der Messpunkte pro Peak in etwa bei 12 lag (Empfehlung des Herstellers). In den einzelnen Produktionen-Methoden wurde mit mehreren Scanraten gemessen und überprüft, bei welcher Scanrate sich Peaks am besten identifizieren ließen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Schalentier-Toxine im Schwarzen Meer

3.1.1 PSP-Toxine

Die Extrakte aus den fraktionierten Netzzug-Proben wurden mittels Flüssigkeitschromatographie aufgetrennt und vorhandene Toxine durch Fluoreszenz-Detektion gemessen. Die Identifikation der Toxine erfolgte über Vergleich der Retentionszeiten mit einem zuvor erstellten Multitoxinstandard, dessen Chromatogramm in Abbildung 8 dargestellt ist. In keiner der insgesamt 123 untersuchten Proben konnten PSP-Toxine nachgewiesen werden. Die mittels des Multitoxinstandards nach Formel 1 (siehe Abschnitt 2.3) berechnete Nachweisgrenze liegt bei 27,2 pg/ μ l, was nach Formel 2 in etwa 24 bis 41 ng/NT entspricht, je nach Volumen des Netzzuges.

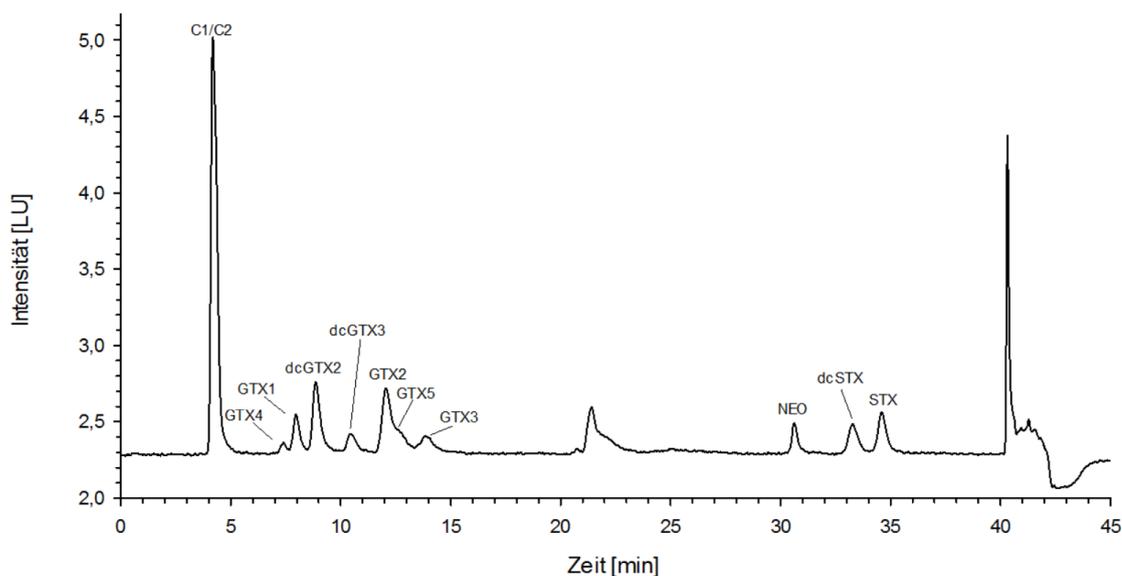


Abbildung 8. Chromatogramm des Multitoxinstandards, über dessen Vergleich PSP-Toxine identifiziert werden sollten.

Bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit wurden in bulgarischen Gewässern drei mal Proben auf PSP-Toxine untersucht. Kalinova et al. (2015) konnten in Muscheln, welche zwischen 2010 und 2014 gefangen wurden, geringe Mengen von Saxitoxin, decarbamoyl-Gonyautoxin 2, decarbamoyl-Gonyautoxin 3 und Gonyautoxin 5 nachweisen. Planktonproben wurden nicht untersucht. Peteva et al. (2018a) konnten hingegen in Muscheln, welche zwischen April 2015 und Juni 2016 gefangen wurden, keine PSP-

Toxine nachweisen. In Peteva et al. (2018c) wurden neben Muscheln erstmals Planktonproben auf PSP-Toxine untersucht. In den zwischen April und Mai 2017 genommenen Proben konnten erneut keine PSP-Toxine nachgewiesen werden. Die von Vershinin et al. (2006) detektieren Gonyautoxine 2, 3 und 5 wurden in Muscheln gefunden, welche zwischen den Jahren 2000 und 2004 in russischen Gewässern gefangen wurden.

Von dieser Datenlage ausgehend konnten, wenn überhaupt, nur äußerst geringe Mengen von PSP-Toxinen in den zwischen Mai und Juni 2019 genommenen Planktonproben erwartet werden. PSP-Toxine werden in marinen Gewässern hauptsächlich von verschiedenen *Alexandrium*-Arten, *Gymnodinium catenatum* und *Pyrodinium bahamense* produziert (Deeds et al., 2008). Die taxonomische Auswertung der Planktonproben, durchgeführt von Mitarbeitern des *Institute of Oceanology - Bulgarian Academy of Sciences*, wird zeigen, ob und in welcher Anzahl diese Arten zum Zeitpunkt der Probennahme auftraten.

3.1.2 Lipophile Toxine inklusive Domoinsäure

Die Extrakte aus den fraktionierten Netzzug-Proben wurden mittels Flüssigkeitschromatographie aufgetrennt und mit Tandem-Massenspektrometrie unter Verwendung der gegebenen SRM-Methoden gemessen. Dabei wurde jede Probe zwei mal injiziert: Die erste Messung zielte auf eine Reihe lipophiler Toxine und die zweite Messung auf die hydrophile Domoinsäure ab. Die Identifikation der Toxine erfolgte über die spezifischen Übergänge sowie den Vergleich der Retentionszeit mit den gemessenen Standards, welche auch zur Quantifizierung verwendet wurden. Tabelle 7 gibt die Nachweisgrenzen an, welche mit den einzeln gemessenen Standards berechnet wurden. Die hohen Nachweisgrenzen von DTX-1, DTX-2 und OA beruhen auf Problemen des Massenspektrometers, welche spontan nicht behoben werden konnten.

Tabelle 7. Nachweisgrenzen für lipophile Toxine und Domoinsäure. Die Nachweisgrenzen pro Netzzug variieren je nach Volumen des Netzzuges.

Toxin	NWG [pg/ μ l]	NWG _{minimal} [ng/NT]	NWG _{maximal} [ng/NT]
AZA-1	0,118	0,105	0,206
DA	1,620	1,440	2,834
DTX-1	37,632	33,450	65,856
DTX-2	21,419	19,040	37,484
GD-A	1,862	1,655	3,259
GYM-A	0,118	0,105	0,206
OA	84,794	75,372	148,389
PTX-2	0,392	0,348	0,686
SPX-1	0,051	0,045	0,089
YTX	0,032	0,028	0,055

Identifizierung der gefundenen Toxine

In den Proben des Planktonnetzes konnten Pectenotoxin 2, Yessotoxin sowie zwei Pectenotoxine mit dem Übergang 892→213 und einer Retentionszeit von 2,81 min bzw. 3,00 min detektiert werden. Während PTX-2 und YTX über die identische Retentionszeit mit den Standards identifiziert wurden, gestaltete sich die Identifikation der unbekanntenen Pectenotoxine als schwieriger. Der in der vorhandenen SRM-Methode festgelegte Übergang 892→213 beschreibt die Pectenotoxine 1, 11 und 13, jedoch ist kein Qualifizierungsübergang zur Unterscheidung der drei Toxine festgelegt. Daher musste die Identifikation über Produktionen-Spektren erfolgen. Abbildung 9 zeigt die strukturellen Unterschiede der drei Toxine. R¹ stellt bei PTX-1 eine CH₂OH-Einheit dar, während PTX-11 und PTX-13 an dieser Stelle eine CH₃-Einheit tragen. R² und R³ stellen bei PTX-1 jeweils Wasserstoffatome dar, während sie bei PTX-11 und PTX-13 ein Wasserstoffatom und eine Hydroxylgruppe darstellen. Aufgrund des durch den eingezeichneten Bindungsbruch entstehenden Fragments von 567 m/z für PTX-1 (in fettgedruckten Buchstaben) bzw. 551 m/z für PTX-11/-13 (in kursivgedruckten Buchstaben) und dessen Wasserabspaltungen sollte sich PTX-1 klar von den anderen beiden Substanzen unterscheiden lassen. PTX-11 und PTX-13 ließen sich jedoch nur durch einen Bindungsbruch unterscheiden, welcher nur einen der beiden Reste R² und R³ einschließt. Ein solcher Bindungsbruch tritt laut Literatur jedoch nicht in abundanter Form auf (vgl. Fragmentierungsschemata von Pectenotoxinen, z.B. in Krock et al. (2008) oder Gerssen et al. (2008)). Eine genaue Differenzierung der Substanzen ist also mittels Massenspektrometrie nicht möglich und müsste über Kernspinresonanzspektroskopie (engl. *nuclear magnetic resonance*

spectroscopy, NMR-Spektroskopie) erfolgen.

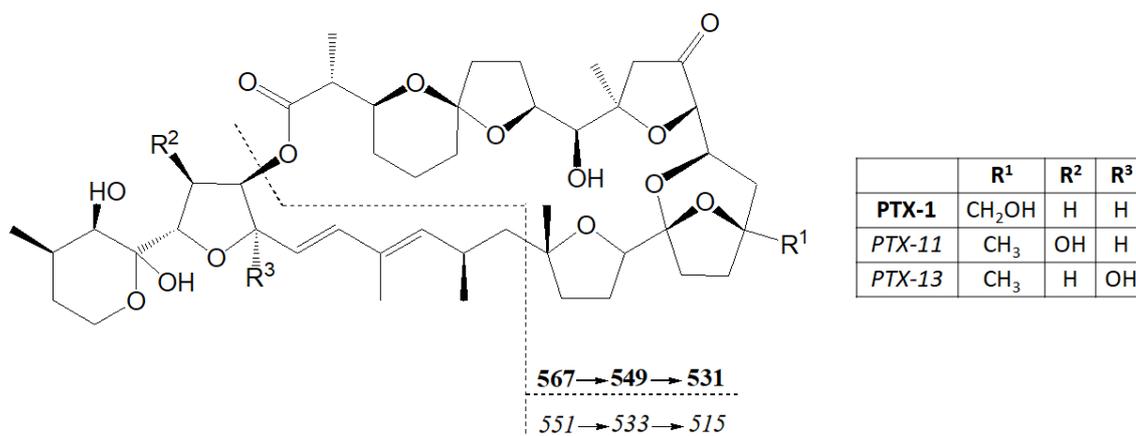


Abbildung 9. Struktur von PTX-1, -11, -13. Durch den markierten Bindungsbruch lässt sich PTX-1 (fettgedruckte Buchstaben) von PTX-11/-13 (kursivgedruckte Buchstaben) unterscheiden. Eine Differenzierung zwischen PTX-11 und PTX-13 ist wegen der räumlichen Nähe von R² und R³ und dem Fehlen eines entsprechenden Bindungsbruchs per Massenspektrometrie nicht möglich.

Abbildung 10 zeigt das Chromatogramm des SRM-Übergangs 892→213 mit zwei detektierten Substanzen bei 2,81 min und 3,00 min sowie deren Produktions-Spektren. Die Substanz bei 2,81 min zeigt neben typischen Fragmenten für Pectenotoxine, wie beispielsweise 213 Da und vielen Wasserabspaltungen, die Fragmente mit einer Masse von 567 Da, 549 Da und 531 Da, womit es sich um PTX-1 handeln muss. Im etwas verrauschten Produktions-Spektrum der Substanz bei 3,00 min lassen sich neben den bekannten PTX-Peaks Fragmente mit der Größe 551 Da, 533 Da und 515 Da nachweisen, weshalb es sich bei diesem Molekül um PTX-11 oder PTX-13 handeln muss. Eine genaue Differenzierung dieser beiden Moleküle ist, wie vorher beschrieben, anhand der Massenspektren nicht möglich.

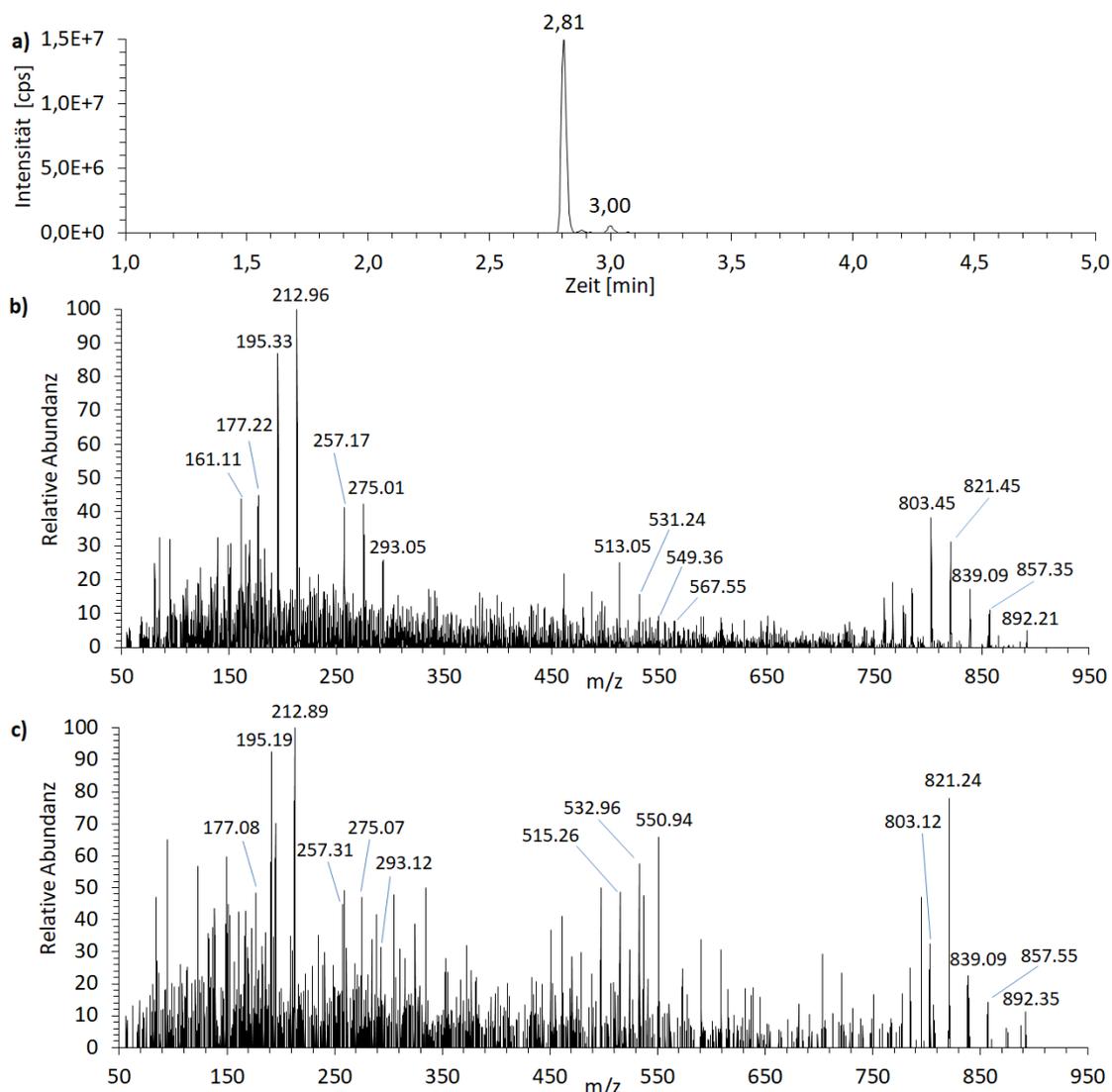


Abbildung 10. (a) Chromatogramm des SRM-Übergangs 892→213 (b) Produktionenspektrum des Peaks bei 2,81 min. Durch das Fragment mit einer Masse von 567 Da und dessen Wasserabspaltungen kann die Substanz als PTX-1 identifiziert werden. (c) Produktionenspektrum des Peaks bei 3,00 min. Durch das Fragment mit einer Masse von 551 Da und dessen Wasserabspaltungen kann die Substanz als PTX-11/-13 identifiziert werden.

Quantifizierung der Toxine und Auswertung der Daten

Nachdem die Substanzen identifiziert worden sind, wurden die Toxingehalte in den fraktionierten Proben der einzelnen Netzzüge berechnet. Da für PTX-1 und PTX-11/-13 kein Standard zur Verfügung stand, wurde die Quantifizierung in diesen Fällen mithilfe des PTX-2-Standards durchgeführt, sodass die berechneten Werte stets in PTX-2-Äquivalenten angegeben wurden. Um die folgenden Beschreibungen besser nachvollziehen zu können, zeigt Abbildung 11 explizit die Stationen, an denen

das Planktonnetz zur Probennahme ins Wasser gelassen wurde. Die Rohdaten der Auswertung sind im Anhang (Anlage 1, Tabelle 18) hinterlegt.

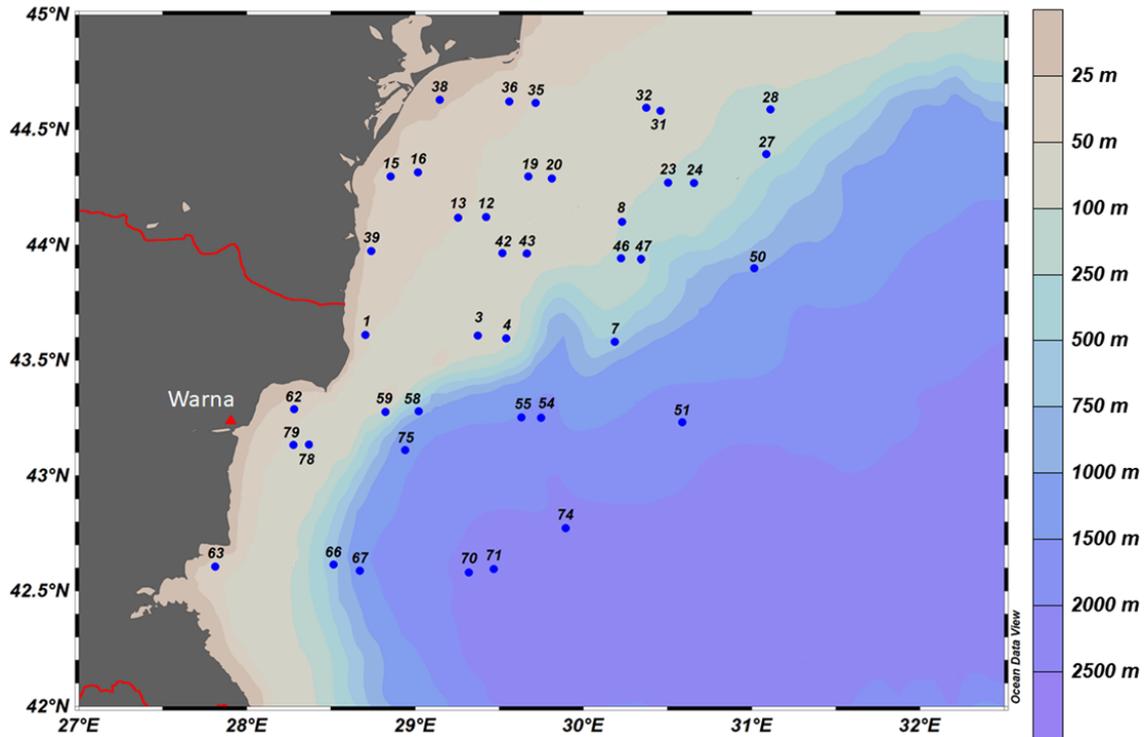


Abbildung 11. Stationen, an denen mithilfe eines 20 μm -Planktonnetzes Proben gesammelt wurden. Diese wurden anschließend durch Filtration in eine $>200 \mu\text{m}$ -, eine 50-200 μm - und eine 20-50 μm -Fraktion separiert.

In Abbildung 12 sind die Toxingehalte der $>200 \mu\text{m}$ -Fraktionen der einzelnen Stationen dargestellt. Da die gemessenen YTX-Werte die verschiedenen PTX-Werte deutlich überstiegen, wurde zur besseren Darstellung sowohl eine YTX-Y-Achse als auch eine PTX-Y-Achse erstellt. Dabei entspricht die YTX-Y-Achse dem 6-fachen der PTX-Y-Achse. Neben einem Ausreißer an Station 78 mit etwa 12 700 /NT lag YTX mit einem Maximalgehalt von 1166 ng/NT an Station 79 vor, während PTX-2 mit maximal 189 ng/NT und PTX-1 mit maximal 49 ng/NT, beides an Station 78, vorkamen. Außerdem konnte nur an dieser Station PTX-11/-13 mit einem Gehalt von 4 ng/NT nachgewiesen werden. Der Stationsplan (Abbildung 11) zeigt, dass die Stationen 78 und 79 in der Nähe des Festlandes in der Bucht von Warna liegen. Auch andere Stationen, an denen hohe Toxingehalte detektiert werden konnten, liegen relativ nahe zur Küste (Stationen 1, 13, 35, 36). Des Weiteren ist zu erkennen, dass an den Stationen 43-75 nahezu keine Toxine auftraten.

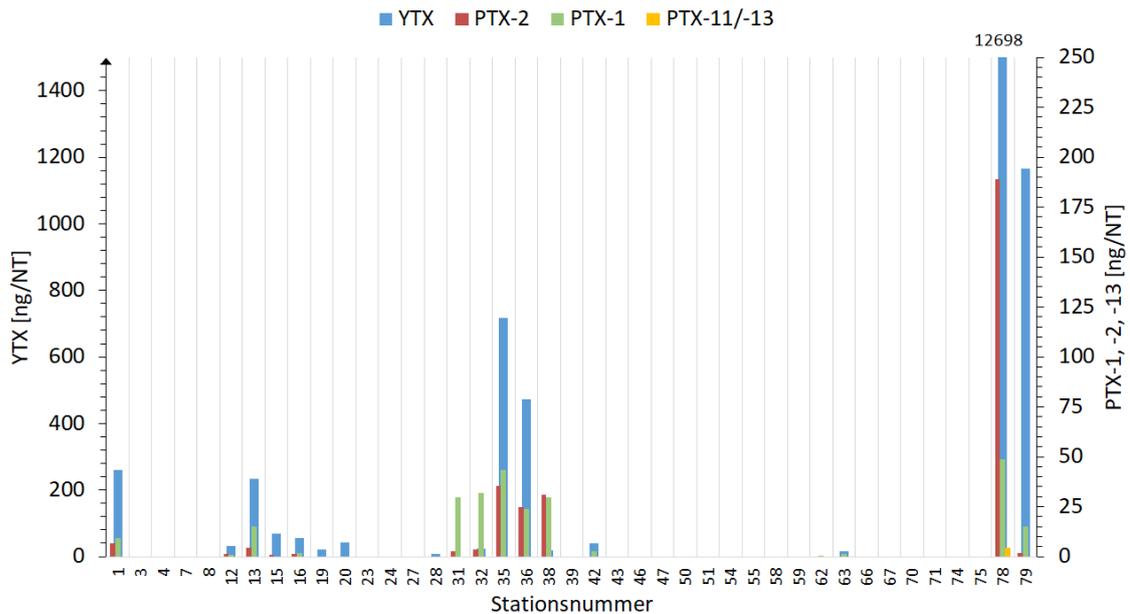


Abbildung 12. Toxingehalte der $>200\ \mu\text{m}$ -Fraktionen aus den Netzzugproben, aufgetragen über den jeweiligen Stationen. Die YTX-Y-Achse entspricht dem 6-fachen der PTX-Y-Achse. Der YTX-Gehalt an Station 78 war mit ca. $12\,700\ \text{ng/NT}$ deutlich höher als der Gehalt anderer Stationen. Das Maximum der YTX-Achse wurde zur besseren Darstellung der anderen Werte auf $1500\ \text{ng/NT}$ festgelegt.

Die Toxingehalte der $50\text{-}200\ \mu\text{m}$ -Fraktionen der jeweiligen Stationen sind in Abbildung 13 dargestellt. Erneut überstiegen die Yessotoxin-Gehalte die der Pectenotoxine deutlich, sodass die YTX-Y-Achse dem 14-fachen der PTX-Y-Achse entspricht. Das $50\text{-}200\ \mu\text{m}$ -Diagramm zeigt eine deutlich komplexere Toxinverteilung als das Diagramm der $>200\ \mu\text{m}$ -Fraktion. So wurden beispielsweise an den Stationen 59-63 hohe Werte gemessen, wobei an diesen Stationen in der $>200\ \mu\text{m}$ -Fraktion nahezu keine Toxine vorhanden waren. An Station 63 konnte sogar der maximale YTX-Gehalt von $6859\ \text{ng/NT}$ detektiert werden, welcher jedoch in etwa nur halb so hoch war wie der Ausreißer in der $200\ \mu\text{m}$ -Fraktion. Vernachlässigt man diesen jedoch, sind die Gehalte in den $50\text{-}200\ \mu\text{m}$ -Fraktionen deutlich höher: Sie überstiegen mehrmals einen Wert von $2500\ \text{ng/NT}$, was vorher nur auf den besagten Ausreißer zutraf. Ebenfalls konnte mit einem maximalen PTX-2-Wert von $426\ \text{ng/NT}$, einem maximalen PTX-1-Wert von $336\ \text{ng/NT}$ und einem maximalen PTX-11/-13-Wert von $14\ \text{ng/NT}$ (alles an Station 42) ein Anstieg der Pectenotoxine festgestellt werden. Auch die Anzahl der Stationen, an denen Toxine gemessen wurden, stieg gegenüber der größeren Fraktionen deutlich. So konnte beispielsweise PTX-11/-13 an 14 Stationen detektiert werden, während es in der $>200\ \mu\text{m}$ -Fraktion lediglich an einer Station auftrat. An den Stationen 3-8, 51-55 und 70-75 konnten jedoch auch in der $50\text{-}200\ \mu\text{m}$ -Fraktion wenige bis keine Toxine detektiert werden. Diese Stationen

liegen alle in relativ weiter Entfernung zur Küste.

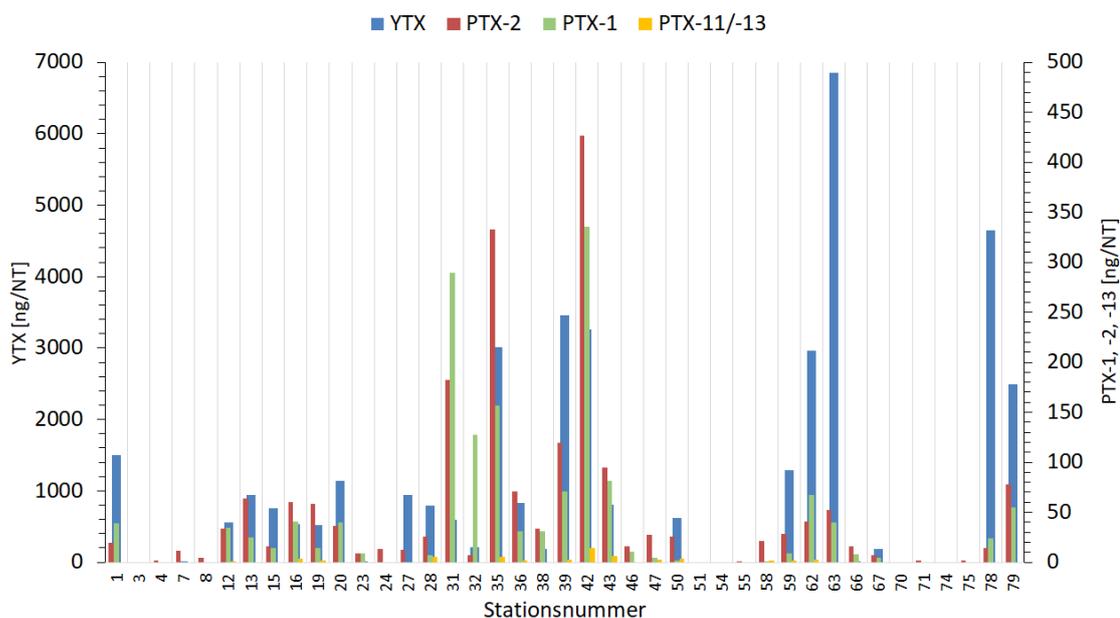


Abbildung 13. Toxingehalte der 50-200 µm-Fractionen aus den Netzzugproben, aufgetragen über den jeweiligen Stationen. Die YTX-Y-Achse entspricht dem 14-fachen der PTX-Y-Achse.

Abbildung 14 zeigt die Toxingehalte der 20-50 µm-Fractionen der einzelnen Stationen. Hier überstiegen die Yessotoxin-Werte die Pectenotoxin-Werte am deutlichsten, sodass die YTX-Y-Achse dem 72-fachen der PTX-Y-Achse entspricht. Die Yessotoxin-Gehalte sind in diesen Fraktionen deutlich am höchsten, mit einem Maximalwert von 17 145 ng/NT an Station 78 und einem mehrfach auftretenden Wert von >2500 ng/NT. Die PTX-Gehalte haben sich im Vergleich zur 50-200 µm generell verringert. Der maximale PTX-2-Gehalt lag bei 206 ng/NT an Station 47 und der maximale PTX-1-Gehalt bei 37 ng/NT an Station 79. Lediglich der maximale PTX-11/-13-Gehalt ist mit einem Wert von etwa 15 ng/NT an Station 28 annähernd gleich geblieben. Insgesamt traten die PTX-11/-13-Gehalte hinsichtlich Intensität und Häufigkeit ähnlich zur 50-200 µm-Fraktion auf. Dies ist jedoch nicht bei PTX-1 der Fall: Während in der 50-200 µm-Fraktion PTX-1 und PTX-2 noch annähernd zu gleichen Teilen innerhalb der Stationen auftraten, hat sich dieses Verhältnis deutlich in Richtung von PTX-2 verschoben. PTX-2 konnte dabei auch an Stationen gemessen werden, an denen zuvor keine Toxine nachgewiesen werden konnten (z.B. Station 4, 51, 54, 71).

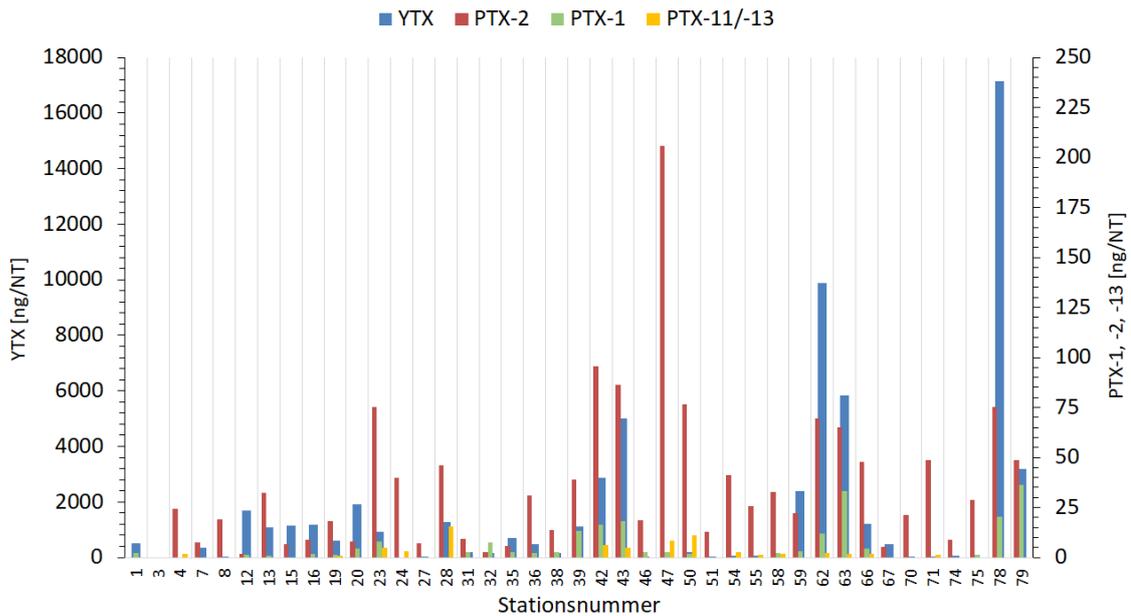


Abbildung 14. Toxingehalte der 20-50 μm -Fraktionen aus den Netzzugproben, aufgetragen über den jeweiligen Stationen. Die YTX-Y-Achse entspricht dem 72-fachen der PTX-Y-Achse.

Beim Vergleich der aufsummierten Toxingehalte aller Stationen (Tabelle 8) wird noch einmal verdeutlicht, dass YTX mit einem deutlich höheren Wert vorlag als PTX-2 und PTX-1, welche wiederum einen deutlich höheren Wert aufwiesen als PTX-11/-13. Außerdem wird ein Vergleich der Toxingehalte nach Fraktionen möglich: Je kleiner die Fraktionsgröße, desto höher der Gesamttoxingehalt.

Tabelle 8. Aufsummierte Toxingehalte aller beprobten Stationen, unterteilt nach Fraktionen und Toxinen.

	YTX [ng/NT]	PTX-2 [ng/NT]	PTX-1 [ng/NT] (PTX-2- Äquivalente)	PTX-11/-13 [ng/NT] (PTX-2- Äquivalente)	Σ_{Fraktion} [ng/NT]
>200 μm	15870	302	254	4	16430
50-200 μm	39143	1966	1573	54	42736
20-50 μm	61949	1433	206	70	63658
Σ_{Toxin} [ng/NT]	116962	3701	2033	128	122824

In den letzten Jahren konnten Yessotoxin, Pectenotoxin 2 und Domoinsäure in bulgarischen Gewässern des Schwarzen Meeres bereits mehrmals nachgewiesen werden, wobei Yessotoxin lediglich in Muschelproben detektiert wurde (Peteva et al., 2018b,a,d). Die Detektionen von YTX und PTX-2 in bulgarischen und rumänischen Gewässern erfüllen dementsprechend die Erwartungen. Lediglich die von der Diato-

mee *Pseudo-nitzschia* produzierte Domoinsäure konnte in diesem Jahr nicht detektiert werden. Trotz des für gewöhnlich großen Verbreitungsgebiets dieser Kieselalge ist es möglich, dass sie zum Zeitpunkt der Probennahme nicht in hoher Abundanz auftrat. Dieser Fall könnte beispielsweise durch besondere Wetterbedingungen wie Wind oder zu wenig Sonnenlicht auftreten. Die taxonomische Auswertung der bulgarischen Kollegen wird zeigen, ob und in welcher Anzahl diese Gattung vorhanden war. Des Weiteren konnten im russischen Schwarzen Meer an Muschelproben aus dem Jahr 2002 Okadasäure, PTX-2, PTX-2sa (secoacid), PTX-1/-11, PTX-1sa/-11sa, YTX, carboxy-YTX und 45-hydroxy-YTX nachgewiesen werden (Morton et al., 2007). Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass PTX-1 und PTX-11/-13 auch in bulgarischen Gewässern detektiert werden konnten, weshalb auf eine Verbreitung über das gesamte Schwarze Meer zu schließen ist. Die entsprechenden Secoacide konnten nicht detektiert werden, da es sich dabei um Metabolite verschiedener Muschelarten handelt und diese daher in Planktonproben nicht vorkommen (EFSA, 2009a).

Um die Toxinverteilungen der unterschiedlichen Fraktionen beurteilen zu können, sind die produzierenden Organismen von entscheidender Bedeutung. Pectenotoxine konnten bisher in 10 Arten der Gattung *Dinophysis* und zwei Arten der Gattung *Phalacroma* nachgewiesen werden, wobei es sich bei den Vertretern der Gattung *Phalacroma* möglicherweise lediglich um Transportvektoren handelt, welche sich von *Dinophysis* ernähren (Reguera et al., 2014). Von den laut Reguera et al. (2014) 10 toxischen *Dinophysis*-Arten konnten an der Westküste des Schwarzen Meeres *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata* und *D. sacculus* nachgewiesen werden (Morton et al., 2009). Die Zelllängen dieser Arten liegen etwa zwischen 40 µm (*D. sacculus*) und 90 µm (*D. caudata*), gemessen nach den von Reguera et al. (2014) veröffentlichten Mikroskopieaufnahmen. Die größte mit einem DSP-Event verbundene *Dinophysis*-Art ist *D. miles* mit einer Zelllänge von mehr als 150 µm (Reguera et al., 2014), welche jedoch nicht im Schwarzen Meer verbreitet ist (Morton et al., 2009).

Die Produktion von Yessotoxin wird den Dinoflagellaten *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* und *Gonyaulax spinifera* zugesprochen (Paz et al., 2008), welche allesamt bereits im Schwarzen Meer gefunden wurden (Gómez & Boicenco, 2004). Dabei ist *P. reticulatum* mit einer Länge von 28-43 µm und einer Breite von 25-35 µm der kleinste Vertreter der YTX-Produzenten, gefolgt von *G. spinifera* (L: 24-50 µm, B: 30-40 µm) und *L. polyedrum* (L: 40-54 µm, B: 37-53 µm) (Paz et al., 2008). Die im Vergleich zu den PTX-Werten außergewöhnlich hohen YTX-Werte deuten auf eine Blüte der drei genannten Arten hin.

Bei Betrachtung der PTX- und YTX-produzierenden Dinoflagellaten ist zu erkennen, dass keine der Arten größer als 200 µm ist. Dennoch wurden in der >200 µm-

Fraktion erhebliche Toxinkonzentrationen nachgewiesen. Dies lässt sich durch Transportvektoren erklären, d.h. dass heterotrophe Organismen der nächsthöheren Trophiestufe sich von jenen toxinproduzierenden Dinoflagellaten ernähren und damit die Toxine aufnehmen. Auf der Suche nach den Produzenten der Azaspirosäure beschreiben Krock et al. (2009) beispielsweise das Auftreten des Wimpertierchens *Favella Ehrenbergii*, welches zusammen mit einem hohen AZA-1-Gehalt in der 50-200 µm-Fraktion vorkam. Durch nachfolgende Experimente und Versuche stellte sich jedoch heraus, dass *F. Ehrenbergii* sich von den eigentlichen AZA-Produzenten ernährte und dementsprechend als Transportvektor diente.

Bei der weiteren Analyse der Toxindaten fällt auf, dass PTX-2 und PTX-1 in der 50-200 µm-Fraktion annähernd im Verhältnis 1:1 auftraten, während der PTX-2-Anteil in der 20-50 µm-Fraktion deutlich dominierte. Diese Tatsache könnte mit dem Auftreten zwei verschiedener PTX-Produzenten erklärt werden: Während Vertreter der kleineren Arten, beispielsweise *D. sacculus* oder *D. acuminata*, sowohl in der 50-200 µm- als auch in der 20-50 µm-Fraktion auftreten würden, träten Vertreter der größeren Arten, beispielsweise *D. akuta* oder *D. caudata*, größtenteils in der 50-200 µm-Fraktion auf. Durch die Produktion von PTX-2 durch eine der kleineren Arten und die Produktion von PTX-1 durch eine der größeren Arten ließe sich die entsprechende Verteilung erklären. Die taxonomische Auswertung der Planktonproben wird zeigen, ob und in welcher Anzahl jene Arten in den Proben vorhanden waren.

Zur Verteilung der Toxinvorkommen bezüglich der einzelnen Stationen lässt sich klar festhalten, dass an küstennahen Standorten deutlich höhere Werte detektiert wurden. Dabei sind vor allem die Stationen 78 und 79 hervorzuheben, an denen bei allen drei Fraktionen überdurchschnittlich hohe YTX-Gehalte vorlagen. In den >200 µm- und 20-50 µm-Fractionen liegen an diesen Stationen sogar maximale Gehalte vor. An solchen küstennahen Gebieten wird Algenwachstum besonders durch Inlandseinflüsse wie beispielsweise erhöhten Nährstoffeintrag begünstigt (Meyer-Reil & Köster, 2000). Hohe Pectenotoxin-Gehalte konnten in den kleineren Fraktionen beispielsweise an den Stationen 35, 42 und 47 detektiert werden. Die Entfernung zur Küste ist bei diesen im Vergleich zu den vorher genannten Stationen jedoch relativ groß. Jedoch liegt an diesen Stationen eine geringe Tiefe von maximal etwa 250 m vor (vgl. Abbildung 11), sodass die großen Nährstoffeinträge bezogen auf ein relativ niedriges Wasservolumen immer noch hohe Einflüsse haben können.

3.1.3 Azaspirosäuren

Die Extrakte der AZA-Filter wurden mittels Flüssigkeitschromatographie aufgetrennt und mit Tandem-Massenspektrometrie unter Verwendung der gegebenen SRM-Methode gemessen (vgl. Abschnitt 2.4.3). Die Identifikation erfolgte über die spezifischen Übergänge sowie den Vergleich der Retentionszeit mit dem gemessenen AZA-1-Standard, welcher auch zur Quantifizierung verwendet wurde. In keiner der 79 AZA-Proben konnten Azaspirosäuren nachgewiesen werden. Die mittels des AZA-1 Standards nach Formel 1 berechnete Nachweisgrenze liegt bei 0,608 pg/µl, was nach Formel 4 in etwa 46 bis 247 pg/l Meerwasser entspricht, je nach Volumen des filtrierten Wassers.

Bisher wurden Azaspirosäuren in bulgarischen Gewässern lediglich innerhalb der normalen Untersuchungen zu lipophilen Toxinen untersucht, sowohl in Muschelfleisch als auch in Planktonproben, die mittels Planktonnetz genommen wurden. Dabei konnten jedoch keine Azaspirosäuren detektiert werden (Peteva et al., 2018c,d). Durch die geringe Größe der AZA-produzierenden Arten der *Amphidomataceae* wie beispielsweise *Azadinium spinosum* (Tillmann et al., 2009), *Azadinium poporum* (Tillmann et al., 2011) und *Amphidoma languida* (Tillmann et al., 2012a) ist eine Probennahme mittels normalen Planktonnetzes mit einer Maschenweite von 20 µm jedoch nicht sinnvoll. Daher wurde in diesem Versuch mit dem Wasser des CTD-Wasserschöpfers gearbeitet. Dieses wurde aus drei verschiedenen Tiefen vereinigt und schließlich über einen 3 µm Membran-Polycarbonat-Filter filtriert. Mit dieser Methode wurden die gesuchten AZA-produzierenden Zellen auf dem Filter akkumuliert, wodurch die Sensitivität gegenüber eines normalen Netzzugs deutlich gesteigert werden konnte. Dennoch konnten keine Azaspirosäuren nachgewiesen werden. Dies kann verschiedene Gründe haben: Entweder waren zur Zeit der Untersuchung nur wenige bis keine Vertreter der *Amphidomataceae* im Schwarzen Meer vorhanden, oder aber es waren nur solche Vertreter, welche entweder generell (z.B. *Azadinium polongum* (Tillmann et al., 2012b)) oder aufgrund ihres Ribotyps keine Azaspirazide produzieren (z.B. ein Ribotyp von *Az. spinosum* aus Argentinien (Tillmann et al., 2019)).

Laut Tillmann et al. (2014) gibt es zwar einen Eintrag in der *Black Sea Phytoplankton Check List*, welcher das Auftreten von *Az. spinosum* im Schwarzen Meer bestätigt, allerdings ist die angegebene Seite aus unbekanntem Gründen nicht mehr erreichbar (http://phyto.bss.ibss.org.ua/wiki/Azadinium_spinosum). Die von Gómez & Boicenco (2004) vorgelegte Phytoplankton-Checkliste wurde vor der Entdeckung der Azaspirosäuren-produzierenden Dinoflagellaten veröffentlicht. Weitere Quellen, wie beispielsweise der 2019 erschienene *Black Sea - State of the Environment Re-*

port 2009-2014/5 (BSC, 2019), bestätigen zwar das Vorhandensein anderer toxischer Dinoflagellaten wie beispielsweise Vertreter der Gattung *Gymnodinium*, jedoch werden *Azadinium*- und *Amphidoma*-Arten nicht gelistet. Die Verbreitung jener Arten im Schwarzen Meer ist dennoch durchaus möglich, da im geografisch angrenzenden östlichen Mittelmeer bereits AZA-produzierende *Amphidomataceae* nachgewiesen werden konnten (Luo et al., 2018). Auch wenn über den Bosphorus deutlich mehr leichtes, salzarmes Oberflächenwasser aus dem Schwarzen Meer hinaus fließt (ca. 600 km³/Jahr), fließt dennoch eine erhebliche Menge schweres, salzreiches Wasser von dem Mittelmeer in das Schwarze Meer (ca. 300 km³/Jahr) (Özsoy & Ünlüata, 1997). Über diese Wassermassen könnten die im Atlantik und Mittelmeer vorkommenden *Amphidomataceae* schließlich in das isolierte Schwarze Meer vorgedrungen sein. Die taxonomische Auswertung der Planktonproben wird zeigen, ob und in welcher Anzahl diese Arten zum Zeitpunkt der Probennahme auftraten. Außerdem hätten die DNA-Filter, welche während der Ausfahrt vorbereitet wurden (vgl. Abschnitt 2.1.1), weiter bearbeitet und mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) auf das Vorhandensein verschiedener *Amphidomataceae*-DNA getestet werden können. Dies wurde aufgrund fehlender Zeit und den negativen Ergebnissen der AZA-Messungen jedoch nicht durchgeführt.

3.2 Amphidinol-Methodenentwicklung

Die Arbeit hatte das Ziel, eine LC-MS/MS-basierte Methode zur Detektion, Identifizierung und Quantifizierung von Amphidinolen zu entwickeln. Der für Anwendungen dieser Art bevorzugte Scanmodus ist der „Selected Reaction Monitoring“-Modus (SRM-Modus). Des Weiteren sollte eine Methode entwickelt werden, welche auf den Grundlagen der SRM-Methode basiert und die Detektion bisher unbekannter Amphidinole ermöglicht. Die dafür bevorzugten Scanmodi sind, je nach gegebenen Umständen, der Vorläuferionen-Scan („Precursorion“-Scan, Prec-Scan) oder der Neutralverlust-Scan („Neutralloss“-Scan, NL-Scan). Potentielle auf diese Weise neu entdeckte Amphidinole könnten anschließend über ihre Produktionen-Spektren charakterisiert und als Amphidinole bestätigt werden, worauf sie ebenfalls in die SRM-Methode einbezogen und quantifiziert werden könnten.

Die Methodenentwicklung lässt sich grob in zwei separate Abschnitte unterteilen. Der erste Abschnitt hatte das Ziel, durch Literaturrecherche Informationen über das grundlegende Verhalten von Amphidinolen zu erlangen. Dazu zählte vor allem die Untersuchung von Aufbau, Ionisierung und Fragmentierung der einzelnen Amphidinole. Die anhand der Literaturinformationen aufgestellten Hypothesen wurden

durch anschließende Experimente mit dem vorliegenden Luteophanol-D-Standard und den später in den Algenproben entdeckten Toxinen verifiziert. Währenddessen bestand der zweite Teil der Methodenentwicklung in der Optimierung der messtechnischen Parameter, also den Einstellungen, mit denen das Chromatographie- und Massenspektrometersystem betrieben wurden. So handelt es sich beispielsweise bei Eluentenzusammensetzung, Gradient und Kollisionsenergie um Parameter von größter Wichtigkeit, welche über den Erfolg oder Misserfolg der Messungen entscheiden können.

Die erlangten Informationen über das grundlegende Verhalten der Amphidinole wurden schließlich mit den optimierten messtechnischen Parametern kombiniert, um eine funktionierende SRM- und anschließende Prec-/NL-Methode zu entwickeln.

3.2.1 Adduktbildung von Amphidinolen

Die Adduktbildung ist Teil der Ionisierung und tritt häufig bei der Elektrospray-Ionisierung (ESI) auf (Kruve et al., 2013). Je nach Molekülstruktur, Eluent und ESI-Parameter werden verschiedene Ionen und Addukte in unterschiedlichem Ausmaß gebildet, wobei im positiven Ionisierungsmodus Natrium, Kalium und Ammoniumaddukte am häufigsten beobachtet werden (Cech & Enke, 2001). Ausgehend davon kann sich die Sensitivität, mit der ein Analyt gemessen wird, je nach auftretender Addukte stark unterscheiden. Um eine möglichst hohe Sensitivität erreichen zu können, wurde daher die Adduktbildung von Amphidinolen unter den gegebenen Bedingungen und Einstellungen untersucht.

In der Literatur wurden von verschiedenen Autoren mehrere Addukte von Amphidinolen gefunden und gemessen. So wurden beispielsweise zur Identifizierung von Amphidinol A das Natriumaddukt (+Na) (Cutignano et al., 2017), von Amphidinol 20 das Wasserstoffaddukt (+H) (Satake et al., 2017) und von Amphidinol 22 das Ammoniumaddukt (+NH₄) (Martínez et al., 2019) gemessen. Eine Aussage, warum jeweils die entsprechenden Addukte vermessen wurden, wurde in diesen Fällen nicht getätigt. Für eine alle Amphidinole einschließende Messmethode ist es jedoch wichtig, sich auf eine Adduktform zu fokussieren. Dies sollte vorzugsweise jene Adduktform sein, welche in höchster Abundanz auftritt und damit eine hohe Sensitivität ermöglicht.

Zur Untersuchung der Adduktbildung von Amphidinolen wurde der vorliegende Luteophanol D Standard im „Selected Ion Recording“-Modus (SIR) gemessen. Es wurde nach den H-, NH₄-, Na- und K-Addukten gescannt und die Intensitäten miteinander verglichen, sodass Aussagen über die Häufigkeit der auftretenden Addukte möglich waren. Die folgende Abbildung 15 zeigt, dass das Natriumaddukt deutlich

am häufigsten gebildet wurde. Das Vorhandensein der Natriumionen, welche zur Natriumadduktbildung benötigt werden, lässt sich mit der Verwendung von Messzylindern und Schottflaschen aus Glas erklären. Aus diesen lösen sich in der Regel Natriumionen, sodass eine Konzentration in der Größenordnung von 10^{-6} M in den Lösungen vorliegen kann. Außerdem können niedrige Salzkonzentrationen selbst in Lösemitteln auftreten, die eine für die Analytik zertifizierte Reinheit besitzen (Cech & Enke, 2001). Darüber hinaus wurden die von Krock et al. (2018) gemessenen und strukturell eng mit den Amphidinolen verwandten Karlotoxine wegen fehlender Wasserstoffaddukte ebenfalls als Natriumaddukte qualifiziert und quantifiziert. Aufgrund der höchsten Abundanz des Natriumadduktes und der damit verbundenen maximal erreichbaren Sensitivität wurde dieses stets für nachfolgende Berechnungen, Untersuchungen und Messungen verwendet.

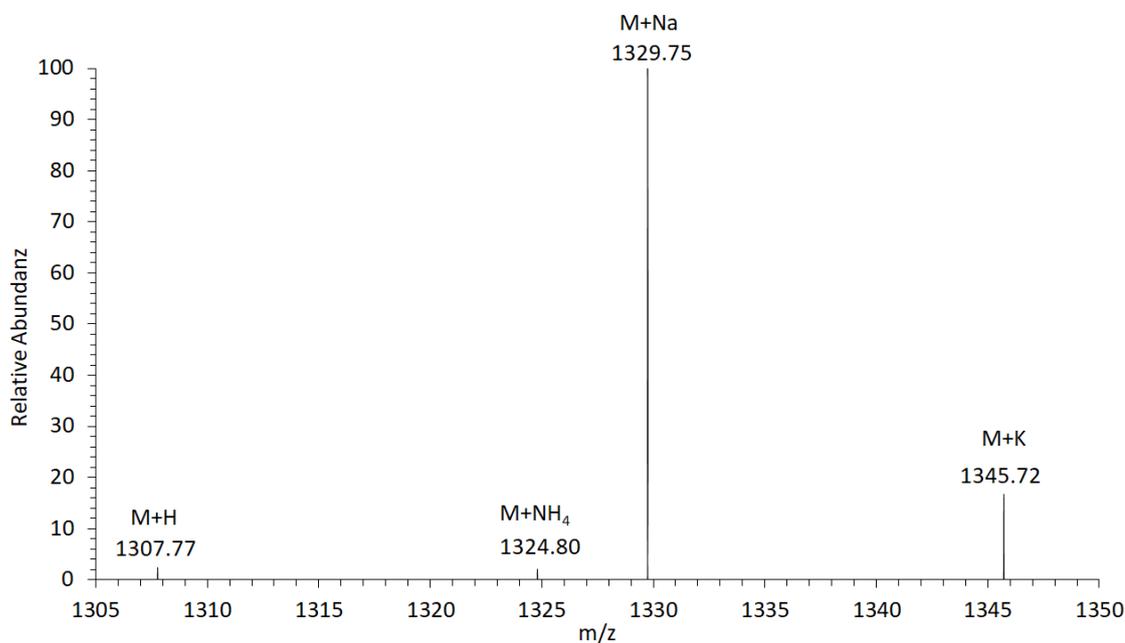


Abbildung 15. Adduktbildung von Luteophanol D. Das mit Abstand häufigste Addukt ist das Natriumaddukt, sodass dieses für nachfolgende Berechnungen, Untersuchungen und Messungen verwendet wurde.

3.2.2 Typische Fragmentierung von Amphidinolen

Für die massenspektrometrische Untersuchung von Molekülen sind Fragmentierungen und Fragmentierungsschemata von entscheidender Bedeutung. Mit ihnen lässt sich aufzeigen, in welche Fragmente das Molekülion nach dem Aufenthalt in der Kollisionszelle zerfällt. Jede Substanz zeigt für sich spezifische Fragmente, anhand dessen sie eindeutig identifiziert werden kann. Dabei zeigen ähnliche Substanzen,

die in übergeordneten Gruppen zusammengefasst werden, auch ähnliche Fragmente. Dementsprechend kann auch für eine Substanzgruppe wie die der Amphidinole ein Fragmentierungsschema erarbeitet werden. Die Gemeinsamkeiten innerhalb der Fragmentierungsschemata stellen schließlich eine Grundvoraussetzung für die spätere Entwicklung der SRM- und Prec-/NL-Methoden dar.

Zunächst wurden die verfügbaren Massenspektren und Fragmentierungsschemata aus der Literatur gesammelt und miteinander verglichen. Auf der Suche nach einem entscheidenden Merkmal, welches alle Spektren gemeinsam haben und somit die Gruppe der Amphidinole charakterisiert, wurde ein Bindungsbruch zwischen zwei Hydroxylgruppen nahe Tetrahydropyranring B entdeckt. Dieser Bruch wird in Abbildung 16 am Beispiel des Produktions-Spektrums von Amphidinol 21, aufgenommen von Satake et al. (2017), gezeigt.

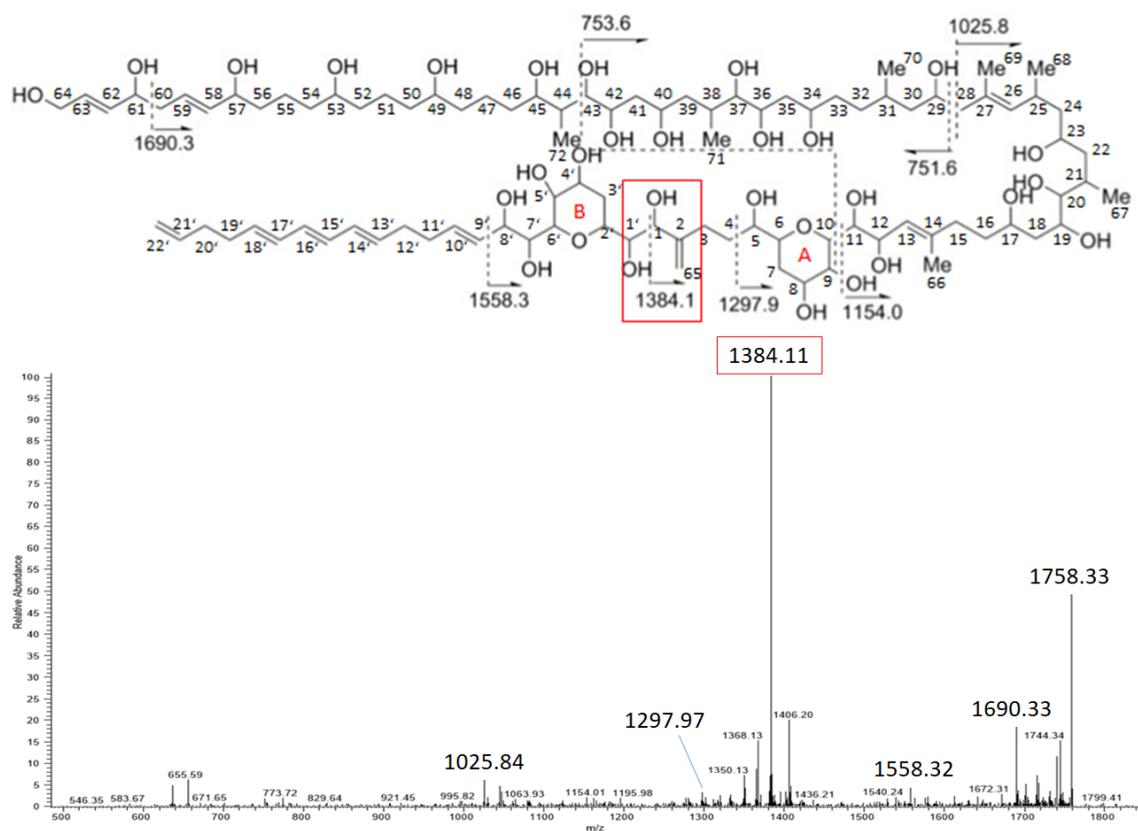


Abbildung 16. Produktions-Spektrum und entsprechendes Fragmentierungsschema von Amphidinol 21. Der bei allen Amphidinolen auftretende Bindungsbruch ist rot markiert. Ausgehend von diesem Bruch wurde eine neue Kohlenstoffnummerierung vorgeschlagen. Modifizierte Darstellung nach Satake et al. (2017).

Der Bruch tritt bei allen Amphidinolen, welche bisher in der Literatur durch ein Produktions-Spektrum beschrieben wurden, immer zwischen den gleichen Kohlenstoffatomen auf. Da die Kohlenstoffatome in der Literatur jedoch immer vom Ende

des hydrophilen Arms aufsteigend bis zum Ende des lipophilen Arms nummeriert werden und die Arme stets unterschiedlich lang sind, kann der gefundene Bindungsbruch nicht für alle Amphidinole einheitlich beschrieben werden. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Kohlenstoffnummerierung vorgeschlagen, welche die zwei Kohlenstoffatome beim Bindungsbruch als C-1' und C-1 bezeichnet (siehe Abbildung 16). Von diesen Atomen wird die Nummerierung jeweils zum Ende des lipophilen (C-1') bzw. hydrophilen Arms (C-1) fortgeführt. Am Beispiel von Amphidinol 21 stellt der Teil C-1' bis C-22' den lipophilen Arm und den ersten Tetrahydropyranring dar, während der Teil C-1 bis C-64 den zweiten Tetrahydropyranring, den Großteil der verbindenden C₆-Kette und den hydrophilen Arm beinhaltet. Der Grund für das hohe Auftreten dieses C-1'/C-1-Bindungsbruchs lässt sich nur mutmaßen. Tabelle 9 zeigt, dass die durchschnittliche Bindungsenergie zwischen Kohlenstoffatomen innerhalb der in Amphidinolen vorkommenden Atombindungen am geringsten ist. Dabei ist zu beachten, dass die in der Tabelle gezeigten Werte nicht die korrekten Bindungsenergien innerhalb eines Moleküls darstellen, da die vorkommenden Atombindungen zusätzlich von allen umliegenden Atomen beeinflusst werden. Trotzdem können die gegebenen Bindungsenergien als Anhaltspunkt dienen und zeigen, dass wahrscheinlich ein Bindungsbruch zwischen zwei Kohlenstoffatomen den abundan- testen Peak darstellt. Solche C–C-Bindungen kommen in Amphidinolen jedoch sehr häufig vor und der C-1'/C-1-Bindungsbruch müsste nicht zwangsweise den höchsten Peak generieren. Daher liegt es nahe, dass die benachbarten Atome und Bindungen den genannten Bindungsbruch begünstigen. Dazu gehören die gegenüberliegenden vicinalen Hydroxylgruppen an C-1' und C-1, der Tetrahydropyranring B (ab C-2') und die Doppelbindung zwischen C-2 und (im Fall von Amphidinol 21, Abbildung 16) C-65. Solch eine Doppelbindung zwischen Kohlenstoffatomen ist bei den Amphidinolen einzigartig und wird, gemeinsam mit den genannten Hydroxylgruppen und der Ringstruktur, wahrscheinlich für die hohe Abundanz des C-1'/C-1-Bruches verantwortlich sein.

Tabelle 9. Durchschnittliche Bindungsenergien der bei Amphidinolen vorkommenden Atombindungen. Angepasst nach Zumdahl (1999).

Vorkommende Atombindung	durchschnittliche Bindungsenergie [kJ mol ⁻¹]
C–C	347
C–H	413
C–O	358
C=C	614
O–H	467

Nachdem ein gemeinsames Merkmal aller Produktionen-Spektren der in der Literatur beschriebenen Amphidinole gefunden wurde, wurde der vorhandene Luteophanol-D-Standard ebenfalls im Produktionen-Scan gemessen. Von diesem Molekül sind in der Literatur keine Massenspektren vorhanden. Der C-1'/C-1-Bindungsbruch würde bei Luteophanol D ein Fragment mit einer Größe von 903,53 Da erzeugen, weshalb ein solches Fragment in hoher Abundanz erwartet wurde. Eine Messung mit hochauflösender Massenspektrometrie sollte zudem Aufschluss über die weiteren Fragmente geben. Abbildung 17 zeigt jene Messung und daran das Fragmentierungsschema von Luteophanol D.

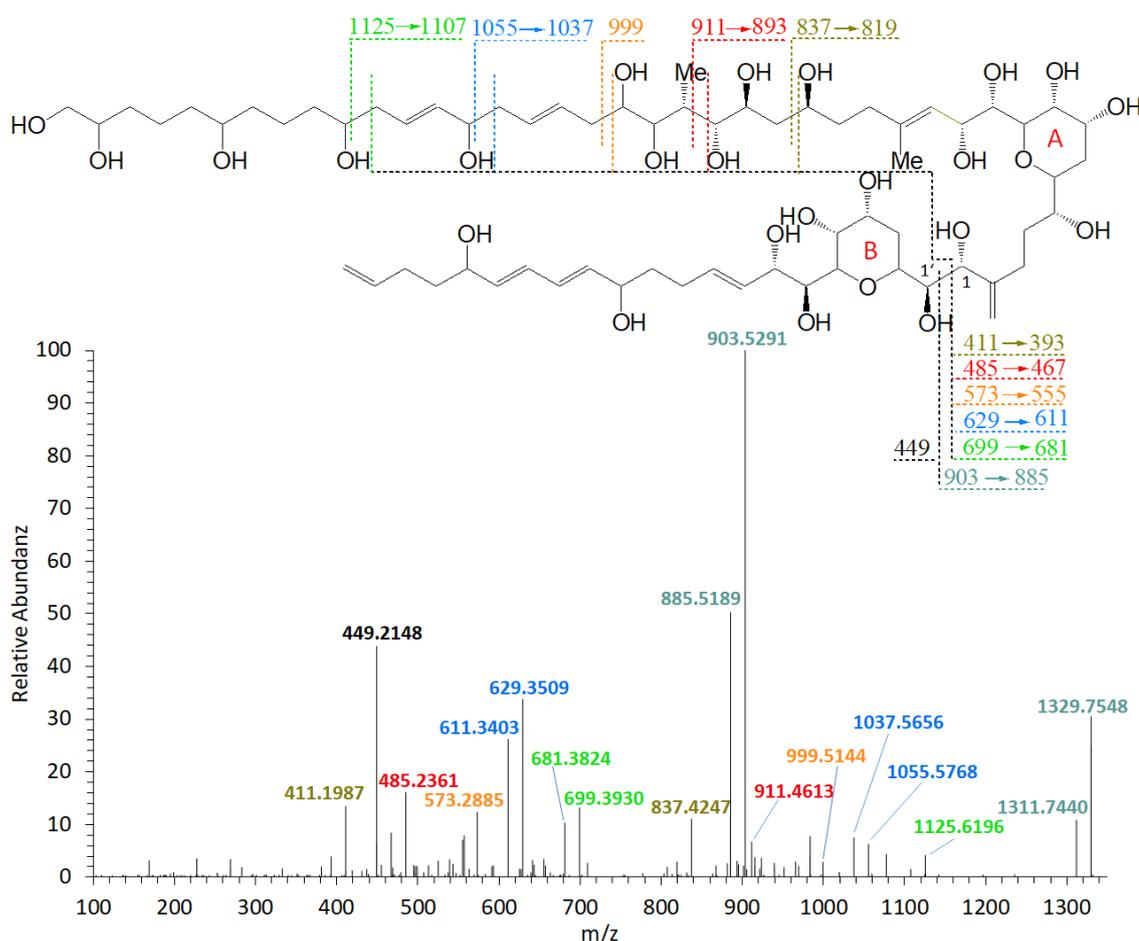


Abbildung 17. Produktionen-Spektrum und entsprechendes Fragmentierungsschema von Luteophanol D. Fragmente, welche im hydrophilen Arm entstehen, brechen erneut an dem durch Literaturrecherche bekannten C-1'/C-1-Bindungsbruch, wodurch sogenannte Paarfragmente entstehen. Diese besitzen stets eine Differenz von 426 Da.

Das erwartete Fragment mit 903,53 Da hat wie erwartet die höchste Abundanz. (An dieser Stelle sei angemerkt, dass sich alle dargestellten Spektren auf einfach geladene Moleküle beziehen, wodurch das in den Massenspektren angegebene Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) gleichbedeutend mit der Einheit Dalton (Da) ist. Im weiteren

Teil der Arbeit werden die Fragmente aus den Massenspektren stets mit der Einheit Dalton bezeichnet.) Anhand der anderen auftretenden Peaks konnte außerdem festgestellt werden, dass alle Fragmente, welche im hydrophilen Arm entstehen, noch einmal an besagter C-1'/C-1-Bindung brechen. Dadurch entstehen zwei Fragmente, die im Fall von Luteophanol D eine Differenz von 426 Da aufweisen. Diese Fragmente werden im Folgenden als Paarfragmente bezeichnet. Die Paarfragmente und deren Wasserabspaltungen (-18 Da) stellen den Großteil der abundanten Peaks im Massenspektrum dar (Abbildung 17). Das Fragment mit der Masse von 449 Da entsteht ebenfalls durch den C-1'/C-1-Bindungsbruch, stellt jedoch den Teil vom C-1'-Atom bis zum Ende des lipophilen Arms dar.

Abweichungen von der typischen Fragmentierung

Bei der Analyse der Massenspektren aus der Literatur konnten einige Amphidinole gefunden werden, die sich nicht nach dem zuvor vorgestellten Fragmentierungsmuster verhielten. Für die letztendliche Entwicklung der SRM- und Prec-/NL-Methoden ist das Verständnis, warum diese Fragmentierungsmuster von denen typischer Amphidinole abweichen, besonders wichtig.

Die vorliegenden Massenspektren zu den Amphidinen 18 und A und deren sulfatierten Derivaten Amphidinol 19 und B zeigen, dass das Fragment aus dem C-1'/C-1-Bindungsbruch nur in sehr geringer Abundanz auftaucht (siehe Abbildung 18). Das zusätzliche Erscheinen von drei anderen hochabundanten Peaks unterscheidet diese Spektren stark von denen anderer Amphidinole, weshalb die Spektren und beschriebenen Fragmentierungsschemata der Amphidinole 18, 19, A und B genauer untersucht wurden. Von diesen vier Amphidinen ist lediglich ein Fragmentierungsschema zu Amphidinol 18 verfügbar, welches von Nuzzo et al. (2014) vorgelegt wurde (Abbildung 18). Da sich Amphidinol 18 jedoch nur durch geringe Abweichungen in dem lipophilen Teil von Amphidinol A unterscheidet und Amphidinol 19 und Amphidinol B die jeweiligen sulfatierten Formen darstellen, kann das Fragmentierungsschema von Amphidinol 18 repräsentativ für die anderen drei Amphidinole verwendet werden (vgl. Anlage 2, Abbildung 45).

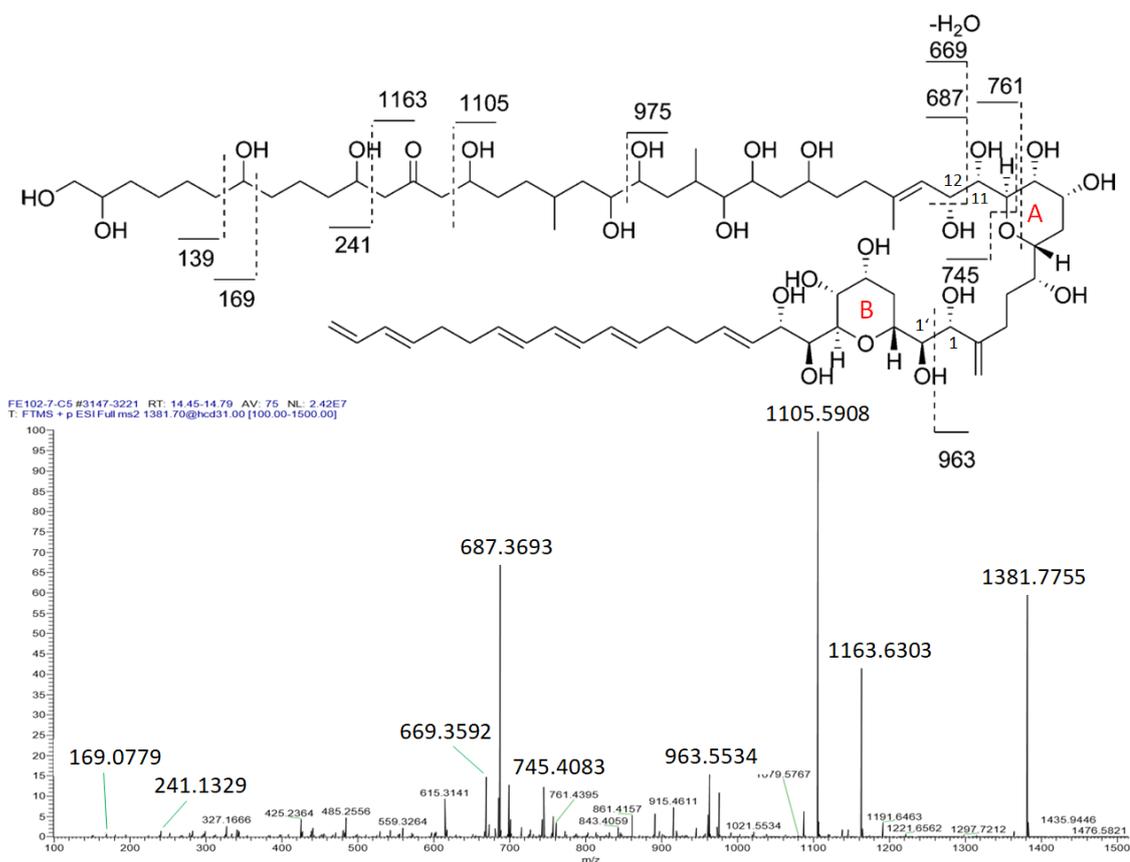


Abbildung 18. Produktions-Spektrum und entsprechendes Fragmentierungsschema von Amphidinol 18 nach Nuzzo et al. (2014). Das am C-1'/C-1-Bruch entstehende Fragment mit 963 Da tritt im Vergleich zu anderen Amphidinolen nur in geringer Abundanz auf. Andere hochabundante Peaks stellen einen weiteren Unterschied zu anderen bekannten Spektren dar.

In diesem Schema wird gezeigt, dass Bindungsbrüche neben der von zwei Hydroxylgruppen flankierten Carbonylgruppe, welche ein besonderes Merkmal dieser vier Amphidinole darstellt, zu zwei der drei hochabundanten Fragmenten führen (1163 Da und 1105 Da). Das dritte hochabundante Fragment mit 687 Da wird hier mit einem C-11/C-12-Bindungsbruch erklärt. Im Folgenden wird jedoch bewiesen, dass der Peak mit 687 Da sowie ein weiterer weniger abundante Peak nicht zu den hier beschriebenen Fragmenten gehören. Durch die richtige Zuweisung dieser Peaks konnte das Fragmentierungsschema von Amphidinolen mit Carbonylgruppe neu und korrekt beschrieben werden.

Für die Beschreibung des neuen Fragmentierungsschemas wurde mit den hochaufgelösten Massen gearbeitet, welche im Spektrum zu Amphidinol 18 angegeben sind (Abbildung 18). Es konnte zunächst festgestellt werden, dass alle gemessenen exakten Massen eine extrem hohe Abweichung zu den berechneten exakten Massen aufweisen. Ein deutliches Beispiel ist das Molekülion von Amphidinol 18 mit der

Summenformel $C_{71}H_{122}Na^+O_{24}$, welches eine berechnete Masse von 1381,8218 Da aufweist. Die gemessene Masse liegt hingegen bei 1381,7755 Da und zeigt damit eine extrem hohe Abweichung von 33,506 ppm. Das Fragment des bekannten Bindungsbruchs C-1'/C-1 weist eine berechnete Masse von 963,5863 Da auf, die gemessene Masse liegt jedoch bei 963,5534 Da, wodurch sich erneut eine sehr hohe Abweichung von 34,143 ppm ergibt. Unterschiede zwischen berechneter und gemessener Masse von etwa 30 ppm lassen sich bei allen Massen dieser Messung nachweisen, was auf eine schlechte Kalibrierung des Geräts oder eine schlechte Auflösung schließen lässt (J. Tebben, pers. Mitteilung). Dies zeigt jedoch, dass hohe Abweichungen von rund 30 ppm in dieser Messung normal sind und kein Ausschlusskriterium für erwartete Summenformeln sind. Folgende Tabelle 10 zeigt, dass die Zuordnungen des Molekülpeaks und der Peaks mit einer Masse von 1163,6303 Da, 1105,5908 Da und 963,5543 Da zu den beschriebenen Fragmenten innerhalb der erwarteten Abweichungen liegen und als korrekt angesehen werden können. Die Peaks mit den Massen 745,4083 Da und 687,3693 Da fallen jedoch weit aus diesem Muster heraus. Die Abweichungen zwischen gemessener und berechneter Masse liegen in diesen Fällen bei 83,974 ppm bzw. 139,789 ppm. Diese hohen Abweichungen sind mit schlechter Kalibrierung nicht zu erklären und zeigen, dass es sich nicht um die von Nuzzo et al. beschriebenen Fragmente handeln kann.

Tabelle 10. Berechnete und gemessene Massen ausgewählter Peaks aus dem Produktionenspektrum von Amphidinol 18

Gemessene Masse [Da]	Berechnete Masse [Da]	Abweichung [Da]	Abweichung [ppm]
1381,7755	1381,8218	0,0463	33,506
1163,6303	1163,6700	0,0397	34,116
1105,5908	1105,6282	0,0374	33,827
963,5534	963,5863	0,0329	34,143
745,4083	745,4709	0,0626	83,974
687,3693	687,4654	0,0961	139,789

Ein erneuter Blick auf das Massenspektrum mit Fokus auf den genannten sechs Massen ergab, dass es sich bei diesen um die vorher beschriebenen Paarfragmente handeln könnte. So ist die Differenz von 1381,8 Da und 963,6 Da, 1163,6 Da und 745,4 Da sowie von 1105,6 Da und 687,4 Da (alle Werte gerundet) stets gleich und beträgt im Mittelwert 418,2219 Da. Sowohl das Molekülion als auch die 1163- und 1105-Fragmente verlieren also ein neutrales Teil mit der Masse von 418,2219 Da. Diese Masse deutet mit einer Abweichung von 32,610 ppm auf die Summenformel $C_{24}H_{34}O_6$ hin. Es handelt sich um den Neutralverlust beim zuvor erwähnten C-

$1'/C-1$ -Bindungsbruch zwischen den Hydroxylgruppen bei Tetrahydropyranring B, welcher auch bei anderen Amphidinolen zu den abundantesten Peaks führt. Das bedeutet, dass an diesem Bindungsbruch drei unterschiedlich schwere Fragmente entstehen (963 Da, 745 Da, 687 Da), je nach Masse des Vorgängerfragments (1381 Da, 1163 Da, 1105 Da). Um dies zu überprüfen, wurden die exakten Massen der auf diese Weise neu entstehenden Fragmente berechnet und mit den gemessenen Massen verglichen. Es wurde erwartet, dass die Unterschiede bei ca. 33 ppm liegen, wie es ebenfalls bei den anderen gezeigten Massen der Fall war.

Tabelle 11. Berechnete und gemessene Massen der vermuteten Fragmente von Amphidinol 18

Gemessene Masse [Da]	Berechnete Masse [Da]	Abweichung [Da]	Abweichung [ppm]
745,4083	745,4345	0,0262	35,147
687,3693	687,3926	0,0233	33,896

Wie in Tabelle 11 zu erkennen ist, stimmen die gemessenen Massen mit den berechneten Massen der neu vermuteten Fragmente überein (Abweichung 33-35 ppm), wodurch die neuen Fragmente bestätigt werden konnten. Abbildung 19 zeigt zusammenfassend das neu vorgestellte Fragmentierungsschema, ergänzt um die vorher falsch zugeordneten Fragmente.

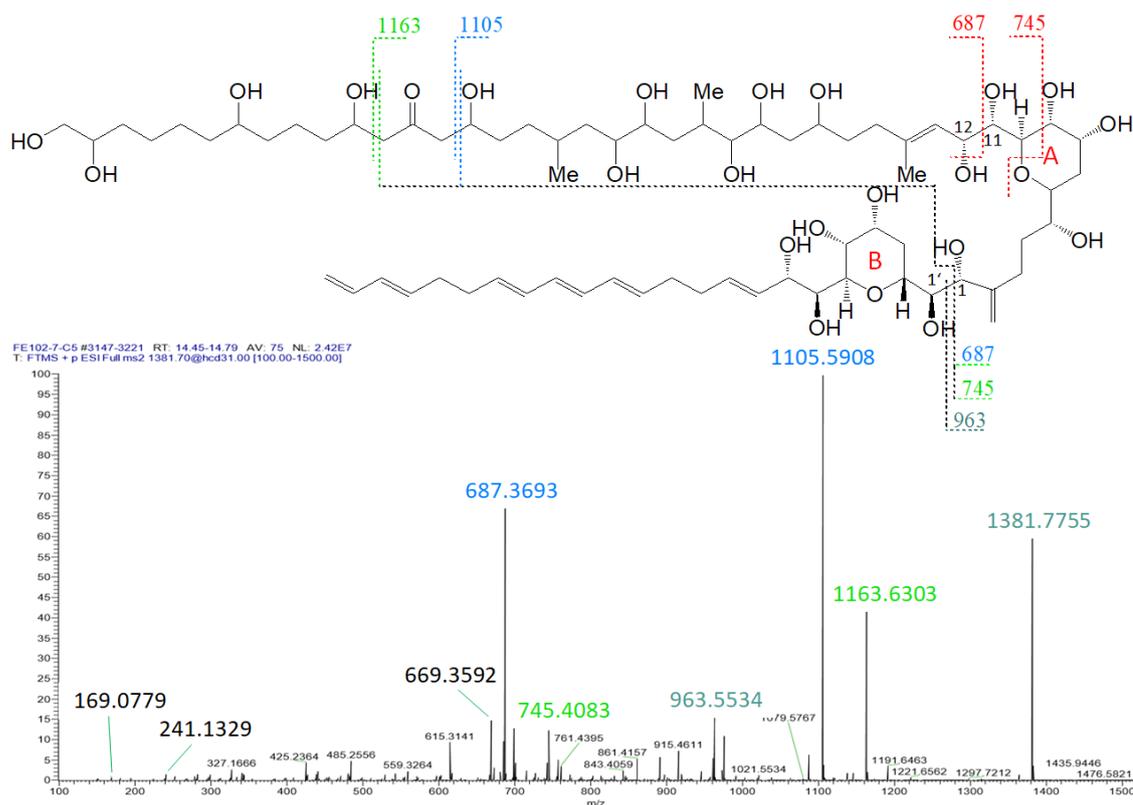


Abbildung 19. Neu vorgestelltes Fragmentierungsschema von Amphidinol 18. Die Fragmente mit den Massen von 687 Da und 745 Da sind 418 Da leichter als die Fragmente mit den Massen von 1105 Da und 1163 Da. Dementsprechend handelt es sich um Paarfragmente. Die vorherige Zuweisung der 687er- und 745er-Fragmente ist rot dargestellt.

Es wurde davon ausgegangen, dass die anderen Amphidinole mit Carbonylgruppe (Amphidinol 19, A, B) ebenfalls nach diesem neu vorgestellten Muster fragmentieren. Um dies zu bestätigen wurde das hochaufgelöste Produktions-Spektrum von Cutignano et al. (2017) zu Amphidinol A untersucht. Die gemessenen exakten Massen wurden sowohl mit den berechneten Massen des neuen als auch mit denen des alten Fragmentierungsschemas verglichen. Die in Tabelle 12 dargestellten Ergebnisse zeigen bei den Fragmenten nach altem Schema enorme Abweichungen von 50 ppm bzw. 107 ppm, während die nach neuem Schema beschriebenen Fragmente lediglich typische Abweichungen von 1,6 ppm bzw. 1,4 ppm zeigen. Hiermit konnte das neue Fragmentierungsschema erneut bestätigt werden. Das Fragmentierungsschema von Amphidinolen mit Carbonylgruppe unterscheidet sich im Vergleich zu dem Fragmentierungsschema von anderen Amphidinolen wie beispielsweise Luteophanol D (Abbildung 17) also lediglich in der Intensität der neben der Carbonylgruppe entstehenden Fragmente. Statt einem entstehen in der Regel mehrere hochabundanter Peaks, welche sich jedoch auf ähnliche Bindungsbrüche zurückführen lassen.

Tabelle 12. Berechnete und gemessene Massen der Fragmente von Amphidinol A nach neuem und altem Fragmentierungsschema

Gemessene Masse [Da]	Fragment nach	Berechnete Masse [Da]	Abweichung [Da]	Abweichung [ppm]
745,4333	altem Schema	745,4709	0,0376	50,438
	neuem Schema	745,4345	0,0012	1,610
687,3916	altem Schema	687,4654	0,0738	107,351
	neuem Schema	687,3926	0,0010	1,455

3.2.3 Messtechnische Parameter

Letztendlich wurde eine Methode erstellt, welche die besten Ergebnisse der Untersuchungen der einzelnen Parameter aus Abschnitt 2.4.4 vereint. Die messtechnischen Parameter sind von größter Wichtigkeit und tragen maßgeblich zum Erfolg der Amphidinolmessungen bei.

Bei dem Chromatographie-System handelte es sich um ein UPLC-System von Waters mit einer Purospher[®] STAR RP-18 endcapped (2 µm) Hibar[®] HR 50-2.1 UPLC-Säule. Im Vergleich zu herkömmlichen HPLC-Systemen liegt der Vorteil von UPLC-Systemen in einer Verringerung der Trenndauer bei annähernd gleichbleibender Auflösung. Gerade bei der Methodenentwicklung ist dies von Vorteil, um schnell auf auftretende Probleme reagieren zu können, indem Parameter angepasst werden. Es können eine Vielzahl verschiedener Optionen und Einstellungen in sehr kurzer Zeit getestet werden. Die kurze Trenndauer bei annähernd gleichbleibender Auflösung wird doch die Spezifikationen der Trennsäule sichergestellt. Diese ist im Vergleich zu anderen Säulen relativ kurz (50 mm statt beispielsweise 150 mm), wodurch die Trenndauer zwar verringert wird, jedoch auch die Zahl der theoretischen Böden reduziert wird. Dies hat eine schlechte Auflösung zur Folge. Um dieses Problem auszugleichen, sind die Partikel, mit denen die Säule gepackt ist und als stationäre Phase dienen, relativ klein (2 µm statt beispielsweise 5 µm). Dieser entscheidende Schritt ermöglicht eine Verdopplung der theoretischen Böden und bringt somit eine ausreichende Trennleistung bei niedriger Trenndauer (Merck Millipore, 2013).

Im nächsten Schritt wurden verschiedene Eluenten und Gradienten getestet. Ähnlich wie bei der Säulenwahl war auch hier das Ziel, eine ausreichende Trennung bei geringer Analysenzeit zu erreichen. Gewünscht waren außerdem eine Glockenfunktion nach Gauß mit minimaler Breite und maximaler Höhe. Außerdem sollten die verschiedenen Amphidinole in einem relativ engen Zeitfenster eluieren. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass auch eventuell neu auftretende Amphidinole in diesem Zeitfenster auftauchen. Dies ermöglichte die Programmierung sogenannter Methoden-Events, welche das Eluat bis zu einer gewissen Zeit in den Abfall anstatt

in das Massenspektrometer leiten. Auf diese Weise sollte das Massenspektrometer vor Verunreinigungen, welche oft am Anfang und Ende eines Laufs auftreten, geschützt werden.

Für die Wahl des Eluenten standen zwei Paare zur Verfügung. Beide Paare basierten auf Wasser und Acetonitril, jedoch in unterschiedlichen Konzentrationen und versetzt mit verschiedenen Additiven. Für die finalen Messmethoden wurde das später vorgestellte Eluentenpaar verwendet, bei dem statt 2 mM Ammoniumformiat und 50 mM Ameisensäure 6,7 mM Ammoniak als Zusatz dienten. Außerdem war der Acetonitrilanteil im Eluenten B bei diesem Eluentenpaar um 5 % geringer als beim zuerst verwendeten Eluent B. Die Darstellung und Trennung der Peaks war unter beiden Eluentenpaaren ähnlich, jedoch waren im ersten Versuch die Signalintensitäten geringfügig niedriger. Dies liegt wahrscheinlich an dem starken Säuregehalt und somit niedrigen pH-Wert des ersten Eluentenpaares, was zu unerwünschten Wechselwirkungen zwischen Analyt und Eluent führen kann (T. Max, pers. Mitteilung).

Im Hinblick auf den Gradienten zeigte sich, dass bei anfänglichem Anteil von 70 % Eluent A die Amphidinole die Säule über ein breites Zeitfenster verließen. So wurden beispielsweise Luteophanol D und Amphidinol B zwischen 0,4 min und 0,7 min detektiert, während beispielsweise Amphidinol A und Lingshuiol A erst deutlich später zwischen 2,2 min und 2,6 min detektiert wurden. Für Amphidinol B lässt sich dies mit der Tatsache begründen, dass es sich um ein sulfatiertes Amphidinol handelt. Amphidinol 19, ein weiteres detektiertes und sulfatiertes Amphidinol, hatte ebenfalls eine Retentionszeit von etwa 0,7 min. Die Sulfatgruppen erhöhen die Polarität des Moleküls, wodurch diese letztendlich weniger mit der unpolaren C18-Säule interagieren und somit nach kurzer Zeit eluieren. Luteophanol D hingegen besitzt keine Sulfatgruppe, ist aber am lipophilen Arm zweifach hydroxyliert, womit es sich wesentlich von den deutlich später erscheinenden Amphidinol A und Lingshuiol A unterscheidet. Ein weiteres detektiertes Amphidinol, welches keine Sulfatgruppe besitzt und trotzdem nach kurzer Zeit die Säule verließ, war Luteophanol B/C (eine Unterscheidung der Substanzen ist aufgrund geringer Unterschiede nicht möglich). Dieses besitzt ebenfalls einen hydroxylierten lipophilen Arm, was wie eine Sulfatgruppe zur Erhöhung der Polarität und kürzerer Verweildauer in der Säule führt. Für die finale Messmethode war allerdings gewünscht, dass sich alle Amphidinole innerhalb eines relativ engen Zeitfensters detektieren lassen. Um also die Retentionszeiten der stärker polaren Amphidinole so erhöhen, wurde der anfängliche Anteil von Eluent A von 70 % auf letztendlich 80 % erhöht. Durch den anfangs geringeren Lösemittelanteil wurden die früh detektierten Amphidinole nach hinten verschoben, während sich die Retentionszeit der später detektierten Amphidinole kaum änderte.

Somit konnten alle Amphidinole in einem Fenster zwischen 2,0 min und 3,1 min detektiert werden.

Da das Standardvolumen sehr begrenzt war und nicht kommerziell erwerblich ist, musste mit diesem äußerst sparsam umgegangen werden. Daher wurde das minimale Injektionsvolumen untersucht, welches notwendig ist, um noch eindeutige Signale zu erhalten. Diese Untersuchungen zeigten, dass 0,5 µl ausreichen, um den vorliegenden Standard und die gegebenen Proben in guter Qualität untersuchen zu können. Diese geringe Menge spricht für eine hohe Sensitivität der Methode.

Für die im vorherigen Abschnitt 3.2.2 erwähnte Fragmentierung ist die Kollisionsenergie als wichtigster Parameter von besonderer Bedeutung. Wird diese zu hoch angesetzt, werden im Spektrum lediglich sehr viele kleine Massen bis etwa 200 Da angezeigt. Diese haben jedoch keine Aussagekraft und machen eine Identifizierung des Moleküls unmöglich. Wird die Kollisionsenergie anders herum zu niedrig angesetzt, wird das Molekülion nicht fragmentiert und eine genaue Identifizierung ist ebenfalls unmöglich. In den zur Kollisionsenergie durchgeführten Versuchen konnte festgestellt werden, dass die Standardsubstanz Luteophanol D und damit ein Großteil der existierenden Amphidinole mit einer Kollisionsenergie von 85 eV gut fragmentieren. Dies bedeutet, dass das Molekülion in ausreichender Intensität vorhanden war, jedoch nicht den höchsten Peak darstellte. Außerdem war eine Wasserabspaltung des Molekülions detektierbar und Fragmente im unteren Massenbereich bis 200 Da traten nicht auffällig häufig auf. Um diese Ergebnisse für sulfatierte Amphidinole und Amphidinole mit Carbonylgruppe generieren zu können, musste die Kollisionsenergie auf 75 eV verringert werden. Daraus lässt sich schließen, dass Sulfat- und Carbonylgruppen insgesamt eine destabilisierende Wirkung auf die Struktur der Amphidinole haben.

Die Scanrate gibt an, wie viele Massen pro Sekunde abgetastet werden. Für die Produktionsmethoden hat sich gezeigt, dass eine minimale Scanrate und dementsprechend maximale Scanzeit pro Masse die besten Ergebnisse liefert.

3.2.4 Detektion von bekannten Amphidinolen mittels SRM

Bei dem „Selected Reaction Monitoring“-Modus (SRM) werden sogenannte Übergänge verwendet, um gesuchte Substanzen spezifisch nachweisen zu können. Ein Übergang besteht dabei stets aus zwei Massen: Eine Ausgangsmasse (meist das Molekölion) und ein entsprechendes Fragmention, welches nach Fragmentierung der Ausgangsmasse entsteht. Durch diese zwei Massen kann eine gesuchte Substanz spezifisch identifiziert und mithilfe eines Standards ggf. quantifiziert werden. Eine SRM-Methode kann beliebig viele Übergänge enthalten und lässt das Massenspektrometer nur nach den beschriebenen Massen scannen, wodurch, je nach Anzahl der Übergänge, eine sehr hohe Sensitivität erreicht werden kann. Da für viele Amphidinole kein Produktions-Spektrum und dementsprechend keine Informationen über mögliche Fragmentionen vorliegen, wurde mit dem bekannten C-1'/C-1-Bindungsbruch gearbeitet (vorgestellt in Abschnitt 3.2.2). Dieser entsteht in der hochkonservierten Teilstruktur, welche die Tetrahydropyranringe beinhaltet und somit für alle Amphidinole vollkommen identisch ist. Mithilfe der bekannten Strukturformeln konnten an dieser Bruchstelle für alle Amphidinole Fragmentionen berechnet werden. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass eventuell sulfatierte Amphidinole stets zuerst die Sulfatgruppe verlieren, bevor die bekannte Fragmentierung eintritt. Dies muss bei der Berechnung des Fragmentions mit einbezogen werden und wird anhand eines Beispiels erläutert.

Das Natriumaddukt von Amphidinol 18 hat eine Masse von 1381,8 Da und ist nicht sulfatiert. Es kann ein direkter Schnitt am C-1'/C-1-Bindungsbruch durchgeführt werden und es entsteht ein Fragment mit einer Masse von 963,6 Da, wie es im hochauflösenden Massenspektrum von Amphidinol 18 zu erkennen ist (Abbildung 19). Bei Amphidinol B hingegen handelt es sich um ein sulfatiertes Amphidinol. Das zweifache Natriumaddukt hat eine Masse von 1463,8 Da. Ein direkter Schnitt am Bindungsbruch zwischen den Hydroxylgruppen würde zu einem Fragment mit der Masse 1064,5 Da führen. Ein dementsprechender Peak ist im folgenden hochauflösenden Massenspektrum von Amphidinol B (Abbildung 20) jedoch nicht zu sehen. Zunächst wird die Sulfatgruppe abgespalten und ein Fragment mit der Masse von 1343,8 Da entsteht. Bricht dieses Fragment nun an besagter C-1'/C-1-Bindung, entsteht ein neues Fragment mit einer Masse von 945,6 Da. Dieses ist zum vorerst berechneten Fragment 118,9 Da leichter. Für die Berechnung des Fragmentions zur Erstellung der SRM-Methode war es dementsprechend wichtig, bei sulfatierten Amphidinolen stets eine Masse von 118,9 Da vom zunächst berechneten Fragmention zu subtrahieren. Die so für alle Amphidinole berechneten Fragmentionen und das zugehörige Molekölion sind in Tabelle 13 dargestellt.

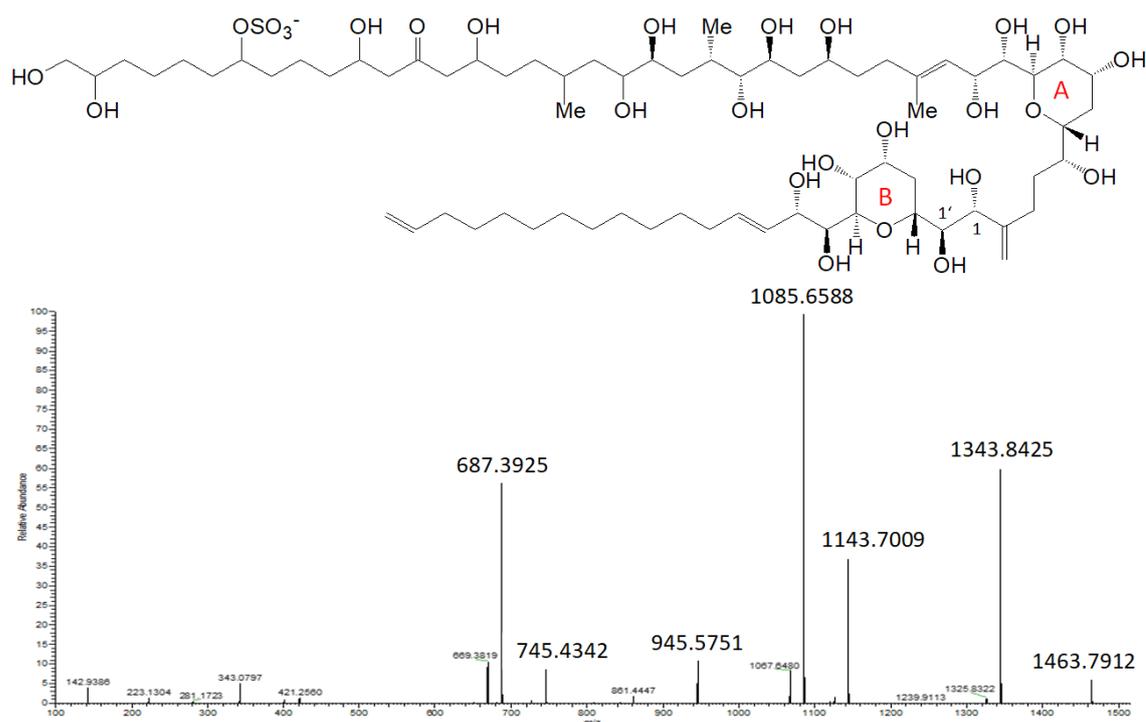


Abbildung 20. Struktur von Amphidinol B und dazugehöriges Produktions-Spektrum von Amphidinol B nach Cutignano et al. (2017). Bei diesem sulfatierten Amphidinol kommt es vor dem bekannten C-1'/C-1-Bindungsbruch zu einer Abspaltung der Sulfatgruppe. Erst dann entsteht das typische Fragmentierungsmuster.

Tabelle 13. Berechnete und für SRM verwendete Amphidinol-Übergänge

Name	Molekülion [Da]	Fragment-ion [Da]	Name	Molekülion [Da]	Fragment-ion [Da]
AM01	1512	974	AM20(S)	1653	1260
AM02	1398	1006	AM21	1798	1406
AM03	1350	932	AM22	1668	1330
AM04	1324	932	AMA	1362	964
AM05	1394	976	AMB	1442	946
AM06	1368	976	AMDG	1300	768
AM07	1254	742	CARE	1422	1030
AM09	1350	932	KARA	1480	1082
AM10	1296	904	KARB	1462	1064
AM11	1500	988	LPA	1278	754
AM12	1426	914	LPB	1344	904
AM13	1452	914	LPC	1344	904
AM14	1288	742	LPD	1330	904
AM15	1186	760	LS	1374	976
AM17	1306	816	LSA	1296	904
AM18	1382	964	LSB	1266	754
AM19	1462	946	SP	1266	754
AM20(M)	1346	904			

Nachdem zunächst der Luteophanol D Standard erfolgreich mit der SRM-Methode gemessen und deren Funktionalität somit bestätigt wurde, wurden die anderen Proben mit jener Methode gemessen. Eine Quantifizierung blieb vorerst aus und erfolgte in einer nachfolgenden Messung, in der auch die im Abschnitt 3.2.5 erwähnten unbekanntenen Amphidinole quantifiziert wurden. Mit dem hier verwendeten SRM-Scan konnten in 5 von 9 gemessenen Proben Amphidinole detektiert werden. Dies waren die Proben der Stämme CCMP1314A, CCMP1314B, ACRN02, ACRN03 und DN241EHU. In den Stämmen AA39, AA40, AA60 und A01BR konnten keine Amphidinole detektiert werden. Um sicherzustellen, dass es sich bei evtl. auftretenden Peaks tatsächlich um die jeweiligen Amphidinole handelt, wurde von allen detektierten Substanzen ein Produktions-Spektrum aufgezeichnet. Diese sind im Anhang (Anlage 3, Abbildung 46 bis 55) hinterlegt. Einige Substanzen wurden jedoch nur in so geringer Abundanz festgestellt, dass eine sichere Bestimmung über das Produktions-Spektrum nicht möglich war. Folgende Tabelle 14 zeigt die gefundenen Amphidinole.

Tabelle 14. Durch SRM-Messung detektierte Amphidinole verschiedener *Amphidinium carterae* Stämme

Name	t _R [min]	CCMP- 1314A	CCMP- 1314B	ACRN02	ACRN03	DN241- EHU
AM18	2,71	X	X	-	-	-
AM19	2,20	X	X	-	-	-
AM22	2,60	X	X	-	-	X
LPB/ LPC*	2,23	-	-	X	-	-
LPD	2,00	-	-	X	X	-
LSA	2,58	-	-	X	X	-
AM04(?)	2,62	-	-	X	-	-
CARE(?)	2,52	-	-	X	-	-
AMA	2,76	-	-	-	-	X
AMB	2,27	-	-	-	-	X

* Luteophanol B und C unterscheiden sich lediglich durch die Position zweier Hydroxygruppen, sodass sie hier nicht unterschieden werden konnten.

(?) Diese Substanzen konnten wegen zu geringer Abundanz nicht sicher über ein Produktions-Spektrum identifiziert werden.

3.2.5 Detektion von unbekanntem Amphidinolen mittels

Neutralverlust

Entwicklung der Neutralverlust-Methode

Um unbekannte Amphidinole isoliert detektieren zu können, bieten sich Vorläuferionen-Scans („Precursorion“-Scan, Prec-Scan) und Neutralverlust-Scans („Neutralloss“-Scan, NL-Scan) an. Beim Prec-Scan scannt das erste Quadropol einen festgelegten Massenbereich, während das zweite Quadropol als Kollisionszelle dient und das dritte Quadropol statisch nach einer festgelegten Produktmasse scannt (Waters Corporation, 2016). Dadurch lassen sich alle Moleküle detektieren, die ein geladenes Fragment einer bestimmten Masse erzeugen. In Bezug auf die Amphidinole könnte theoretisch nach dem Fragment gesucht werden, welches durch den bekannten C-1'/C-1-Bindungsbruch entsteht. Dieses Fragment beinhaltet Tetrahydropyranring A, den Großteil der verbindenden C₆-Kette und den hydrophilen Arm. Problematisch dabei ist, dass dieses Fragment aufgrund der hohen Diversität des hydrophilen Arms in vielen verschiedenen Varianten mit unterschiedlicher Masse vorkommt. Es wäre also eine Vielzahl von Methoden notwendig, um alle vorkommenden Fragmenttypen detektieren zu können. Außerdem spricht die hohe Variabilität der hydrophilen Arme dafür, dass neue Amphidinole nicht zwangsweise einen der bisher bekannten Fragmenttypen besitzen. Deshalb wurde dieser Scanmodus nicht verwendet.

Beim Neutralverlust-Scan werden die Scans vom ersten und dritten Quadropol synchronisiert, während das zweite Quadropol wieder als Kollisionszelle dient. Wenn ein Vorläuferion das erste Quadropol verlässt, detektiert das dritte Quadropol alle Fragmente, die sich durch den Verlust eines neutralen Fragments einer definierten Masse auszeichnen. In dem Fall werden im NL-Spektrum alle Vorläuferionen gezeigt, die das Neutralfragment verloren haben (Waters Corporation, 2016). Im Fall der Amphidinole verlieren diese durch den bekannten C-1'/C-1-Bindungsbruch ein solches neutrales Fragment, sodass der Neutralverlust-Scan als Methode zur Detektion von unbekanntem Amphidinolen verwendet werden konnte. Das entstehende neutrale Fragment stellt den Teil vom C-1'-Atom bis zum Ende des lipophilen Arms dar. Es treten zwar Variationen des lipophilen Arms innerhalb der Amphidinole auf, jedoch bei weitem nicht so häufig und divers wie Variationen des hydrophilen Arms. Innerhalb der 37 in der Literatur beschriebenen Amphidinole kommen lediglich sieben verschiedene Varianten des lipophilen Arms vor, der zusammen mit Tetrahydropyranring B dem neutralen Fragment entspricht. Von den sieben Varianten treten drei außerdem nur bei jeweils einem oder zwei Amphidinolen auf, sodass neue Amphidinole sehr wahrscheinlich eine der vier verbliebenen Varianten aufweisen. Die Fragmenttypen unterscheiden sich in Anzahl der

Kohlenstoffatome, Hydroxylgruppen und Doppelbindungen. Die Suche nach neutralen Verlusten mit der Masse dieser sieben verschiedenen Varianten führt daher mit hoher Wahrscheinlichkeit zu neuen Amphidinolen. Die sieben Neutralverlust-Typen sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15. Auftretende Typen von Neutralverlusten innerhalb der Amphidinolfamilie

#	Neutralverlust [Da]	Anzahl C-Atome	Anzahl Hydroxylgruppen	Anzahl Doppelbindungen	Häufigkeit
1	392,13	22	5	5	14/37
2	426,23	22	7	4	7/37
3	418,24	24	5	6	7/37
4	398,28	22	5	2	5/37
5	440,25	23	7	4	2/37
6	442,23	22	8	4	1/37
7	338,18	18	5	4	1/37

Ähnlich wie bei der Entwicklung der SRM-Methode im vorherigen Abschnitt müssen auch hier sulfatierte Amphidinole separat betrachtet werden. Beim Scannen nach den oben erwähnten Neutralverlusten werden für Amphidinole, welche eigentlich eine Sulfatgruppe tragen, stets Moleküle mit einer Masse von 120 Da weniger detektiert. Dieser Sachverhalt wird an einem Beispiel erläutert.

Durch die SRM-Methode konnte im *Amphidinium carterae* Stamm DN241EHU Amphidinol B, welches eine Sulfatgruppe trägt, mit einer Retentionszeit von 2,24 min nachgewiesen werden. Dieses besitzt den Neutralverlust-Typ 4 mit einer Masse von 398,28 Da. Der entstehende Peak bei jenem Neutralverlust-Scan bei der Retentionszeit von 2,24 min zeigt jedoch eine Masse von 1344 Da statt der erwarteten 1464 Da (Abbildung 21).

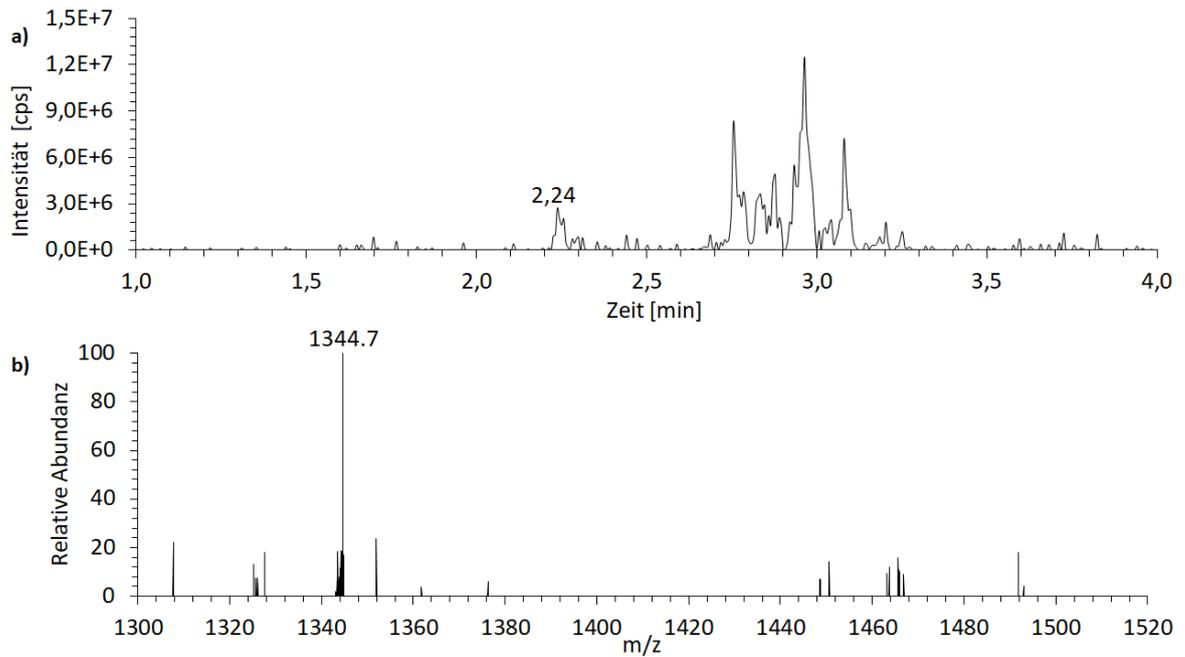


Abbildung 21. a) Chromatogramm des Neutralverlust-Scans von 398 Da des *Amphidinium carterae* Stamms DN241EHU. b) Massenspektrum des Peaks bei 2,24 min. Statt der zu erwartenden Masse von 1464 Da (Amphidinol B) wurde großteils eine Masse von 1344 Da detektiert. Mit diesem Neutralverlust-Scan ist eine Detektion von sulfatierten Amphidinen (hier: Amphidinol B) nicht möglich.

Um Amphidinol B und andere sulfatierte Amphidine im Neutralverlust-Scan detektieren zu können, wurde zu den ursprünglichen Massen der Neutralverlust-Typen jeweils eine Masse von 120 Da addiert. Folgende Tabelle 16 zeigt die verschiedenen Neutralverlust-Typen für sulfatierte Amphidine.

Tabelle 16. Neutralverlust-Typen für sulfatierte Amphidine, welche stets 120 Da schwerer als die unsulfatierten Typen sind.

#	Neutralverlust [Da]
1s	512,13
2s	546,23
3s	538,24
4s	518,28
5s	560,25
6s	562,23
7s	458,18

Um diese Methode zu überprüfen, wurde der Amphidinol B enthaltende Stamm DN241-EHU erneut gemessen. Es wurde ein Peak bei 2,24 min erwartet, welcher durch einen Neutralverlust von 518 Da (Typ 4s) von einem Molekül mit der Masse von 1464 Da entstanden ist. Abbildung 22 zeigt das Ergebnis des Neutralverlust-Scans von 518 Da.

Amphidinol B mit der Masse 1464 Da konnte erfolgreich detektiert werden und zeigt repräsentativ, dass für sulfatierte Amphidinole nach Neutralverlusten mit einer zusätzlichen Masse von 120 Da gescannt werden muss.

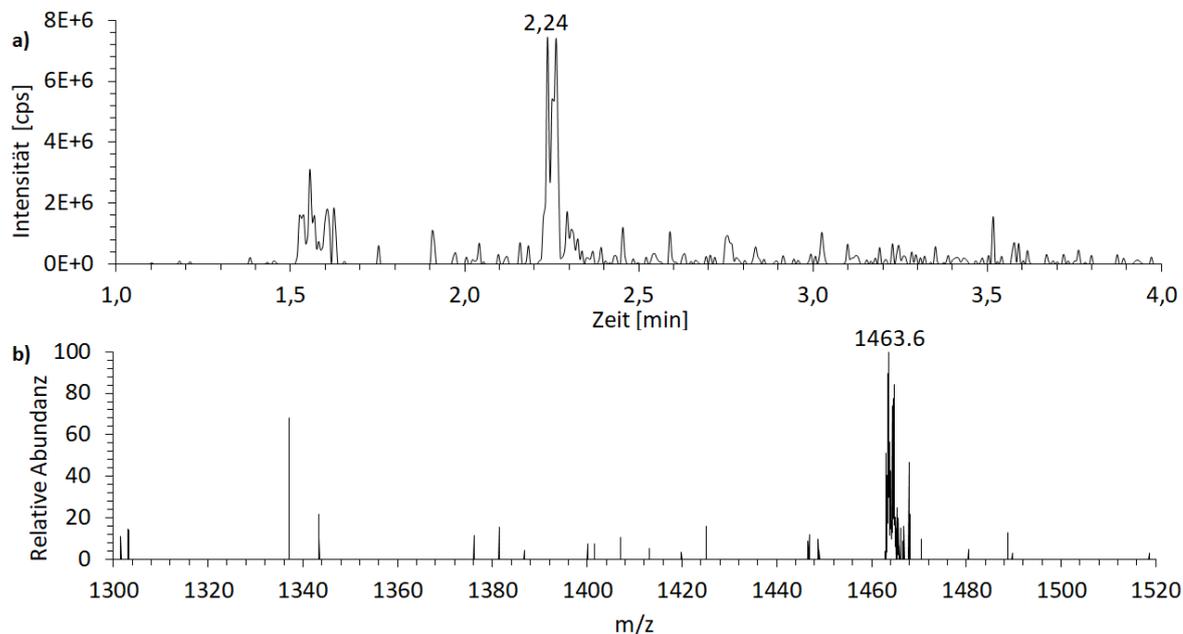


Abbildung 22. a) Chromatogramm des Neutralverlust-Scans von 518 Da des *Amphidinium carterae* Stamms DN241EHU. b) Massenspektrum des Peaks bei 2,24 min. Die erwartete Masse von 1464 Da konnte erfolgreich detektiert werden.

Detektierte Amphidinolkandidaten

Alle vorhandenen Proben wurden nach den entsprechenden Neutralverlust-Typen gescannt (vgl. Tabelle 15 und 16). Dabei konnten insgesamt 18 Substanzen detektiert werden, bei denen es sich theoretisch um neue Amphidinole handeln konnte. Zu Beginn werden an einem Beispiel ausführlich die notwendigen Schritte gezeigt, wie eine Substanz detektiert und über Auswertung des Massenspektrums charakterisiert wurde, worauf es schließlich als Amphidinol bestätigt oder widerlegt werden konnte. Diese Vorgehensweise wurde auch für die anderen Substanzen angewendet, wird jedoch nicht erneut für jede einzelne Substanz beschrieben. Des Weiteren sei angemerkt, dass es sich in den meisten Fällen lediglich um Strukturvorschläge handelt. Eine vollständige Aufklärung der Strukturen müsste über NMR-Spektroskopie erfolgen.

Abbildung 23a) zeigt das Chromatogramm des 392er-Neutralverlust-Typs des Stamms ACRN02, welcher in bekannten Amphidinolen am häufigsten auftritt. Ein Blick auf das in Abbildung 23b) dargestellte Spektrum des Peaks bei 2,56 min zeigt, dass insgesamt vier Massen jenen Neutralverlust aufweisen. Während es sich bei dem Molekül mit der

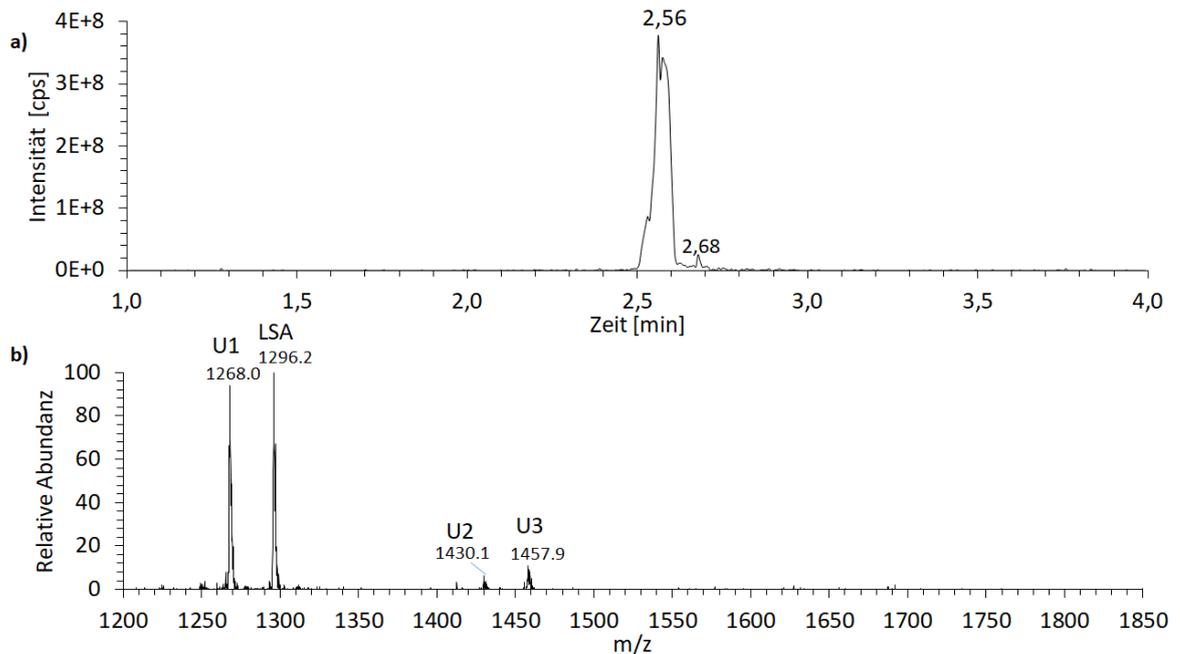


Abbildung 23. a) Chromatogramm des Neutralverlust-Scans von 392 Da des *Amphidinium carterae* Stamms ACRN02. b) Massenspektrum des Peaks bei 2,56 min, in dem Lingshuiol A (1296 Da) und die Substanzen U1 (1268 Da), U2 (1430 Da) und U3 (1458 Da) detektiert wurden.

Masse von 1296 Da um das im bereits SRM-Modus detektierte Lingshuiol A handelt (vgl. Tabelle 14), stellen die anderen Massen potentielle Kandidaten für neue Amphidinole dar. Diese Kandidaten wurden als Unbekannte Substanz 1 (U1, 1268 Da), U2 (1430 Da) und U3 (1458 Da) bezeichnet. Von jenen Massen wurde ein Produktionen-Spektrum aufgezeichnet und die gezeigten Fragmente mit denen anderer Amphidinole verglichen, um die Substanzen als Amphidinol zu verifizieren. An dieser Stelle fiel außerdem auf, dass die Massendifferenz von LSA zu U1 und von U3 zu U2 jeweils 28 Da beträgt, während die Differenz von U1 zu U2 und von LSA zu U3 jeweils 162 Da beträgt. Dies führte zu dem Verdacht, dass es sich bei U2 und U3 um derivatisierte Formen von U1 und LSA handelt. Zur Bestimmung der Summenformeln wurde in diesen Fällen ausnahmsweise eine Messung mit hochauflösender Massenspektrometrie durchgeführt. Dieser Sachverhalt wird weiter in den Abschnitten zu U2 und U3 erläutert.

Zunächst wurde ein Produktionen-Spektrum von U1 mit der Masse 1268 Da und der Retentionszeit von 2,56 min aufgezeichnet (dargestellt in Abbildung 24a). Zur Strukturaufklärung wurde in diesem Fall der Vergleich mit Lingshuiol A gewählt, da das Molekül annähernd die gleiche Retentionszeit und Masse sowie ein sehr ähnliches Produktionen-Spektrum aufweist (Abbildung 24b). Das entsprechende Fragmentierungsschema von LSA ist in 24c) dargestellt.

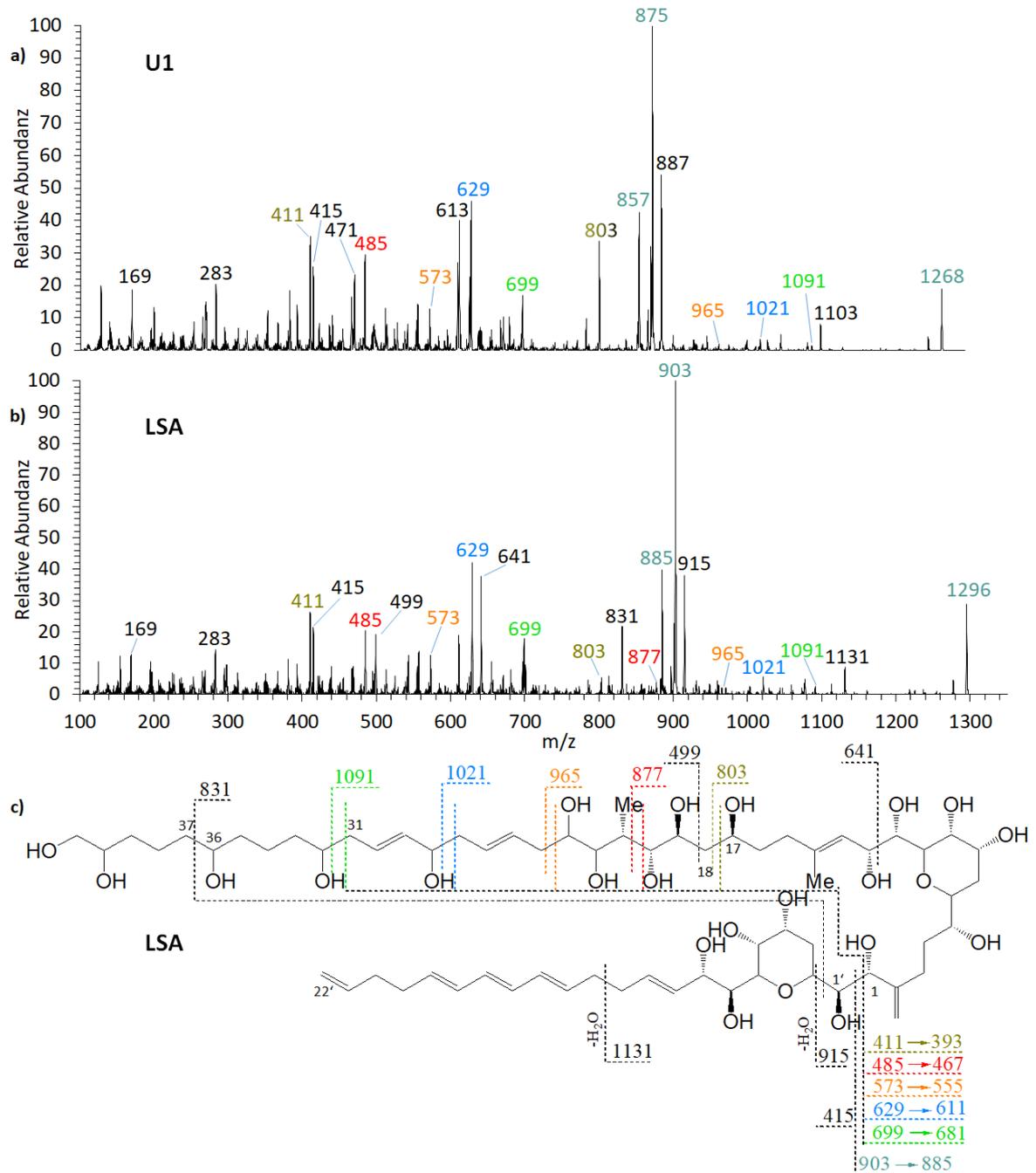


Abbildung 24. a) Produktions-Spektrum von 1268 Da (2,56 min) des *Amphidinium carterae* Stamms ACRN02, bezeichnet als U1. Die teilweise in geringer Abundanz auftretenden Paarfragmente sind farblich markiert. b) Produktions-Spektrum von Lingshuiol A aus dem selben *Amphidinium*-Stamm. c) Struktur und Fragmentierungsschema von Lingshuiol A.

Vorab wurde die Differenz der Massen von Lingshuiol A und der neuen Substanz berechnet, welche bei 28 Da liegt. Diese Differenz lässt sich mit dem Fehlen von zwei Methylengruppen (C_2H_4) erklären. Dabei stellt sich die Frage, in welchem Teil des Moleküls die Kohlenstoffkette um zwei Einheiten verringert ist. Beim Vergleich der Spektren von U1 und LSA ist deutlich zu erkennen, dass die farblich markierten Paarfragmente, auch wenn sie teilweise in sehr geringer Abundanz auftreten, bei beiden Amphidinolen identisch sind (Ausnahme: graues Paarfragment, zu welchem das Molekölion gehört). Auch die Differenz der Paarfragmente liegt in beiden Fällen bei 392 Da. Dadurch kann bestätigt werden, dass LSA und U1 vom C-22'-Atom bis zum C-31-Atom (bezogen auf die Struktur von LSA, Abbildung 24c) die gleichen Fragmente bilden und dementsprechend wahrscheinlich identisch aufgebaut sind. Theoretisch können jedoch die Positionen von Hydroxylgruppen und Doppelbindungen variieren. Ein Blick auf die schwarz dargestellten Fragmente zeigt erneut die Differenz von 28 Da und hilft, die Position der zwei fehlenden Methylenheiten weiter einzuschränken. Vor allem der C-36/C-37-Bindungsbruch ist dabei entscheidend. In Lingshuiol A wird an dieser Stelle ein Fragment mit der Masse von 831 Da erzeugt. Das dazu entsprechende Fragment im U1-Spektrum hat eine Masse von 803 Da und ist somit zufällig genauso schwer wie das des ockerfarbenen C-17/C-18 Bindungsbruchs. Dieser tritt allerdings für gewöhnlich nur in geringer Abundanz auf, weshalb der hohe Peak im U18-Spektrum definitiv durch den C-36/C-37-Bindungsbruch entstanden sein muss. Aus diesen Informationen lässt sich schließlich ableiten, dass das neu detektierte Amphidinol identisch mit LSA ist, jedoch zwei Methylenheiten zwischen C-31 und C-37 fehlen. Folgende Abbildung 25 zeigt eine vorgeschlagene Struktur inklusive Fragmentierungsschema von U1.

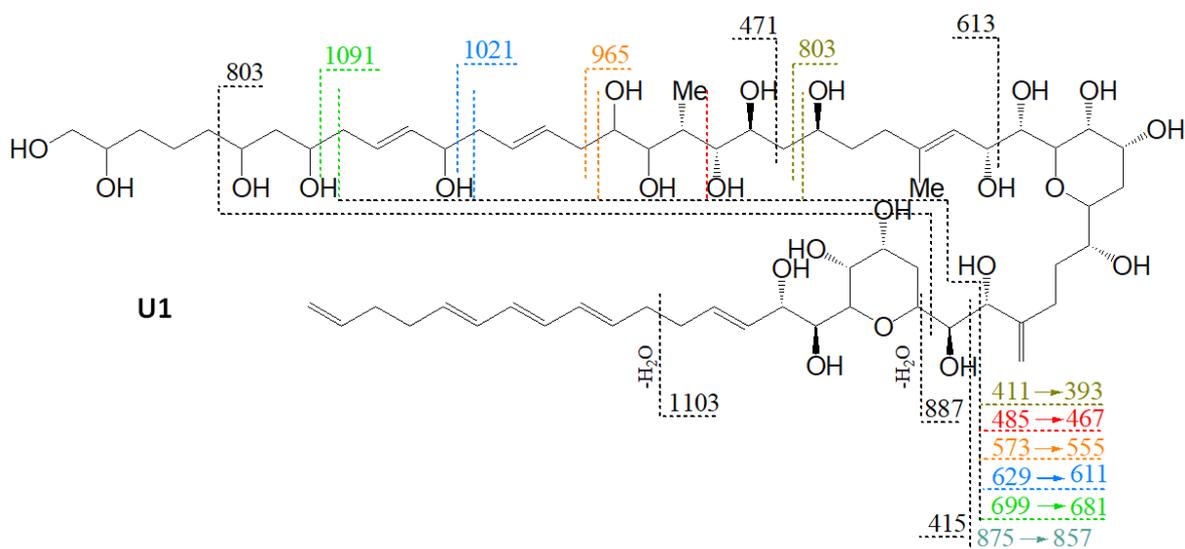


Abbildung 25. Strukturvorschlag und Fragmentierungsschema von U1, einem neu entdeckten Amphidinol mit einer Masse von 1268 Da.

U2

U2 hat eine Retentionszeit von 2,52 min und eine Masse von 1430 Da, womit diese Substanz 162 Da schwerer ist als U1. Durch diese Differenz und die deutlich geringere Abundanz im Massenspektrum des Neutralverlust-Scans (Abbildung 23) kam die Vermutung auf, dass es sich bei U2 um eine derivatisierte Form von U1 handeln könnte. Eine Messung mit hochauflösender Massenspektrometrie ergab für U2 eine Masse von 1429,7694 Da, was einer Summenformel von $C_{70}H_{118}NaO_{28}$ entspricht (Abweichung $-0,54$ mDa). Die entsprechende Messung für U1 ergab eine Masse von 1267,7164 Da und eine Summenformel von $C_{64}H_{108}NaO_{23}$ (Abweichung $-0,73$ mDa). Die Summenformeln beider Substanzen unterscheiden sich um $C_6H_{10}O_5$. Dieser Aufbau ähnelt dabei stark einem Glukosemolekül mit der Summenformel $C_6H_{12}O_6$. In der Literatur wird zudem von glykosylierten Flavonoiden berichtet, bei denen Glukoseabspaltungen zu einem Massenverlust von 162 Da führen (Vallejo et al., 2004), weshalb auch in diesem Fall von einem glykosyliertem Molekül, auch Glykosid genannt, ausgegangen wird. Abbildung 26 zeigt das Produktions-Spektrum, Fragmentierungsschema und einen Strukturvorschlag zu U2.

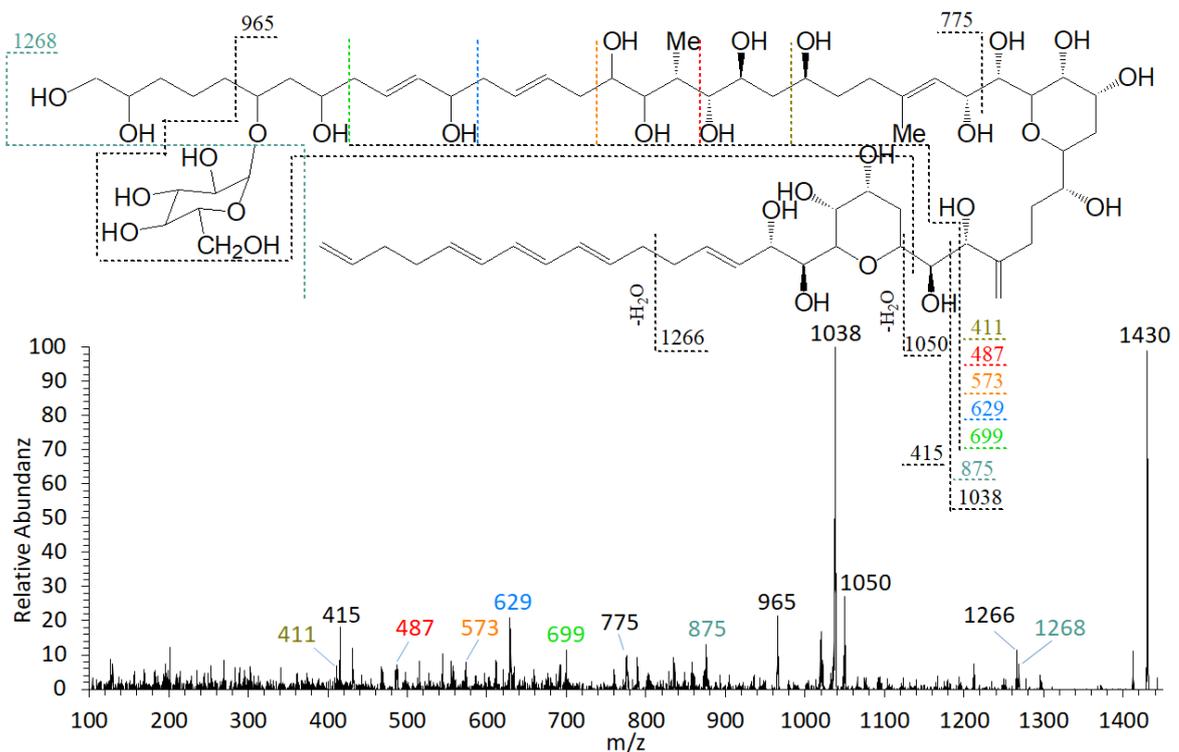


Abbildung 26. Produktions-Spektrum von 1430 Da (2,52 min) des *Amphidinium carterae* Stamms ACRN02, bezeichnet als U2. Dazu entsprechendes Fragmentierungsschema und Strukturvorschlag. Bei U2 handelt es sich um die glykosilierte Form von U1.

Dieses Spektrum ist sehr ähnlich zu dem von U1 (Abbildung 24a) und zeigt mehrere gleiche Fragmente. Auffällig ist die Erhöhung jener Fragmente, welche die Glukoseeinheit einschließen, um die Masse 162 Da (z.B. 965 Da statt 803 Da oder 775 Da statt 613 Da). Außerdem kann ein Fragment mit der Masse 1268 Da in geringer Abundanz detektiert werden, welches nach der Glukoseabspaltung entsteht und somit die Masse von U1 besitzt.

U3

Die Unbekannte Substanz 3 hat eine Retentionszeit von 2,53 min und eine Masse von 1458 Da, womit sie 162 Da schwerer als Lingshuiol A ist. Auch in diesem Fall wird von einer glykosilierten Form ausgegangen. Das Spektrum zeigt Fragmente, welche im Vergleich zu dem U2-Spektrum 28 Da schwerer sind. Erneut kann die Masse der nicht-glykosilierten Form, in diesem Fall 1296 Da, in geringer Abundanz detektiert werden.

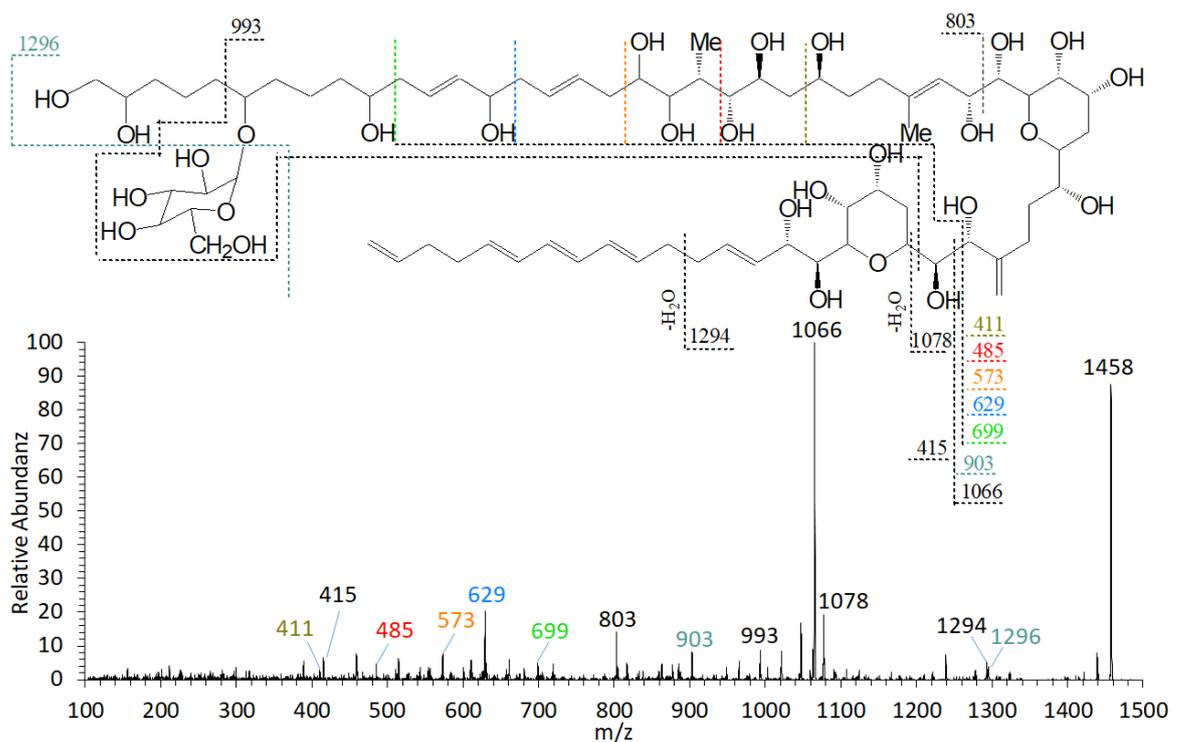


Abbildung 27. Produktions-Spektrum von 1458 Da (2,53 min) des *Amphidinium carterae* Stamms ACRN02, bezeichnet als U3. Dazu entsprechendes Fragmentierungsschema und Strukturvorschlag. Bei U3 handelt es sich um die glykosilierte Form von LSA.

U4

U4 hat eine Retentionszeit von 2,56 min, eine Masse von 1250 Da und wurde wie U1-U3 im *A. carterae*-Stamm ACRN02 detektiert. Das Produktions-Spektrum ist in Abbildung 28 dargestellt. Dabei könnte es sich theoretisch um ein neues Amphidinol handeln, allerdings kann durch die selbe Retentionszeit wie U1, eine Verringerung fast aller Fragmente um 18 Da und einer deutlich geringeren Intensität im Chromatogramm von einer ungewollten Fragmentierung in der Quelle (engl. *in-source fragmentation*) ausgegangen werden (B. Krock, pers. Mitteilung). Diese Substanz stellt demnach wahrscheinlich ein unerwünschtes Nebenprodukt dar, welches bei der Messung von U1 entstand.

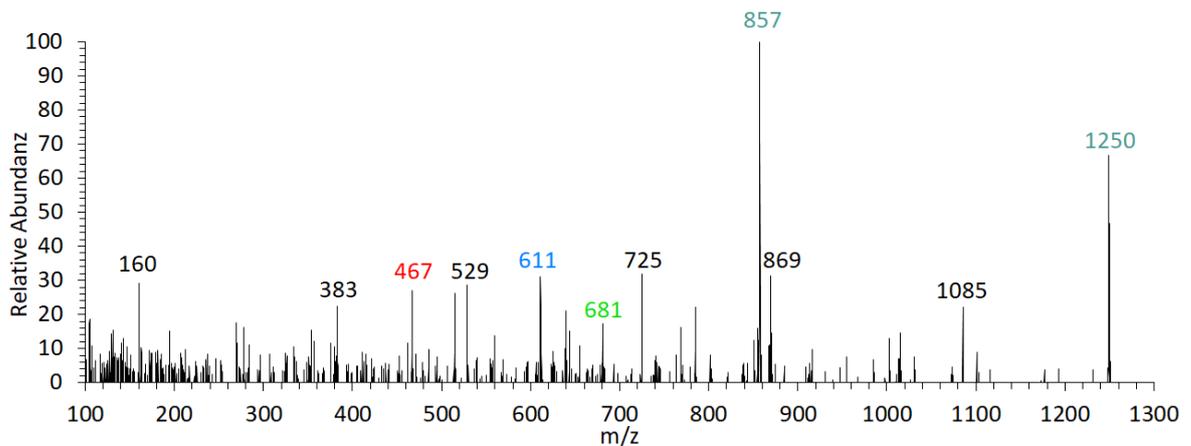


Abbildung 28. Produktions-Spektrum von 1250 Da (2,56 min) des *Amphidinium carterae* Stamms ACRN02, bezeichnet als U4. Dabei handelt es sich sehr wahrscheinlich um eine Substanz, welche durch *in-source*-Fragmentierung von U1 entstanden ist und demnach kein in *Amphidinium* vorkommendes Amphidinol darstellt.

U5

Bei dem durchgeführten Produktions-Scan zu U4 konnte im *Amphidinium carterae* Stamm ACRN02 eine weitere Substanz mit der Masse von 1250 Da detektiert werden. Diese besitzt eine Retentionszeit von 2,39 min. Das Produktions-Spektrum (Abbildung 29) weist deutliche Unterschiede zu üblichen Produktions-Spektren von Amphidinolen auf. Das Molekülion ist kaum zu detektieren und es treten hauptsächlich Fragmente um den Bereich von 550 Da auf. Bei dieser Substanz handelt es sich um kein Amphidinol, weshalb eine weitere Analyse des Spektrums nicht durchgeführt wurde.

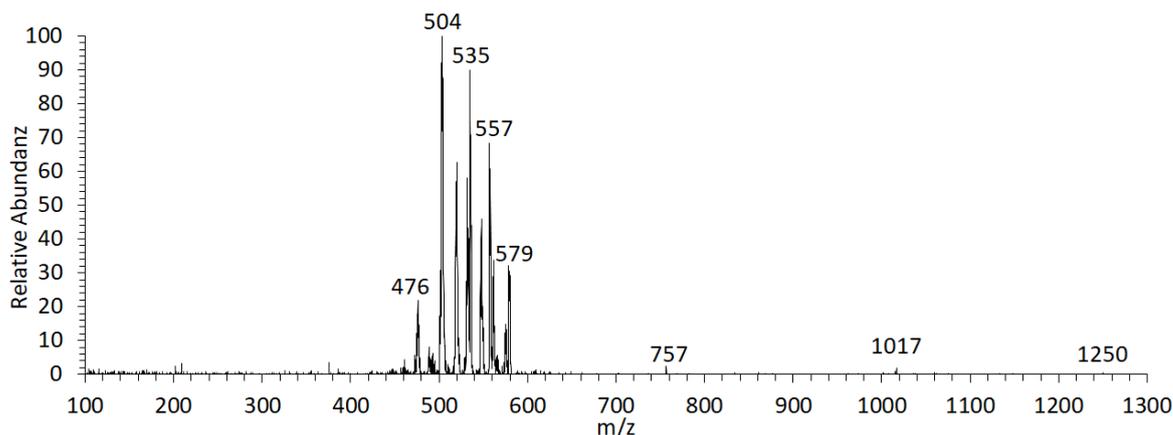


Abbildung 29. Produktions-Spektrum von 1250 Da (2,39 min) des *Amphidinium carterae* Stamms ACRN02, bezeichnet als U5. Durch die großen Unterschiede zu üblichen Amphidinol-Spektren konnte festgestellt werden, dass es sich bei dieser Substanz um kein Amphidinol handelt.

U6

U6 ist mit einer Retentionszeit von 2,16 min und einer Masse von 1315 Da die letzte aus dem Stamm ACRN02 detektierte unbekannte Substanz. Das Produktions-Spektrum (Abbildung 30) zeigt einen hohen Peak mit 875 Da, entstanden durch den C-1'/C-1-Bindungsbruch. Die Differenz zwischen dem Molekülion und diesem Peak beträgt 440 Da, was für den Neutralverlust-Typ 5 spricht (vgl. Tabelle 15). Dieser Typ charakterisiert den lipophilen Arm und Tetrahydropyranring B und wird ebenfalls durch das Fragment mit der Größe von 463 Da bestätigt. Der NL-Typ 5 tritt sonst lediglich bei Luteophanol B/C auf, welches ebenfalls in diesem Stamm detektiert wurde (zur Struktur siehe Anhang, Anlage 3, Abbildung 49). Zur Charakterisierung des hydrophilen Arms kann das Paarfragment 1069 Da/629 Da verwendet werden, welches ebenfalls bei LPB/C auftaucht. Dieser Teil wird jedoch üblicherweise auch durch Fragmente wie 925, 573 und 485 Da beschrieben, von denen aber bei U6 lediglich Fragmente mit einer Masse von 925 und 481 Da detektiert wurden. Bei letzterem könnte es sich um die gesuchte Masse 485 Da handeln, vorausgesetzt es verliert vier Wasserstoffatome, z.B. durch die Bildung von zwei Doppelbindungen. Des Weiteren treten im Spektrum von U6 mehrere Fragmente mit einer Masse um 500 Da auf, welche bei LPB/LPC nicht auftauchen und auch nicht erklärt werden können. Aus den genannten Gründen kann ein Strukturvorschlag nur für einen Teil von U5 gemacht werden. Der unbestimmte Teil hat eine Masse von 247 Da. Der Vergleich der Molekülmassen von U6 und LPB/LPC zeigt eine Differenz von 28 Da, was für eine Verringerung um zwei Methylenheiten spricht. Sollte dies der Fall sein, müsste der unbestimmte Teil die Summenformel $C_{12}H_{23}O_5$ besitzen (resultierend aus der Summenformel $C_{67}H_{116}O_{25}$ für LPC/D und

der Summenformel $C_{53}H_{89}O_{20}$ des bestimmten Teils). Aufgrund der Auswertung des Massenspektrums konnte U6 als neues Amphidinol bestätigt werden.

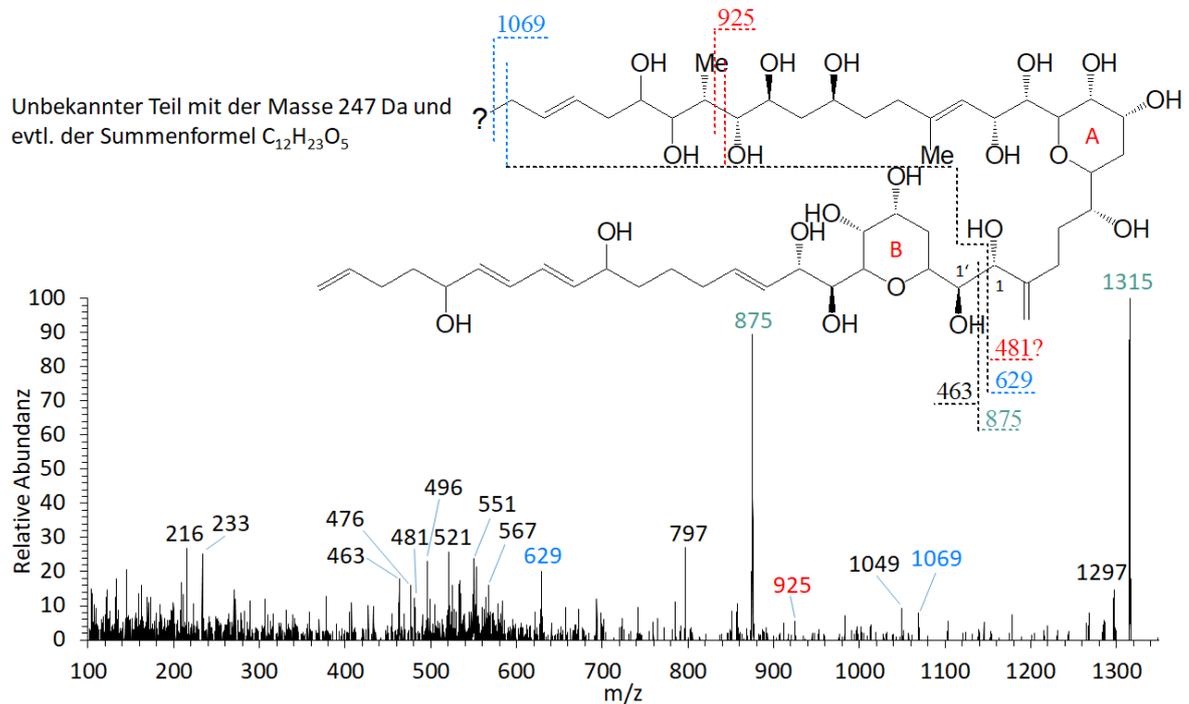


Abbildung 30. Produktions-Spektrum von 1315 Da (2,16 min) des *Amphidinium carterae* Stamms ACRN02, bezeichnet als U6. Dazu entsprechendes Fragmentierungsschema und ein Ansatz für einen Strukturvorschlag. Der nicht bestimmbarer Teil hat die Masse 247 Da und wahrscheinlich die Summenformel $C_{12}H_{23}O_5$.

U7

U7 stellt mit einer Retentionszeit von 2,17 min und einer Masse von 1346 Da die erste unbekannt Substanz der Stämme CCMP1314A und CCMP1314B dar. Das Produktions-Spektrum (Abbildung 31) weist große Übereinstimmungen mit dem von Amphidinol 18 auf (siehe Abschnitt 3.2.2, Abbildung 19), welches ebenfalls in diesen Stämmen detektiert wurde. Die Übereinstimmungen liegen sowohl in den hohen Abundanzen von Fragmenten, welche neben der Carbonylgruppe im hydrophilen Arm entstehen (hier 1127 Da und 1069 Da), als auch in der geringen Abundanz des durch den C-1'/C-1-Bindungsbruch entstehenden Fragments (hier 945 Da). Die Massendifferenz zwischen U7 und AM18 liegt bei 36 Da, was durch das Fehlen von H_4O_2 erklärt werden kann. Dies würde sich durch zwei fehlende Hydroxygruppen und zwei zusätzliche Doppelbindungen auf die Struktur auswirken. Eine logische Strukturfindung ist anhand des Spektrums jedoch nicht möglich: Es wurde versucht, die Peaks des Produktions-Spektrums von U7 der Struktur von AM18 zuzuordnen (Abbildung 31). Die schwarz dargestellten Fragmente stellen dabei die Fragmente von AM18 dar, während die rot

dargestellten Fragmente jene von U7 darstellen. Bei der Betrachtung der Fragmente am C-1'/C-1-Bindungsbruch kann eine Differenz von 18 Da zu den Fragmenten von AM18 festgestellt werden. Dies würde bedeuten, dass in dem Teil zwischen C-1 und C-43 nur eine Hydroxylgruppe fehlt und eine zusätzliche Doppelbindung auftritt. Diese Strukturänderungen müssten zwischen C-1 und C-29 auftreten. Die zweite fehlende Hydroxylgruppe und zusätzliche Doppelbindung müsste dementsprechend in dem C-1'-C24'-Teil auftreten. Dafür sprechen ebenfalls die Fragmente mit der Größe von 1127 Da und 1069 Da, während die Fragmente mit der Größe 1087 Da sowie 441 Da dagegen sprechen. Für die Amphidinol 18-ähnliche Substanz konnte somit kein Strukturvorschlag gemacht werden.

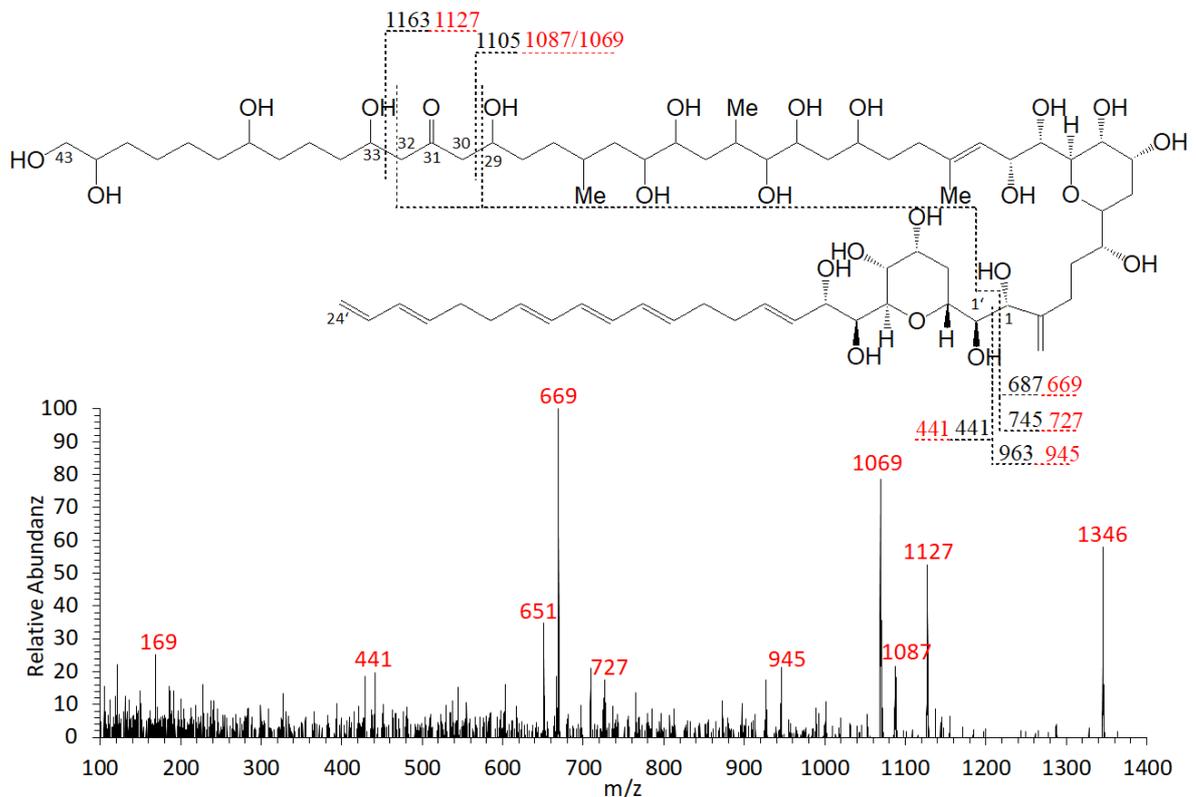


Abbildung 31. Produktions-Spektrum von 1346 Da (2,17 min) der *Amphidinium carterae* Stämme CCMP1314A und CCMP1314B, bezeichnet als U7. Es wurde versucht, die Fragmente anhand der Struktur des um 36 Da schwereren AM18 zuzuordnen. Dabei sind die Fragmente von AM18 schwarz dargestellt, während die U7-Fragmente rot dargestellt sind.

U8

U8 besitzt die gleiche Masse von 1346 Da wie U7, hat jedoch eine deutlich spätere Retentionszeit von 2,72 min. Während sich die beiden Spektren in großen Teilen gleichen, liegt bei U8 ein entscheidender Unterschied in dem Fehlen des 1087er- und des 441er-Fragments vor (Abbildung 32). Dadurch kann die bei U7 angesprochene Verteilung der

Hydroxylgruppen und Doppelbindungen auf diese Substanz angewendet werden: Eine Hydroxylgruppe fehlt in dem Teil zwischen C-1' und C-24', während die andere Hydroxylgruppe im Teil zwischen C-1 und C-29 fehlt. Bei dem hier gewählten Strukturvorschlag wurden die Hydroxylgruppen an C-7' und C-17 entfernt und Doppelbindungen zwischen C-7'/C-8' und C-16/C-17 hinzugefügt. Dabei sei jedoch angemerkt, dass es sich um ein theoretisches Modell handelt und die Umgebungen der Tetrahydropyranringe hochkonserviert sind, weshalb an diesen Stellen in der Regel keine Abweichungen zu beobachten sind.

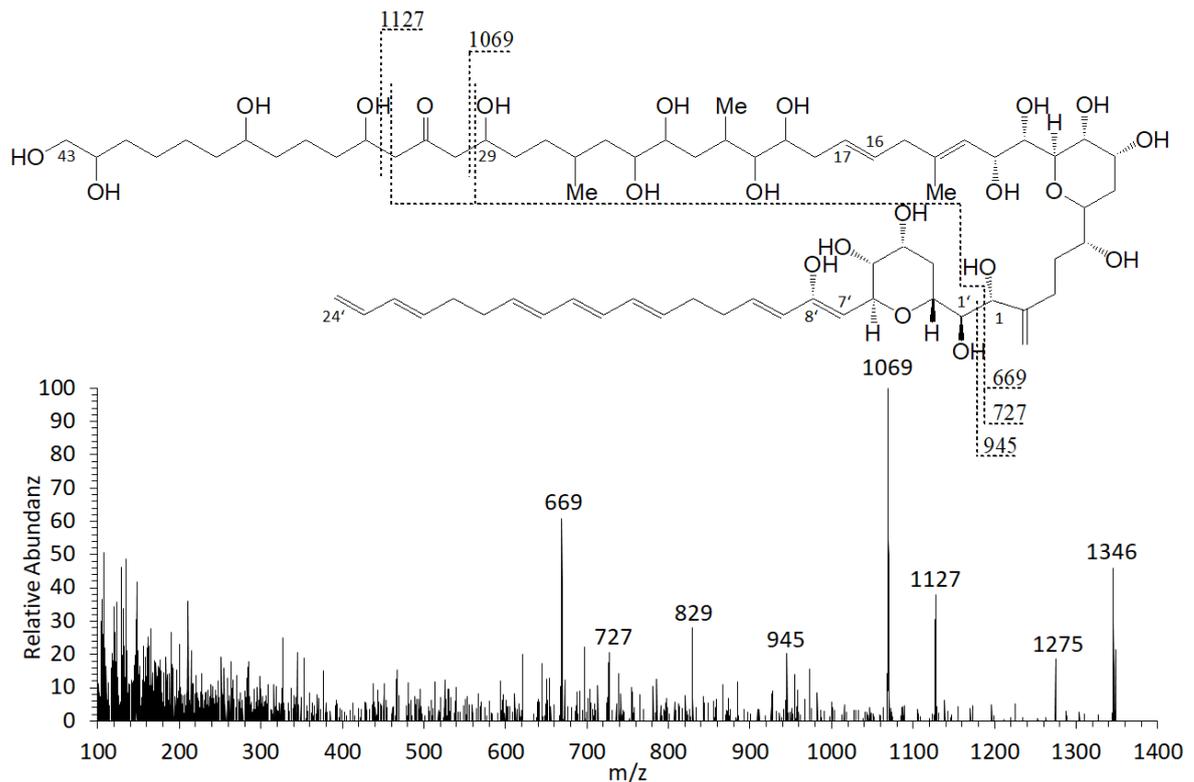


Abbildung 32. Produktionen-Spektrum von 1346 Da (2,72 min) der *Amphidinium carterae* Stämme CCMP1314A und CCMP1314B, bezeichnet als U8. Dazu entsprechendes Fragmentierungsschema und Strukturvorschlag. Viele Fragmente konnten zugeordnet werden, nachdem an der ähnlichen AM18-Struktur zwei Hydroxylgruppen entfernt und zwei zusätzliche Doppelbindungen hinzugefügt wurden.

U9

In dem *A. carterae*-Stamm CCMP1314B konnte eine dritte Substanz mit der Masse von 1346 Da detektiert werden, welche als U9 bezeichnet wurde und eine Retentionszeit von 3,02 min besitzt. U9 unterscheidet sich jedoch deutlich von U7 und U8, dessen Spektren sehr dem von AM18 ähneln und von den Bindungsbrüchen an der Carbonylverbindung geprägt sind. Ein Fragment mit der Masse von 927 Da stellt bei U9 neben

dem Molekölion den höchsten Peak dar und weist darauf hin, dass keine Carbonylverbindung vorhanden ist (Abbildung 33). Dennoch liegt eine strukturelle Nähe zu AM18 nahe, da auch hier die Massendifferenz 36 Da beträgt und beispielsweise durch das fehlende Sauerstoffatom der Carbonylgruppe, einer fehlenden Hydroxygruppe und drei zusätzlichen Doppelbindungen erklärt werden kann. Die Differenz zwischen dem Fragment mit 927 Da und der Molekülmasse liegt bei 419 Da und entspricht damit dem NL-Typ 3, welcher beispielsweise auch in AM18 vorkommt. Dies bedeutet, dass die strukturellen Änderungen gegenüber AM18 in dem hydrophilen Arm liegen müssen. Außerdem kann das in U7 und U8 detektierte Fragment mit der Masse 669 Da detektiert werden, womit Rückschlüsse über einen Teil des hydrophilen Arms geschlossen werden können. Dieses Fragment tritt hier jedoch in vergleichsweise geringer Abundanz auf, was auf die fehlende Carbonylgruppe zurückzuführen ist. Das entsprechende Paarfragment zu 669 Da konnte ebenfalls detektiert werden ($669 \text{ Da} + 418 \text{ Da} = 1087 \text{ Da}$). Der Strukturvorschlag in Abbildung 33 zeigt, wie das Molekül aussehen könnte. In diesem Fall wurde die Carbonylgruppe an C-31 und die Hydroxylgruppe an C-17 entfernt und an diesen Stellen eine Doppelbindung zum benachbarten C-Atom hinzugefügt. Die dritte Doppelbindung wurde beispielhaft zwischen C-34 und C-35 hinzugefügt. Wie auch U7 und U8 scheint es sich bei U9 um neues Amphidinol zu handeln, welches auf dem Aufbau von AM18 basiert.

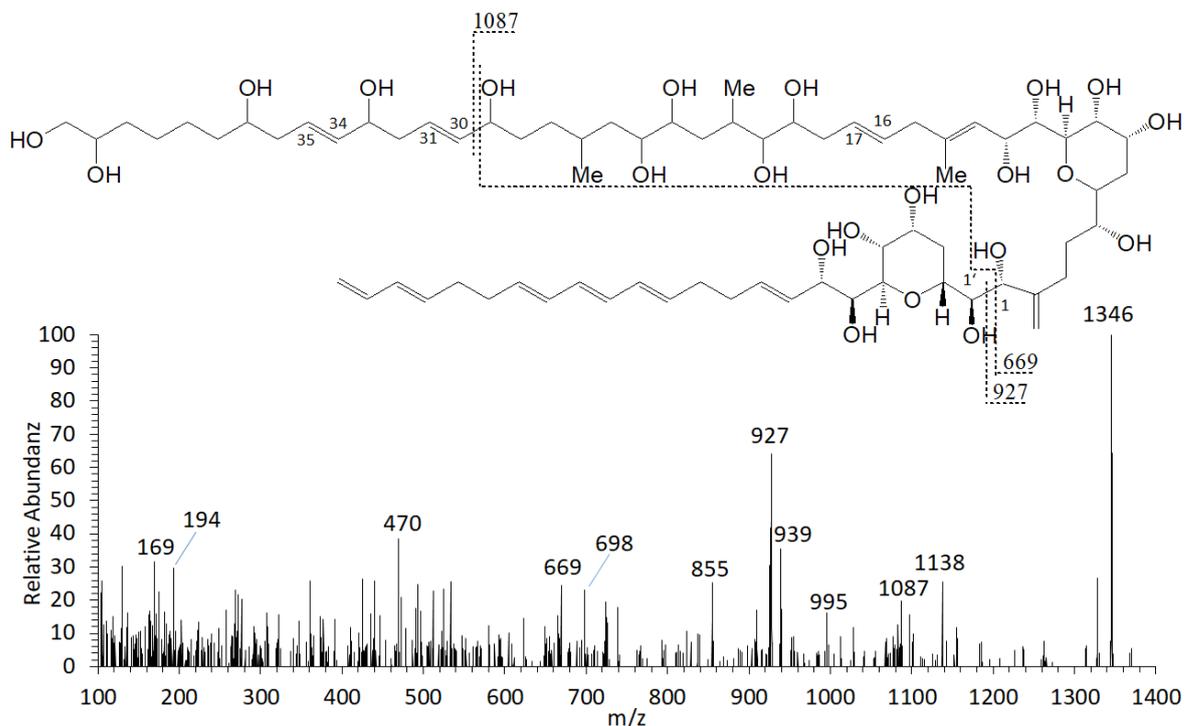


Abbildung 33. Produktionen-Spektrum von 1346 Da (3,02 min) des *Amphidinium carterae* Stamms CCMP1314B, bezeichnet als U9. Dazu entsprechendes Fragmentierungsschema und Strukturvorschlag.

U10

Insgesamt konnten vier unbekannte Substanzen mit einer Masse von 1364 Da in den Stämmen CCMP1314A und/oder CCMP1314B mit unterschiedlichen Retentionszeiten gefunden werden, welche große Ähnlichkeiten zu AM18 aufweisen. Die erste Substanz hat eine Retentionszeit von 2,19 min und wurde als U10 bezeichnet. Das Produktions-Spektrum (Abbildung 34) weist eine geringe Intensität des C-1'/C-1-Fragments (945 Da) und hohe Intensitäten von Fragmenten >1000 Da auf, wodurch auf eine Carbonylgruppe geschlossen werden kann. Die Molekülmasse beträgt 18 Da weniger als die von AM18. Dementsprechend wird von einer fehlenden Hydroxylgruppe und einer zusätzlichen Doppelbindung ausgegangen. Auch alle anderen abundanten Fragmente sind 18 Da leichter als die von AM18, weshalb zunächst von einer ungewollten Fragmentierung in der Quelle ausgegangen wurde. Durch die unterschiedlichen Retentionszeiten von 2,19 min und 2,71 min konnte dies jedoch ausgeschlossen werden. Um eine beispielhafte Struktur darzustellen, wurde erneut die Hydroxylgruppe an C-17 entfernt und eine Doppelbindung zwischen C-16 und C-17 hinzugefügt.

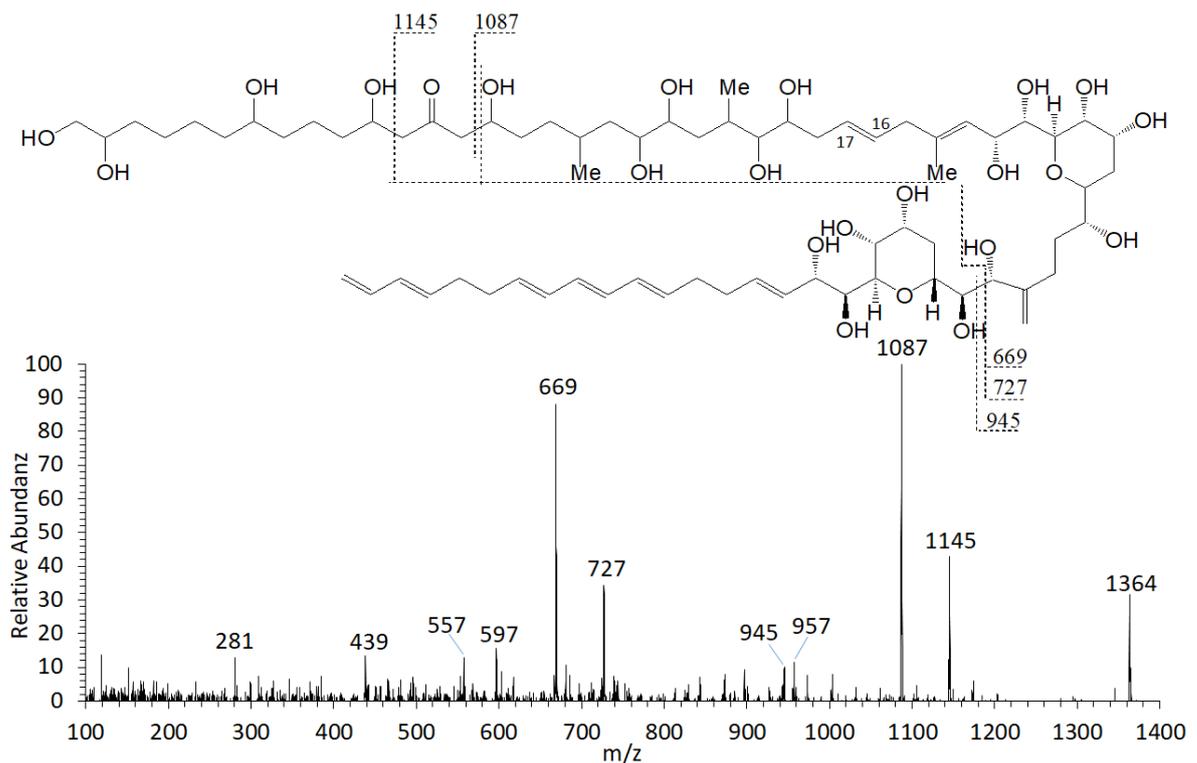


Abbildung 34. Produktions-Spektrum von 1364 Da (2,19 min) der *Amphidinium carterae* Stämme CCMP1314A und CCMP1314B, bezeichnet als U10. Dazu entsprechendes Fragmentierungsschema und Strukturvorschlag.

U11

Die Substanz U11 weist erneut große Ähnlichkeiten mit AM18 auf, hat jedoch im Vergleich zu U10 eine deutlich spätere Retentionszeit von 2,78 min. Erneut kann zu AM18 eine Differenz von 18 Da in der Molekülmasse und in den meisten anderen Fragmenten nachgewiesen werden. Abbildung 35 zeigt das Produktions-Spektrum von U11 sowie die Struktur von AM18. Die Fragmente von AM18 sind dabei schwarz dargestellt, während die entsprechenden Fragmente von U11 rot dargestellt sind. Auffällig dabei ist, dass die Massen des U11-Paarfragments 1105 Da/687 Da mit denen von AM18 übereinstimmen und nicht um eine Masse von 18 Da verringert sind. Dementsprechend hat sich auch die Differenz der großen Fragmente, welche zwischen C-32/C-33 und C-29/C-30 entstehen, um 18 Da verringert (AM18: 1163 Da - 1105 Da = 58 Da; U11: 1145 Da - 1105 Da = 40 Da). Das deutet darauf hin, dass es bei U11 zu einer strukturellen Veränderung zwischen C-29 und C-32 gekommen sein muss. Würde an dieser Stelle jedoch die Carbonylgruppe fehlen, würde es wahrscheinlich nicht zu den hoch abundanten Peaks kommen. Es ist daher nicht möglich, einen nach diesem Muster aufgebauten Strukturvorschlag vorzulegen.

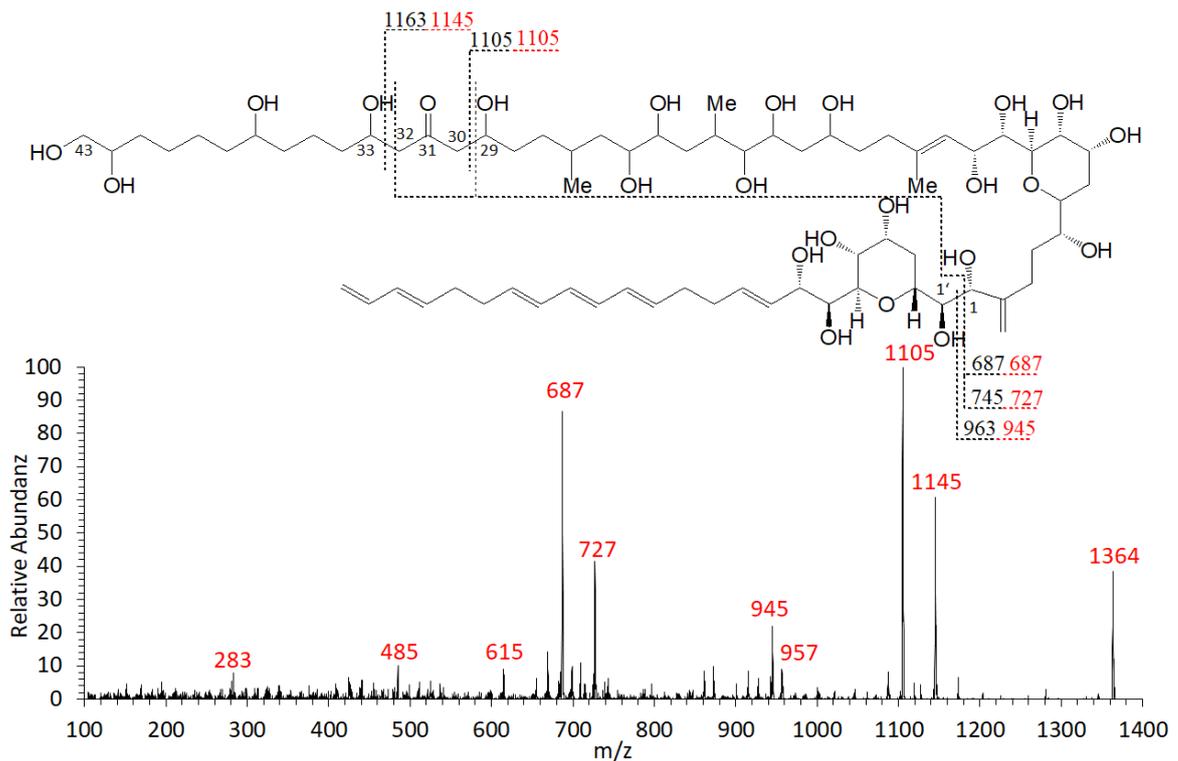


Abbildung 35. Produktions-Spektrum von 1364 Da (2,78 min) der *Amphidinium carterae* Stämme CCMP1314A und CCMP1314B, bezeichnet als U11. Es wurde versucht, die Fragmente anhand der Struktur von AM18 zuzuordnen. Die Fragmente von AM18 sind schwarz dargestellt, während die Fragmente von U11 rot dargestellt sind.

U12

Die Substanz U12 konnte nur in CCMP1314A detektiert werden. Sie hat eine Masse von 1364 Da und eine Retentionszeit von 2,84 min. Während U11 gegenüber AM18 lediglich in dem 1105 Da/687 Da Paarfragment übereinstimmte, stimmt U12 ebenfalls in dem 1163 Da/745 Da-Paarfragment mit AM18 überein. Dennoch ist die Molekülmasse gegenüber AM18 um 18 Da verringert. Diese Abweichung muss dementsprechend in dem Teil zwischen C-33 und C-43 auftreten. In dem hier vorgelegten Strukturvorschlag (Abbildung 36) wurde beispielhaft die Hydroxylgruppe an C-37 entfernt und eine Doppelbindung zwischen C-36 und C-37 hinzugefügt.

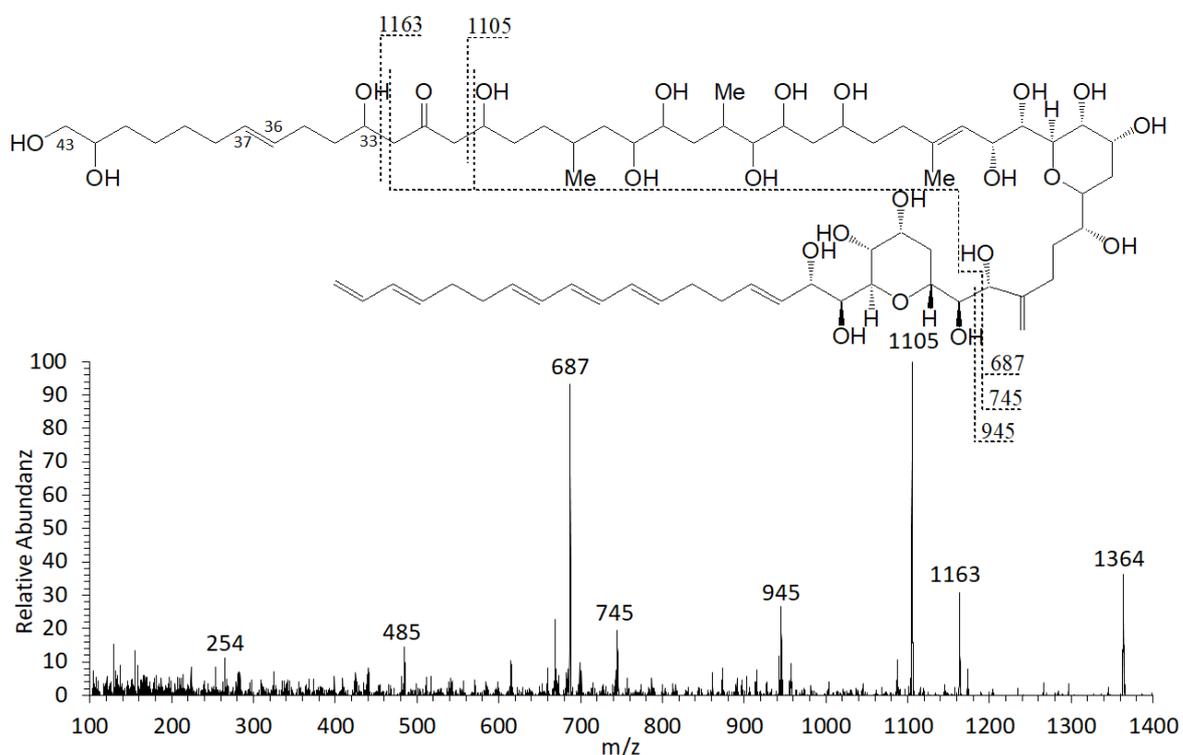


Abbildung 36. Produktions-Spektrum von 1364 Da (2,84 min) des *Amphidinium carterae* Stamms CCMP1314A, bezeichnet als U12. Dazu entsprechendes Fragmentierungsschema und Strukturvorschlag.

U13

Die vierte in CCMP1314A und CCMP1314B entdeckte Substanz mit der Masse 1364 Da besitzt eine Retentionszeit von 2,91 min. Wie das dargestellte Produktions-Spektrum in Abbildung 37 zeigt, fehlt das beim AM18 vorkommende Paarfragment 1163 Da/745 Da völlig, während das Paarfragment 1105 Da/687 Da bei U13 und AM18 identisch ist. Dementsprechend wurde davon ausgegangen, dass die Carbonylgruppe nur in Gegenwart einer räumlich nahen Hydroxylgruppe zu großen Bindungsbrüchen führt. In dem

gezeigten Strukturvorschlag wurde die Hydroxylgruppe an C-33 entfernt und eine Doppelbindung zwischen C-32 und C-33 hinzugefügt. Mit einem C-33/C-34-Bindungsbruch ließe sich so auch das neu erschienene Fragment mit der Masse von 1173 Da erklären. Dabei sei jedoch angemerkt, dass Bindungsbrüche an Kohlenstoffatomen, welche mit anderen Kohlenstoffatomen durch eine Doppelbindung verbunden sind (wie hier C-33 mit C-32), in der Regel nicht auftreten. Da es sich hier aber lediglich um ein Beispiel für eine mögliche Struktur handelt, wurde dem nicht weiter nachgegangen.

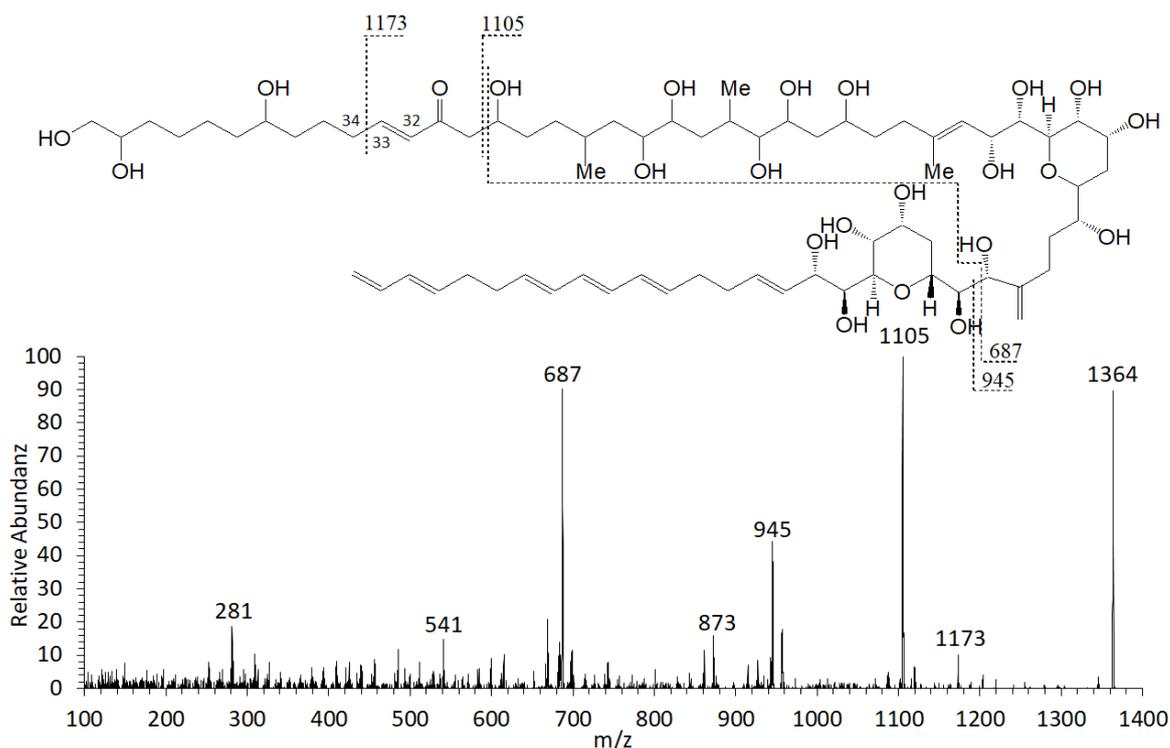


Abbildung 37. Produktionen-Spektrum von 1364 Da (2,91 min) der *Amphidinium carterae* Stämme CCMP1314A und CCMP1314B, bezeichnet als U13. Dazu entsprechendes Fragmentierungsschema und Strukturvorschlag.

U14

U14 stellt die erste von sechs unbekannt Substanzen dar, die in dem *Amphidinium carterae* Stamm DN241EHU detektiert wurden. Sie besitzt eine Masse von 1326 Da und eine Retentionszeit von 2,21 min. Diese Substanz zeigt die gleichen Fragmente wie U7, jedoch auf der Basis von Amphidinol A (zum Spektrum siehe Anhang, Anlage 3, Abbildung 54) statt Amphidinol 18. Das heißt, dass der lipophile Teil zwei C-Atome und vier Doppelbindungen weniger enthält. Die Massendifferenz von U14 zu AMA beträgt 36 Da, wie es ebenfalls zwischen U7 und AM18 beschrieben wurde. Bei der Zuordnung der rot dargestellten Fragmente (Abbildung 38) zu der Struktur von AMA treten die

gleichen Probleme wie bei U7 auf. Die Fragmente am C-1'/C-1-Bindungsbruch von U14 (rot dargestellt) sind 18 Da leichter als die Fragmente von AMA (schwarz dargestellt). Daraus lässt sich schließen, dass zwischen C-1 und C-43, genauer gesagt zwischen C-1 und C-29, eine Hydroxylgruppe fehlt und eine zusätzliche Doppelbindung vorhanden ist. Die zweite fehlende Hydroxylgruppe müsste sich zwischen C-1' und C-22' befinden, was zu den Fragmenten mit den Massen 1107 Da und 1049 Da passen würden. Dann ließen sich jedoch die Fragmente mit den Massen von 1067 Da und 421 Da nicht erklären. Für die Amphidinol A-ähnliche Substanz konnte somit kein Strukturvorschlag gemacht werden.

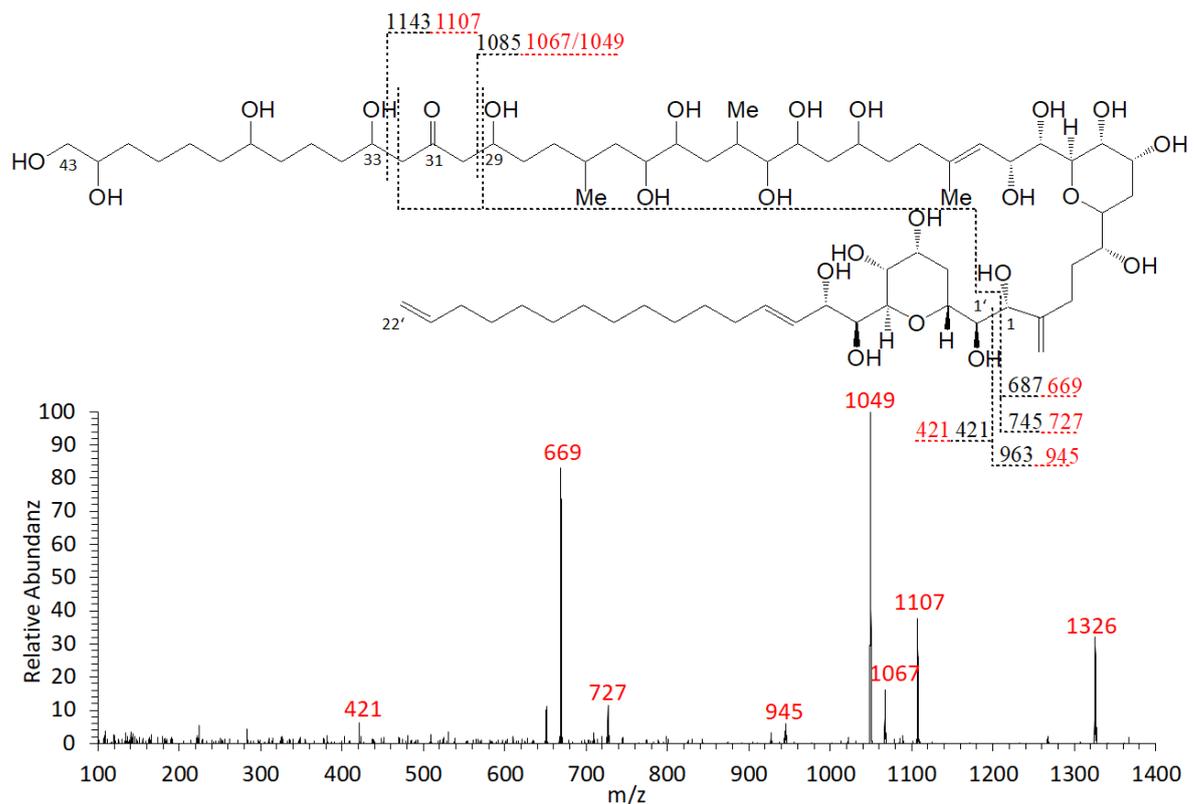


Abbildung 38. Produktions-Spektrum von 1326 Da (2,21 min) des *Amphidinium carterae* Stamms DN241EHU, bezeichnet als U14. Es wurde versucht, die Fragmente anhand der Struktur und dem Fragmentierungsschema von AMA zuzuordnen. Dabei sind die Fragmente von AMA schwarz und die von U14 rot dargestellt.

U15

U15 besitzt wie U14 eine Masse von 1326 Da, hat jedoch eine spätere Retentionszeit von 3,08. Diese Substanz trat nur in geringer Abundanz auf, wodurch das Produktions-Spektrum (Abbildung 39) eine eher schlechte Qualität aufweist. Wie bei U9 lassen die Fragmente vermuten, dass keine Carbonylgruppe vorhanden ist. Gegenüber Amphidinol A könnte U15 folgende Änderungen aufweisen: Die Carbonylgruppe an C-31

fehlt und es tritt eine Doppelbindung zwischen C-30 und C-31 auf, wodurch am C-32/C-33-Bindungsbruch ein Fragment mit der Masse von 727 Da entsteht. Das am C-1'/C-1-Bindungsbruch entstehende Fragment mit der Masse von 927 Da ließe sich erklären, wenn die Hydroxylgruppe an C-37 fehlt und jeweils eine Doppelbindung zwischen C-37/C-36 und C-35/C-34 auftritt.

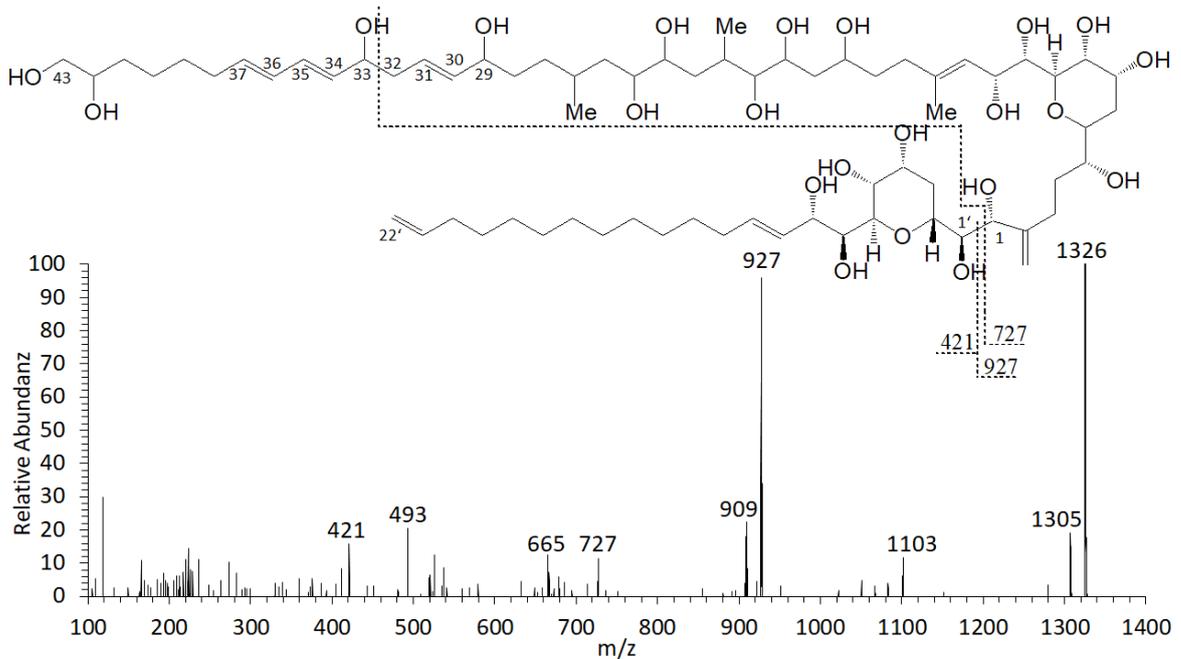


Abbildung 39. Produktions-Spektrum von 1326 Da (3,08 min) des *Amphidinium carterae* Stamms DN241EHU, bezeichnet als U15. Dazu entsprechendes Fragmentierungsschema und Strukturvorschlag.

U16

In den Stämmen CCMP1314A und CCMP1314B wurden zuvor vier Verbindungen beschrieben, die eine um 18 Da verringerte Masse zu AM18 aufwiesen. Auch in dem Stamm DN241EHU traten drei Verbindungen auf, die eine um 18 Da verringerte Masse von AMA, also 1344 Da, aufwiesen. Die erste davon hat eine Retentionszeit von 2,23 min und wird als U16 bezeichnet. Beim direkten Vergleich der Spektren von AMA und U16 (Abbildung 40) fällt auf, dass bis auf das Molekülion stets die selben Fragmente auftreten. Allerdings sind die Intensitäten von Wasserabspaltung und Ursprungsfragment vertauscht. Dementsprechend sind die Ursprungsfragmente in U16 teilweise nur in sehr geringer Abundanz vorhanden. Dies zeigt jedoch, dass die Grundstruktur des Moleküls dieselbe sein muss. Ein Grund, warum die Wasserabspaltungen bei U16 deutlich höhere Abundanzen zeigen als bei AMA, kann nicht gegeben werden. Dementsprechend wird auch kein Beispiel für eine mögliche Struktur von U16 gezeigt. Die Ursprungsfragmen-

te, welche hier nur in teilweise sehr geringer Abundanz auftreten, konnten wegen der guten Qualität des Spektrums detektiert werden. Diese Fragmente könnten auch in vorherigen unbekanntem Substanzen vorhanden sein, konnten jedoch wegen der schlechten Qualität der Spektren nicht ausgemacht werden. Falls dies der Fall sein sollte, könnten daraus weitere Informationen über die mögliche Struktur der unbekanntem Substanzen gewonnen werden.

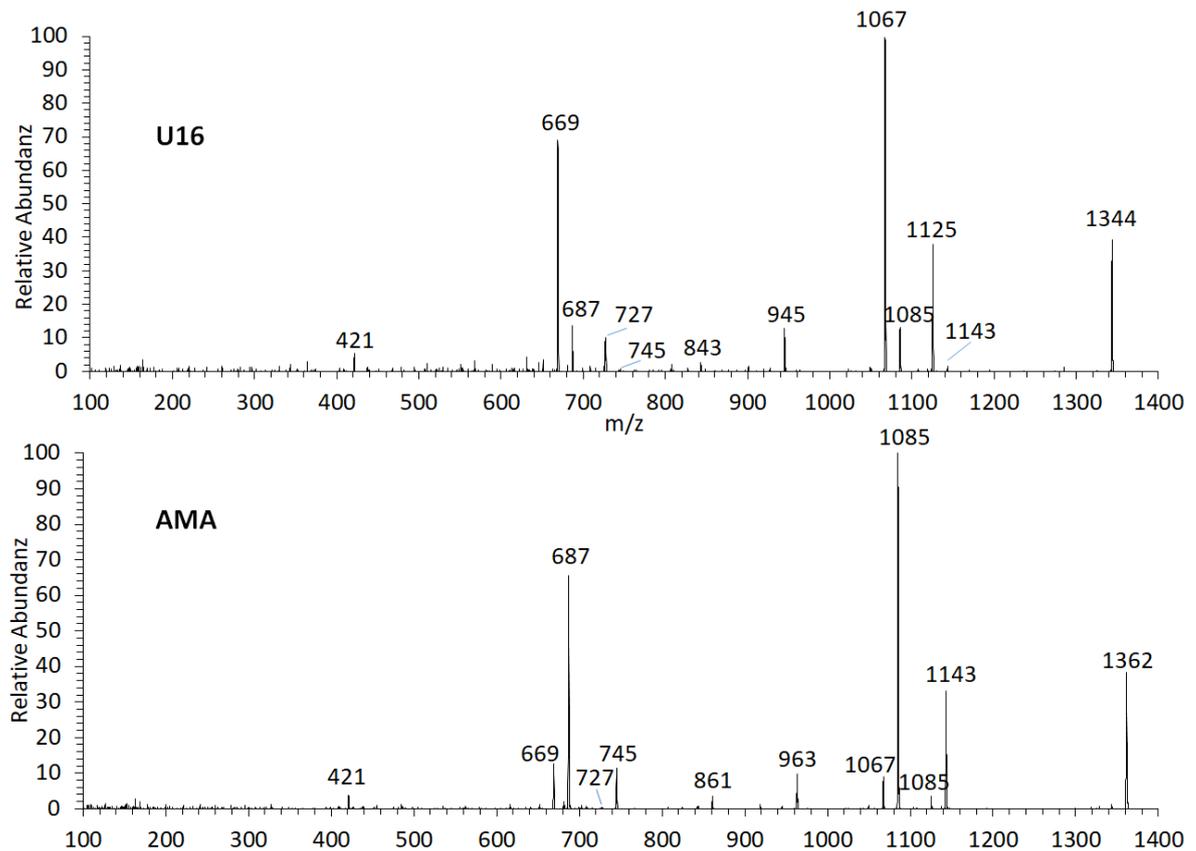


Abbildung 40. Produktions-Spektrum von 1344 Da (2,23 min) des *Amphidinium carterae* Stamms DN241EHU, bezeichnet als U16.

U17

U17 besitzt ebenfalls eine Masse von 1344 Da und eine Retentionszeit von 2,83 min. Das Produktions-Spektrum ist in Abbildung 41 dargestellt, dazu die Struktur von AMA inklusive Fragmentierungsschema. Dabei sind die Fragmente von U17 rot und die von AMA schwarz dargestellt. U17 ist ähnlich wie U11 aufgebaut und zeigt gleiche Eigenschaften, die einen Strukturvorschlag erschweren: Während in den meisten Fragmenten eine Differenz von 18 Da zu AMA nachgewiesen werden kann, stimmt das U17-Paarfragment 1085 Da/687 Da mit dem von AMA überein. Dementsprechend weist die Differenz der Fragmente zwischen der Carbonylgruppe eine Masse von 40 Da statt

58 Da auf, weshalb wahrscheinlich die Carbonylgruppe fehlen würde. Wäre dies der Fall, würde es wahrscheinlich nicht zu den hoch abundanten Peaks mit den Massen 1085 Da und 1125 Da kommen. Dementsprechend ist auch hier kein Strukturvorschlag möglich.

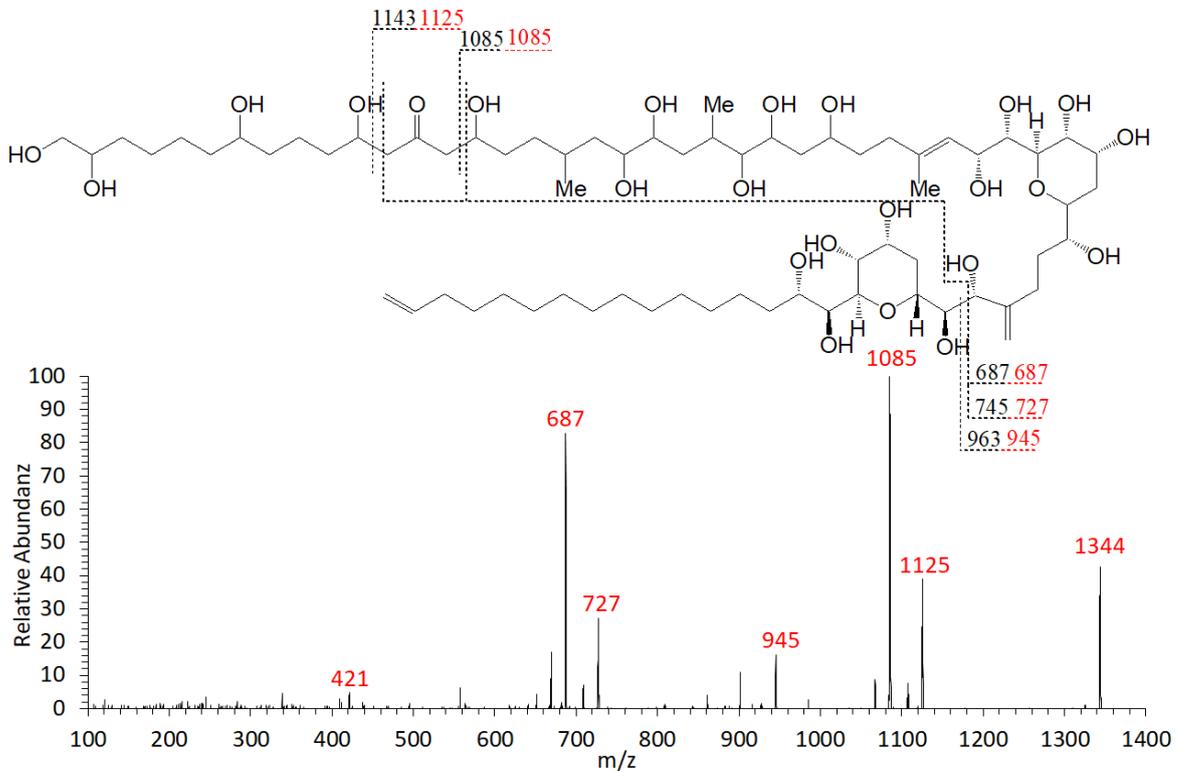


Abbildung 41. Produktions-Spektrum von 1344 Da (2,83 min) des *Amphidinium carterae* Stamms DN241EHU, bezeichnet als U17. Es wurde versucht, die Fragmente anhand der Struktur von AMA zuzuordnen. Die Fragmente von AM18 sind schwarz dargestellt, während die Fragmente von U11 rot dargestellt sind.

U18

U18 stellt die letzte detektierte Substanz dar. Sie hat wie U16 und U17 eine Masse von 1344 Da und wurde im Stamm DN241EHU detektiert. Die Retentionszeit liegt bei 2,97 min. Das Produktions-Spektrum und ein entsprechender Strukturvorschlag sind in Abbildung 42 gezeigt. Dabei können große Übereinstimmungen zu U13 nachgewiesen werden, bei dem das durch den C-32/C-33-Bindungsbruch entstehende Paarfragment fehlt. Dementsprechend wurde für den Strukturvorschlag die Hydroxylgruppe an C-33 entfernt und eine Doppelbindung zwischen C-32 und C-33 hinzugefügt.

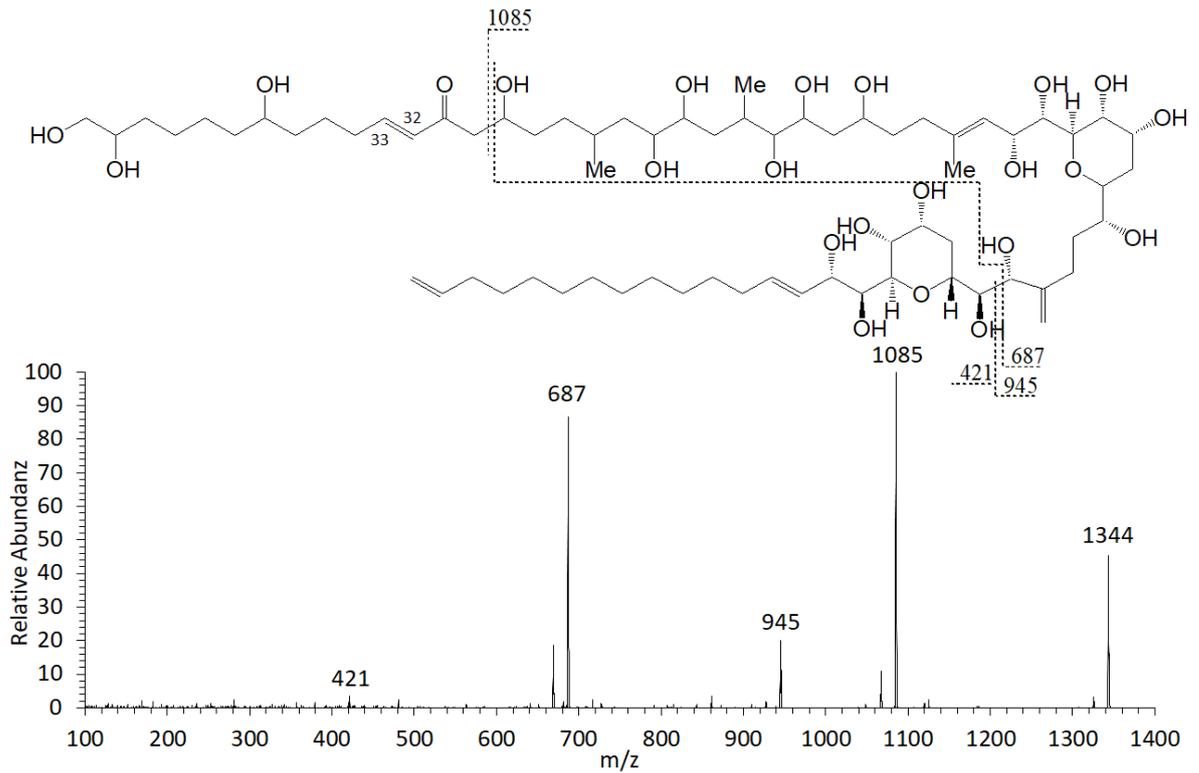


Abbildung 42. Produktions-Spektrum von 1344 Da (2,97 min) des *Amphidinium carterae* Stamm DN241EHU, bezeichnet als U18. Dazu entsprechendes Fragmentierungsschema und Strukturvorschlag.

Zusammenfassung U1-U18

Von den 18 unbekannt Substanzen konnte in zwei Fällen gezeigt werden, dass es sich um kein Amphidinol oder Amphidinol-ähnliches Molekül handelt. Eine Substanz stellt wahrscheinlich ein Produkt durch *in-source*-Fragmentierung (U4) dar, während es sich bei der anderen Substanz um ein vollkommen anderes Molekül handelt (U5). Bei den anderen 16 detektierten Substanzen handelt es sich entweder um gänzlich neue Amphidinole (U1 und U6), glykosilierte Formen (U2 und U3) oder aber um Derivate der Amphidinole 18 und A. Diese Derivate treten nur zusammen mit AM18 oder AMA auf und unterscheiden sich von diesen durch eine Massendifferenz von 18 Da oder 36 Da (U7-U18). Bisher waren noch keine glykosilierten Phycotoxinen bekannt, weshalb die Entdeckung der glykosilierten Amphidinole vielleicht als wichtigstes Ergebnis der Neutralverlust-Scans angesehen werden kann. Glykosilierungen treten bei verschiedenen Biomolekülen auf und sind dabei häufig entscheidend für die biologische Aktivität und die Bindung an ein bestimmtes Zielmolekül (Blanco et al., 2000). Speziell bei einigen Polyketiden, welche in der Tumorforschung verwendet werden, ist die Glykosilierung von besonderer Bedeutung (Olano et al., 1999). Diese neue Entdeckung

ermöglicht in Zukunft genauere und zielgerichtetere Untersuchungen zu biologischen Aktivitäten von Amphidinolen und Verwandten.

3.2.6 Quantifizierung der gefundenen Amphidinole

Nachdem die über die Neutralverlust-Scans detektierten Substanzen teilweise als Amphidinole bestätigt werden konnten, wurden die entsprechenden Übergänge in die entwickelte SRM-Methode eingebaut, um eine finale Messung und abschließende Quantifizierung aller Amphidinole durchzuführen. Folgende Tabelle 17 zeigt die Übergänge der dazu genutzten SRM-Methode. Da gerade bei den Derivaten der Amphidinole 18 und A die gleichen Fragmente entstehen, erfolgte die Identifizierung über die Retentionszeit und nicht über einen zweiten Qualifizierungsübergang.

Tabelle 17. Berechnete SRM-Übergänge von bekannten und neu entdeckten Amphidinolen

Name	Molekülion [Da]	Fragmention [Da]	Name	Molekülion [Da]	Fragmention [Da]
AM01	1512	974	AMDG	1300	768
AM02	1398	1006	CARE	1422	1030
AM03	1350	932	KARA	1480	1082
AM04	1324	932	KARB	1462	1064
AM05	1394	976	LPA	1278	754
AM06	1368	976	LPB	1344	904
AM07	1254	742	LPC	1344	904
AM09	1350	932	LPD	1330	904
AM10	1296	904	LS	1374	976
AM11	1500	988	LSA	1296	904
AM12	1426	914	LSB	1266	754
AM13	1452	914	SP	1266	754
AM14	1288	742	U1	1268	875
AM15	1186	760	U2	1430	1038
AM17	1306	816	U3	1458	1066
AM18	1382	964	U6	1315	875
AM19	1462	946	U7/U8	1346	945
AM20(M)	1346	904	U9	1346	927
AM20(S)	1653	1260	U10-U13	1364	945
AM21	1798	1406	U14	1326	945
AM22	1668	1330	U15	1326	927
AMA	1362	964	U16-U18	1344	945
AMB	1442	946			

Zur Quantifizierung wurde der Luteophanol-D-Standard mit der bekannten Konzentration von 13 ng/ μ l verwendet. Alle Ergebnisse werden dementsprechend in LPD-Äquivalenten dargestellt. Die nach Formel 1 (siehe Abschnitt 2.3) berechnete Nachweisgrenze liegt bei 5,83 pg/ μ l. Werden die Nachweisgrenzen nach Formel 5 (siehe Abschnitt 2.4.4) berechnet und pro Zelle angegeben, ergibt sich für eine Gesamtzellzahl von 10×10^6 Zellen bei einem Extraktionsvolumen von 150 μ l eine Nachweisgrenze von 0,09 fg/Zelle. Dies trifft für die Stämme CCMP1314B, ACRN02, ACRN03 und DN241EHU zu. Durch die deutlich höhere Zellzahl des Stamms CCMP1314A (siehe Tabelle 2, Abschnitt 2.1.2) liegt die Nachweisgrenze in diesem Fall bei 0,06 fg/Zelle. Die im Alfred-Wegener-Institut kultivierten Stämme aus Mexiko wurden in 200 μ l Methanol extrahiert. Zusätzlich waren die Zellzahlen deutlich niedriger als die der spanischen Stämme (siehe Tabelle 3, Abschnitt 2.1.2), sodass hier Nachweisgrenzen von 0,10 fg/Zelle (AA39), 0,29 fg/Zelle (AA40) und 1,62 fg/Zelle (AA60) berechnet werden konnten. Da für den als Pellet gelieferten Stamm A01BR keine Zellzahlen bekannt sind, konnte die Nachweisgrenze hier lediglich mit 5,83 pg/ μ l angegeben werden. Abbildung 43 zeigt die berechneten Amphidinolgesamtgehalte der untersuchten *Amphidinium*-Extrakte. Die Rohdaten der Quantifizierung sind im Anhang (Anlage 4, Tabelle 19) hinterlegt.

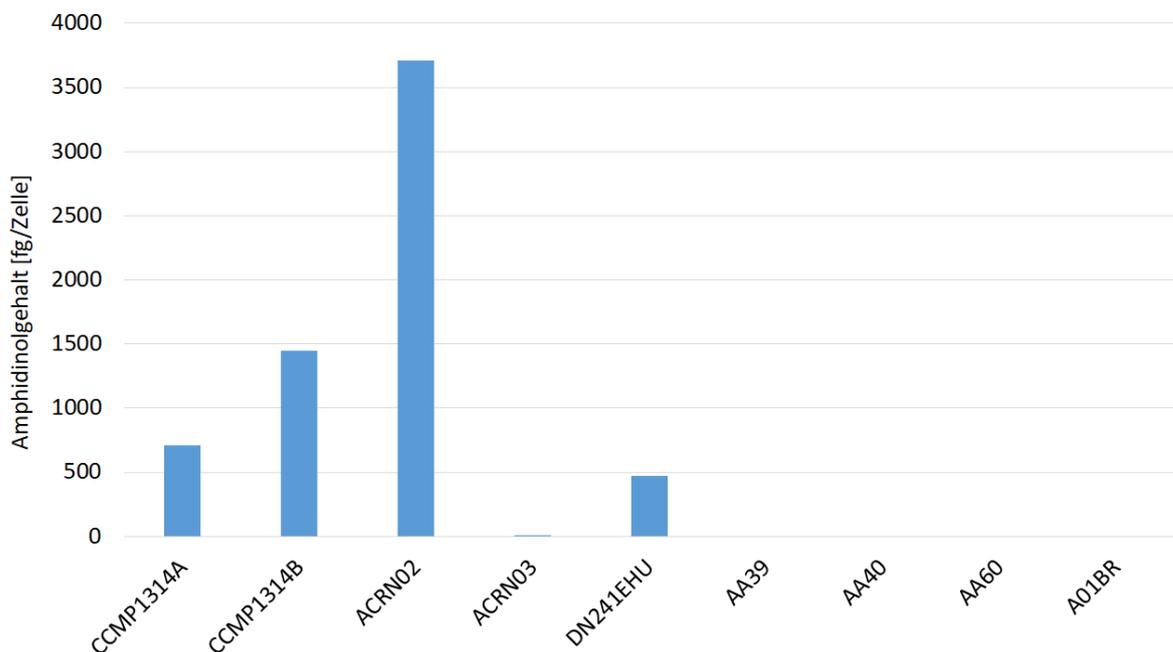


Abbildung 43. Berechnete Amphidinolgesamtgehalte verschiedener *Amphidinium*-Extrakte

Insgesamt wurden in fünf von neun untersuchten Stämmen Amphidinole gefunden. Dabei handelt es sich um die Stämme CCMP1314A, CCMP1314B, ACRN02, ACRN03 und DN241EHU. Ein maximaler Amphidinolgehalt konnte in dem Stamm ACRN02 mit insgesamt 3710 fg/Zelle detektiert werden, gefolgt von CCMP1314B mit 1451 fg/Zelle, CCMP1314A mit 708 fg/Zelle, DN241EHU mit 474 fg/Zelle und ACRN03 mit 3 fg/Zelle. Keine Amphidinole konnten hingegen in den Stämmen AA39, AA40, AA60 und A01BR detektiert werden. Die Stämme AA39 und AA60 wurden in einer bisher nicht veröffentlichten Toxizitätsstudie von Lorena Durán aus Mexiko untersucht. Dabei zeigte sich, dass vor allem AA60 eine ausgeprägte Toxizität gegenüber der Cryptophyceae *Rhodomonas salinas* aufwies, was für eine lytische Aktivität spricht (Ma et al., 2011), welche u.A. den Amphidinen zugesprochen wird (Mooney et al., 2010). Dennoch konnten in dem Pelletextrakt keine Amphidinole detektiert werden, weshalb zusätzlich der nach der Pelletierung entstandene Überstand extrahiert und auf Amphidinole untersucht wurde. Auch in diesem wurden keine Amphidinole gefunden. Dies liegt wahrscheinlich an dem schlechten Zustand, in dem sich die Kultur während der Extraktion befand. Die Zellen befanden sich in der späten stationären Phase und lagen zudem nur in geringer Zahl vor (vgl. Tabelle 3, Abschnitt 2.1.2). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die entwickelte Neutralverlust-Methode nicht alle Amphidinole abdeckt und in diesem Stamm bisher unbekannte Neutralverlust-Typen vorkommen. Durch eine entsprechende Messung im Fullscan-Modus, welcher den für Amphidinole üblichen Massenbereich von 1100-1700 Da abdeckte, konnte dies jedoch widerlegt werden. Eine letzte Möglichkeit stellt die Präsenz anderer lytischer Komponenten dar, welche in AA60 auftreten und nicht der Gruppe der Amphidinole angehören. Mit einer Messung eines Extraktes, welcher aus mindestens 10×10^6 Zellen einer Kultur in der frühen stationären Phase gewonnen wurde, könnten diese Fragen geklärt und die Problematik weiter untersucht werden. Zu den Stämmen AA40 und A01BR liegen keine Berichte über lytische Aktivität vor, sodass in diesen Fällen nicht zwangsweise mit einer Detektion von Amphidinen gerechnet wurde.

Bei Betrachtung der Amphidinolprofile der positiv-getesteten Stämme (Abbildung 44) ist in den meisten Fällen zu erkennen, dass ein oder zwei Amphidinole den Hauptanteil ausmachen und die restlichen Amphidinole nur in geringer Menge auftauchen.

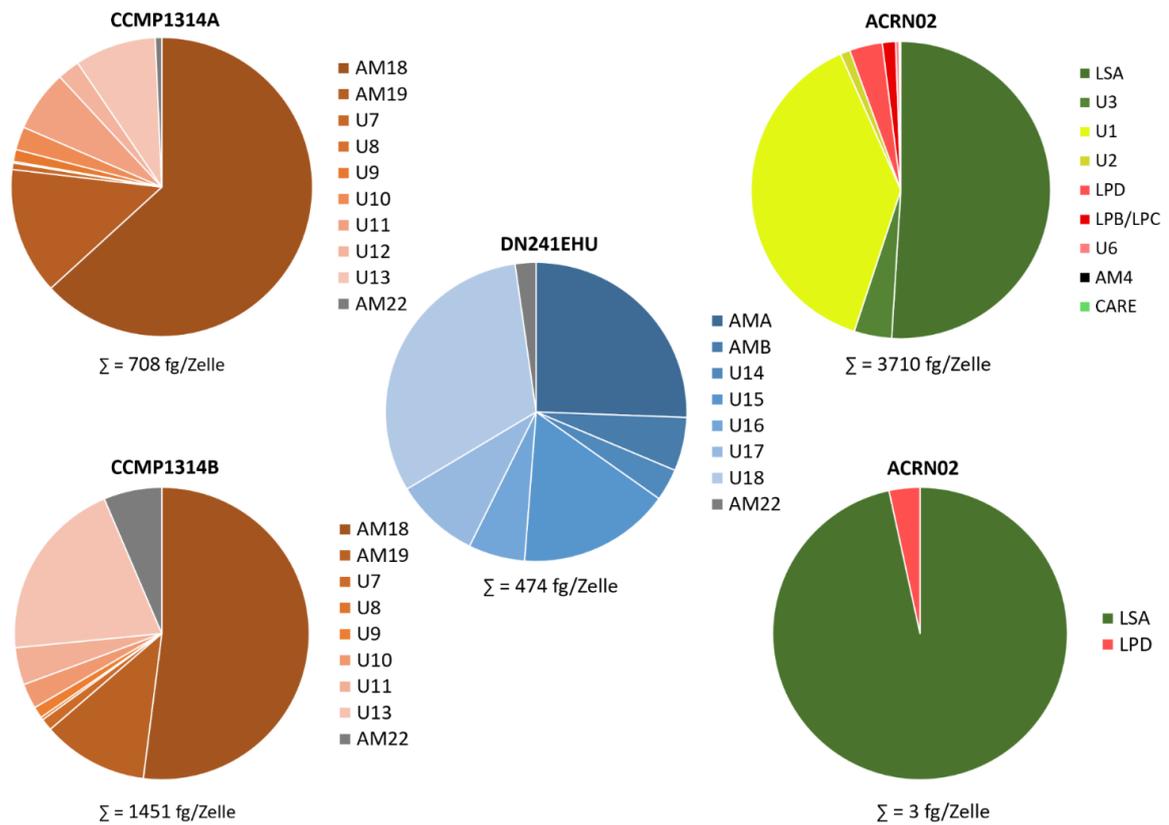


Abbildung 44. Amphidinolprofile der *Amphidinium carterae*-Stämme CCMP1314A/B, DN241EHU, ACRN02 und ACRN03

So machen in den Stämmen CCMP1314A und CCMP1314B Amphidinol 18 und 19 zusammen ca. 75 % (CCMP1314A, entspricht 544 fg/Zelle) bzw. ca. 65 % (CCMP1314B, entspricht 924 fg/Zelle) des Gesamtamphidinolgehalts aus. Der restliche Anteil setzt sich hauptsächlich aus den AM18-ähnlichen unbekannt Amphidinolen mit einer verringerten Masse von 18 Da oder 36 Da zusammen, wobei U13 den größten Teil einnimmt. Außerdem konnte Amphidinol 22 mit einem Anteil von 0,7 % in CCMP1314A und 6,4 % in CCMP1314B detektiert werden. Das Auftreten von AM18, AM19 und AM22 in dem Stamm CCMP1314 wurde bereits von Martínez et al. (2019) beschrieben. Dort wurde ebenfalls von anderen Amphidinol-artigen Komponenten berichtet, bei denen es sich wahrscheinlich um die hier detektierten Substanzen U7-U13 handelt. Die Kulturen CCMP1314A und CCMP1314B wurden beide mithilfe des gleichen Stamms CCMP1314 gezüchtet, weshalb eine Unterscheidung sowohl in den Gesamttoxingehalten als auch beispielsweise in den AM22-Gehältern sonderbar scheint. Ein Grund dafür könnten Abbau- und Verdampfungsprozesse während der Nutzung und Lagerung der Proben sein: Die gelieferten Rückstände von CCMP1314A wurden direkt nach Ankunft in Methanol gelöst und für mehrere Monate verwendet, während die Rückstände von CCMP1314B erst wenige Wochen vor der Fertigstellung dieser Arbeit gelöst wurden

und deutlich seltener für Messungen verwendet wurden.

In dem *Amphidinium carterae*-Stamm DN241EHU konnten bei einer Analyse durch Abreu et al. (2019) bereits AMA und AMB nachgewiesen werden. Diese Amphidinole wurden auch in den hier durchgeführten Messungen mit ca. 25 % bzw. 6 % am Gesamtamphidinolanteil detektiert. Zusätzlich konnten AM22 mit 11 fg/Zelle (ca. 2 %) sowie die unbekanntenen Amphidinole 14-18, welche strukturelle Ähnlichkeiten zu AMA aufweisen und 18 Da oder 36 Da leichter sind, nachgewiesen werden. Besonders der hohe Gehalt an U18 sticht dabei heraus, welcher mit etwa 30 % den größten Teil des Amphidinolprofils ausmacht.

Der Stamm ACRN02 zeigt das abwechslungsreichste Amphidinolprofil. Die Hauptanteile machen Lingshuiol A und U1 mit zusammen fast 90 % aus, während die jeweiligen glykosilierten Formen U3 und U2 in deutlich geringerer Abundanz vorkommen (U3: 4 %, U2: 1 %). Zusätzlich konnten die Luteophanole D und B/C sowie U6, eine LPB/LPC-ähnliche Substanz, nachgewiesen werden. Die restlichen in sehr geringer Menge auftretenden Substanzen (zusammen <1 %) konnten nicht sicher durch Produktionenspektren identifiziert werden, jedoch lassen Molekülmassen und einige Fragmentpeaks auf Amphidinol 4 und Carteraol E schließen. Dies waren die ersten Untersuchungen zu dem *A. carterae*-Stamm ACRN02, welcher sich durch eine hohe und diverse Amphidinolproduktion als optimaler Stamm für nachfolgende Forschung auszeichnet.

Im Stamm ACRN03 konnte insgesamt ein Amphidinolgehalt von lediglich 3 fg/Zelle detektiert werden, wovon etwa 97 % auf LSA und etwa 3 % auf LPD entfallen. Dieser Stamm wurde ebenfalls von Molina-Miras et al. (2018) in der Entwicklung eines Bioreaktors genutzt, durch welchen eine besonders hohe Menge an Amphidinen gewonnen werden sollte. Dabei wird von einer hohen Ausbeute von Luteophanol D, Lingshuiol A sowie dem dort neu entdeckten Amphidinol 20(M) berichtet. Diese Toxinproduktion konnte in den hier durchgeführten Messungen nicht bestätigt werden. LSA und LPD ließen sich jedoch in großer Menge in dem zuvor beschriebenen Stamm ACRN02 finden, weshalb der Verdacht auf eine versehentliche Verwechslung der Stämme naheliegt.

Trotz der erfolgreich durchgeführten quantitativen Analyse von Amphidinen sind die erhaltenen Werte nicht zwangsweise repräsentativ und vergleichbar mit zukünftigen Amphidinolgehalten. Für die Quantifizierung wurde ein nicht-zertifizierter Standard genutzt, bei welchem zusätzlich durch falschen Transport Lösemittel verdampft ist. Zwar wurde dieser Volumenverlust und die damit entsprechende Konzentrationsänderung nach bestem Gewissen ausgeglichen, jedoch kann für keine absolute Richtigkeit der finalen Konzentration garantiert werden. Zusätzlich könnte es aufgrund der amphoteren Eigenschaften von Luteophanol D zu Reaktionen mit beispielsweise Gefäßwänden gekommen sein, wodurch eventuell weitere Verluste der Standardsubstanz entstanden.

4 Fazit und Ausblick

Im Rahmen der Ausfahrt mit der RV *Akademik* konnten die in den Vorjahren in bulgarischen Gewässern gefundenen Toxine PTX-2 und YTX erneut detektiert werden. Statt dem erwarteten Fund von Domoinsäure wurden zusätzlich die Pectenotoxine 1 und 11/13 nachgewiesen. Dabei übertreffen die gemessenen Yessotoxin-Gehälter die der anderen Toxine bei Weitem und deuten auf eine Blüte von *P. reticulatum*, *L. polyedrum* oder *G. spinifera* hin. Die gefundenen Toxine traten sowohl in bulgarischen als auch rumänischen Gewässern gleichermaßen auf. Im östlichen Schwarzen Meer wurden zuvor ebenfalls u.A. PTX-1, PTX-2 und YTX detektiert, weshalb von einem ubiquitären Vorkommen im Schwarzen Meer ausgegangen werden kann. Durch die Größenfraktionierung konnte gezeigt werden, dass mit sinkender Fraktionsgröße der Toxingehalt steigt, da viele toxinproduzierende Phytoplanktonarten eine Größe zwischen 40 und 150 μm aufweisen. Dementsprechend wurden die Toxingehalte in der größten Fraktion ($>200 \mu\text{m}$) durch Transportvektoren erklärt. In den Messungen der AZA-Filter-Extrakte konnten keine Azaspirosäuren detektiert werden, obwohl wegen verschiedener Umweltparameter und der geographischen Lage ein Auftreten als wahrscheinlich galt.

Durch diese Arbeit konnten erstmalig Daten zur potentiell von Schalentier-Toxinen ausgehenden Gefahr in rumänischen Gewässern erhoben werden. Auch in bulgarischen Gewässern konnte durch die Untersuchungen die potentielle Gefahr für Aquakultur, Fischerei und Gesundheit bestätigt werden. Dabei ist jedoch anzumerken, dass in dieser Arbeit lediglich das Plankton auf jene Phycotoxine untersucht wurde. Ob und wie stark diese Toxine jedoch akkumuliert in Muscheln auftreten, bleibt offen und muss durch weitere Untersuchungen und wiederholtes Monitoring überprüft werden. Außerdem steht die taxonomische Untersuchung der Planktonproben aus, durch die Zusammenhänge der auftretenden Toxine in den unterschiedlichen Fraktionen sowie ein Auftreten von AZA-produzierenden Arten genauer beurteilt werden können.

Darüber hinaus konnte erfolgreich eine LC-MS/MS-basierte Methode zur Analyse von Amphidinolen entwickelt werden. Durch Interpretation gegebener Spektren aus der Literatur und eigener Messungen mit dem Luteophanol-D-Standard wurde ein Fragmentierungsschema für Amphidinole erstellt, in welchem der C-1'/C-1-Bindungsbruch als wichtiges Fragment bei allen Amphidinolen auftritt. Die durch diesen Bindungsbruch entstehenden Fragmente sind zusammen mit den Molekülmassen charakteristisch für ein jeweiliges Amphidinol und ermöglichen so über den SRM-Scan eine präzise Identi-

fizierung und Quantifizierung. Dabei kann diese Methode stets um neue Amphidinole erweitert werden, die beispielsweise durch Verwendung der entwickelten Neutralverlust-Methode entdeckt wurden. Sowohl die SRM- als auch die Neutralverlustmethode wurden schließlich hinsichtlich chromatographischer und massenspektrometrischer Parameter optimiert. Zusätzlich wurden unter Verwendung der NL-Methode in den vorliegenden Proben 16 neue Substanzen detektiert, die typische Eigenschaften von Amphidinolen aufweisen. Darunter befinden sich Derivate bekannter Amphidinole, gänzlich neue Amphidinole und glykosilierte Formen. Dies stellt den ersten Nachweis von glykosilierten Phycotoxinen dar. Durch die entwickelten Methoden zur LC-MS/MS-basierten Analyse von Amphidinolen wird die zukünftige Forschung zu diesem Thema deutlich erleichtert. Beispielsweise können Assoziationen zwischen Massensterben von Fischen und dem Auftreten von Dinoflagellaten der Gattung *Amphidinium* in Zukunft durch Analyse entsprechender Proben auf Amphidinole bestätigt oder widerlegt werden. Neue Amphidinole können detektiert werden und hinsichtlich ihrer anticancerogenen, antimikrobiellen, antifungalen und weiteren pharmazeutisch interessanten Wirkungen untersucht werden. Bei den hier durchgeführten Messungen handelt es sich um die erste quantitative Analyse von Amphidinol-Gehalten mittels LC-MS/MS. Mit den entwickelten Methoden lassen sich in Zukunft unbekannte Proben schnell und mit relativ wenig Aufwand auf sowohl bekannte als auch unbekannte Amphidinole untersuchen.

Literaturverzeichnis

- Abreu, A. C., Molina-Miras, A., Aguilera-Sáez, L. M., López-Rosales, L., Cerón-García, M. D. C., Sánchez-Mirón, A., Olmo-García, L., Carrasco-Pancorbo, A., García-Camacho, F., Molina-Grima, E. & Fernández, I. (2019): *Production of Amphidinols and Other Bioproducts of Interest by the Marine Microalga Amphidinium carterae Unraveled by Nuclear Magnetic Resonance Metabolomics Approach Coupled to Multivariate Data Analysis*. In: Journal of agricultural and food chemistry, **67**, 34: 9667–9682.
- Anderson, D. (2014): *HABs in a changing world: A perspective on harmful algal blooms, their impacts, and research and management in a dynamic era of climactic and environmental change*. In: Harmful algae 2012 : proceedings of the 15th International Conference on Harmful Algae, **2012**: 3–17.
- Anderson, D. M. [Hrsg.] (1998): *Physiological ecology of harmful algal blooms: With 45 tables ; [proceedings of the NATO Advanced Study Institute on "The Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms", held at the Bermuda Biological Station for Research, Bermuda, USA, May 27 - June 6, 1996]*, NATO ASI series : Series G, Ecological sciences, Bd. Vol. 41. Springer, Berlin and Heidelberg and New York and Barcelona and Budapest and Hong Kong and London and Milan and Paris and Santa Clara and Singapore and Tokyo.
- Baig, H. S., Saifullah, S. M. & Dar, A. (2006): *Occurrence and toxicity of Amphidinium carterae Hulbert in the North Arabian Sea*. In: Harmful Algae, **5**, 2: 133–140.
- Besiktepe, S., Ryabushko, L., Ediger, D., Yilmaz, D., Zenginer, A., Ryabushko, V. & Lee, R. (2008): *Domoic acid production by Pseudo-nitzschia calliantha Lundholm, Moestrup et Hasle (bacillariophyta) isolated from the Black Sea*. In: Harmful Algae, **7**, 4: 438–442.
- Blanco, G., Fernández, E., Fernández, M. J., Braña, A. F., Weissbach, U., Künzel, E., Rohr, J., Méndez, C. & Salas, J. A. (2000): *Characterization of two glycosyltransferases involved in early glycosylation steps during biosynthesis of the antitumor polyketide mithramycin by Streptomyces argillaceus*. In: Molecular & general genetics : MGG, **262**, 6: 991–1000.
- Botana, L. (2008): *Seafood and Freshwater Toxins*, Bd. 20080673. CRC Press.

- Brookes, J. D. & Carey, C. C. (2011): *Ecology. Resilience to blooms*. In: Science (New York, N.Y.), **334**, 6052: 46–47.
- Brooks, B. W., Lazorchak, J. M., Howard, M. D. A., Johnson, M.-V. V., Morton, S. L., Perkins, D. A. K., Reavie, E. D., Scott, G. I., Smith, S. A. & Steevens, J. A. (2016): *Are harmful algal blooms becoming the greatest inland water quality threat to public health and aquatic ecosystems?* In: Environmental toxicology and chemistry, **35**, 1: 6–13.
- BSC (2019): *State of the Environment of the Black Sea (2009-2014/5): Edited by Anatoly Krustov*. Istanbul, Turkey. URL <http://www.blacksea-commission.org/SoE2009-2014/SoE2009-2014.pdf>.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (2005): *Analytik mariner Biotoxine*. URL https://www.bfr.bund.de/cm/343/positionspapier_analytik_mariner_biotoxine.pdf.
- Butrón, A., Orive, E. & Madariaga, I. (2011): *Potential risk of harmful algae transport by ballast waters: The case of Bilbao Harbour*. In: Marine pollution bulletin, **62**, 4: 747–757.
- Cech, N. B. & Enke, C. G. (2001): *Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals*. In: Mass spectrometry reviews, **20**, 6: 362–387.
- Claparède, É. & Lachmann, J. (1859): *Études sur les infusoires et les rhizopodes*. In: Mémoires de l'Institut National Genevois, **6**: 410.
- Cutignano, A., Nuzzo, G., Sardo, A. & Fontana, A. (2017): *The Missing Piece in Biosynthesis of Amphidinols: First Evidence of Glycolate as a Starter Unit in New Polyketides from Amphidinium carterae*. In: Marine drugs, **15**, 6.
- Deeds, J., Landsberg, J., Etheridge, S., Pitcher, G. & Longan, S. (2008): *Non-Traditional Vectors for Paralytic Shellfish Poisoning*. In: Marine drugs, **6**, 2: 308–348.
- Doi, Y., Ishibashi, M., Nakamichi, H., Kosaka, T., Ishikawa, T. & Kobayashi, J. (1997): *Luteophanol A, a New Polyhydroxyl Compound from Symbiotic Marine Dinoflagellate Amphidinium sp.* In: The Journal of Organic Chemistry, **62**, 12: 3820–3823.
- EFSA (2009a): *Marine biotoxins in shellfish – Pectenotoxin group*. In: EFSA Journal, **7**, 6: 959.
- EFSA (2009b): *Marine biotoxins in shellfish - Summary on regulated marine biotoxins*. In: EFSA Journal, **7**, 8: 1306.

- Espiritu, R. A., Tan, M. C. S. & Oyong, G. G. (2017): *Evaluation of the Anti-Cancer Potential of Amphidinol 2, a Polyketide Metabolite from the Marine Dinoflagellate Amphidinium klebsii*. In: Jordan Journal of Biological Sciences, **10**, 4: 297–302.
- FAO (2004): *Marine biotoxins, FAO food and nutrition paper*, Bd. 80. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- FAO (2018): *Meeting the sustainable development goals, The state of world fisheries and aquaculture*, Bd. 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Gerssen, A., Klijnstra, M. D., Cubbon, S. & Gledhill, A. (2013): *UPLC/MS/MS Method for the Routine Quantification of Regulated and Non-Regulated Lipophilic Marine Biotoxins in Shellfish*. URL <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004601en.pdf>.
- Gerssen, A., Mulder, P., van Rhijn, H. & de Boer, J. (2008): *Mass spectrometric analysis of the marine lipophilic biotoxins pectenotoxin-2 and okadaic acid by four different types of mass spectrometers*. In: Journal of mass spectrometry : JMS, **43**, 8: 1140–1147.
- Gerssen, A., Pol-Hofstad, I. E., Poelman, M., Mulder, P. P. J., van den Top, H. J. & de Boer, J. (2010): *Marine toxins: Chemistry, toxicity, occurrence and detection, with special reference to the Dutch situation*. In: Toxins, **2**, 4: 878–904.
- Glibert, P. & Burford, M. (2017): *Globally Changing Nutrient Loads and Harmful Algal Blooms: Recent Advances, New Paradigms, and Continuing Challenges*. In: Oceanography, **30**, 1: 58–69.
- Glibert, P. M., Anderson, D. M., Gentien, P., Granéli, E. & Sellner, K. G. (2005): *The global complex phenomena of harmful algal blooms*. In: Oceanography, **8**, 2: 136–147.
- Gómez, F. & Boicenco, L. (2004): *An annotated checklist of dinoflagellates in the Black Sea*. In: Hydrobiologia, **517**, 1-3: 43–59.
- Guiry, M. D. & Guiry, G. M. (2019): *AlgaeBase World-wide electronic publication: <http://www.algaebase.org>: Accessed 02.05.2019*. URL <http://www.algaebase.org>.
- Gunsen, U., Aydin, A. & Ozcan, A. (2008): *Determination of the toxin profile of Venus gallina, Vernus verrucosa and Cardium edule mussels in Turkey*. In: Archiv für Lebensmittelhygiene, **59**, 6: 233–238.

- Hallegraeff, G., Bolch, C., Bradbury, A., Campbell, K., Condie, S., Dorantes, J., Harwood, T., Murray, S., Turnbull, A., Ugalde, S. & Wilson, K. (2017): *Improved understanding of Tasmanian harmful algal blooms and biotoxin events to support seafood risk management*.
- Hallegraeff, G. M. (1993): *A review of harmful algal blooms and their apparent global increase*. In: *Phycologia*, **32**, 2.
- Hanif, N., Ohno, O., Kitamura, M., Yamada, K. & Uemura, D. (2010): *Symbiopolyol, a VCAM-1 inhibitor from a symbiotic dinoflagellate of the jellyfish Mastigias papua*. In: *Journal of natural products*, **73**, 7: 1318–1322.
- Heisler, J., Glibert, P., Burkholder, J., Anderson, D., Cochlan, W., Dennison, W., Gobler, C., Dortch, Q., Heil, C., Humphries, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall, H., Sellner, K., Stockwell, D., Stoecker, D. & Suddleson, M. (2008): *Eutrophication and Harmful Algal Blooms: A Scientific Consensus*. In: *Harmful Algae*, **8**, 1: 3–13.
- Inuzuka, T., Yamada, K. & Uemura, D. (2014): *Amdigenols E and G, long carbon-chain polyol compounds, isolated from the marine dinoflagellate Amphidinium sp.* In: *Tetrahedron Letters*, **55**, 46: 6319–6323.
- Izdar, E. & Murray, J. W. (1991): *Black Sea Oceanography*. Springer Netherlands, Dordrecht. URL <https://ebookcentral.proquest.com/lib/gbv/detail.action?docID=3565545>.
- Jørgensen, M. F., Murray, S. & Daugbjerg, N. (2004): *Amphidinium Revisited. I. Redefinition of Amphidinium (Dinophyceae) Based on Cladistic and Molecular Phylogenetic Analyses*. In: *Journal of Phycology*, **40**, 2: 351–365.
- Kalinova, G., Mechkarova, P. & Marinova, M. (2015): *A study of paralytic toxins in cultured mussels from Bulgarian Black Sea*. In: *Trakia Journal of Science*, **13**, Suppl.2: 303–308.
- Karafas, S., Teng, S. T., Leaw, C. P. & Alves-de Souza, C. (2017): *An evaluation of the genus Amphidinium (Dinophyceae) combining evidence from morphology, phylogenetics, and toxin production, with the introduction of six novel species*. In: *Harmful Algae*, **68**: 128–151.
- Kim, J.-H., Tillmann, U., Adams, N. G., Krock, B., Stutts, W. L., Deeds, J. R., Han, M.-S. & Trainer, V. L. (2017): *Identification of Azadinium species and a new azaspiracid from Azadinium poporum in Puget Sound, Washington State, USA*. In: *Harmful Algae*, **68**: 152–167.

- Krock, B., Busch, J. A., Tillmann, U., García-Camacho, F., Sánchez-Mirón, A., Gallardo-Rodríguez, J. J., López-Rosales, L., Andree, K. B., Fernández-Tejedor, M., Witt, M., Cembella, A. D. & Place, A. R. (2017): *LC-MS/MS Detection of Karlotoxins Reveals New Variants in Strains of the Marine Dinoflagellate Karlodinium veneficum from the Ebro Delta (NW Mediterranean)*. In: Marine drugs, **15**, 12.
- Krock, B., Tillmann, U., John, U. & Cembella, A. D. (2009): *Characterization of azaspiracids in plankton size-fractions and isolation of an azaspiracid-producing dinoflagellate from the North Sea*. In: Harmful Algae, **8**, 2: 254–263.
- Krock, B., Tillmann, U., Potvin, É., Jeong, H. J., Drebing, W., Kilcoyne, J., Al-Jorani, A., Twiner, M. J., Göthel, Q. & Köck, M. (2015): *Structure Elucidation and in Vitro Toxicity of New Azaspiracids Isolated from the Marine Dinoflagellate Azadinium poporum*. In: Marine drugs, **13**, 11: 6687–6702.
- Krock, B., Tillmann, U., Selwood, A. I. & Cembella, A. D. (2008): *Unambiguous identification of pectenotoxin-1 and distribution of pectenotoxins in plankton from the North Sea*. In: Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology, **52**, 8: 927–935.
- Krock, B., Tillmann, U., Wen, Y., Hansen, P. J., Larsen, T. O. & Andersen, A. J. C. (2018): *Development of a LC-MS/MS method for the quantification of goniodomins A and B and its application to Alexandrium pseudogonyaulax strains and plankton field samples of Danish coastal waters*. In: Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology, **155**: 51–60.
- Kruve, A., Kaupmees, K., Liigand, J., Oss, M. & Leito, I. (2013): *Sodium adduct formation efficiency in ESI source*. In: Journal of mass spectrometry : JMS, **48**, 6: 695–702.
- Kubota, T., Iinuma, Y. & Kobayashi, J. (2006): *Cloning of Polyketide Synthase Genes from Amphidinolide-Producing Dinoflagellate Amphidinium sp.* In: Biological & Pharmaceutical Bulletin, **29**, 7: 1314–1318.
- Lassus, P., Chomérat, N., Hess, P. & Nézan, E. (2016): *Toxic and harmful microalgae of the world ocean: Micro-algues toxiques et nuisibles de l'océan mondial, Manuals and guides / IOC*, Bd. 68. International Society for the Study of Harmful Algae and United Nations Educational Scientific and Cultural Organisation, Copenhagen N, Denmark and Paris.

- Luo, Z., Krock, B., Giannakourou, A., Venetsanopoulou, A., Pagou, K., Tillmann, U. & Gu, H. (2018): *Sympatric occurrence of two *Amphidinium poporum* ribotypes in the Eastern Mediterranean Sea*. In: *Harmful Algae*, **78**: 75–85.
- Ma, H., Krock, B., Tillmann, U., Bickmeyer, U., Graeve, M. & Cembella, A. (2011): *Mode of action of membrane-disruptive lytic compounds from the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense**. In: *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, **58**, 3: 247–258.
- Mandal, S. K., Singh, R. P. & Patel, V. (2011): *Isolation and characterization of exopolysaccharide secreted by a toxic dinoflagellate, *Amphidinium carterae* Hulburt 1957 and its probable role in harmful algal blooms (HABs)*. In: *Microbial ecology*, **62**, 3: 518–527.
- Martínez, K. A., Lauritano, C., Druka, D., Romano, G., Grohmann, T., Jaspars, M., Martín, J., Díaz, C., Cautain, B., de La Cruz, M., Ianora, A. & Reyes, F. (2019): *Amphidinol 22, a New Cytotoxic and Antifungal Amphidinol from the Dinoflagellate *Amphidinium carterae**. In: *Marine drugs*, **17**, 7.
- Merck Millipore (2013): *UHPLC 2 - Guidelines for high throughput separations*. URL http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/PurospherSTAR-RP-18-endcapped-2m-Hibar-HR-50-2.1,MDA_CHEM-150646#anchor_BRO.
- Meyer-Reil, L.-A. & Köster, M. (2000): *Eutrophication of Marine Waters: Effects on Benthic Microbial Communities*. In: *Marine pollution bulletin*, **41**, 1-6: 255–263.
- Ministry of Agriculture and Food (2016): *Annual report on the condition and development of agriculture Bulgaria*.
- Molina-Miras, A., Morales-Amador, A., de Vera, C. R., López-Rosales, L., Sánchez-Mirón, A., Souto, M. L., Fernández, J. J., Norte, M., García-Camacho, F. & Molina-Grima, E. (2018): *A pilot-scale bioprocess to produce amphidinols from the marine microalga *Amphidinium carterae*: Isolation of a novel analogue*. In: *Algal Research*, **31**: 87–98.
- Mooney, B. D., Hallegraeff, G. M. & Place, A. R. (2010): *Ichthyotoxicity of four species of gymnodinioid dinoflagellates (*Kareniaceae*, *Dinophyta*) and purified karlotoxins to larval sheepshead minnow*. In: *Harmful Algae*, **9**, 6: 557–562.
- Morton, S. L., Vershinin, A., Leighfield, T., Smith, L. & Quilliam, M. (2007): *Identification of yessotoxin in mussels from the Caucasian Black Sea Coast of the Russian*

- Federation*. In: *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology, **50**, 4: 581–584.
- Morton, S. L., Vershinin, A., Smith, L. L., Leighfield, T. A., Pankov, S. & Quilliam, M. A. (2009): *Seasonality of Dinophysis spp. and Prorocentrum lima in Black Sea phytoplankton and associated shellfish toxicity*. In: *Harmful Algae*, **8**, 5: 629–636.
- Murray, S., Flø Jørgensen, M., Daugbjerg, N. & Rhodes, L. (2004): *Amphidinium Revisited. II. Resolving Species Boundaries in the Amphidinium Operculatum Species Complex (Dinophyceae), Including Descriptions of Amphidinium Trulla Sp. Nov. and Amphidinium Gibossum. Comb. Nov.* In: *Journal of Phycology*, **40**, 2: 366–382.
- Murray, S. & Patterson, D. J. (2002): *The benthic dinoflagellate genus Amphidinium in south-eastern Australian waters, including three new species*. In: *European Journal of Phycology*, **37**, 2: 279–298.
- Murray, S. A., Garby, T., Hoppenrath, M. & Neilan, B. A. (2012): *Genetic diversity, morphological uniformity and polyketide production in dinoflagellates (Amphidinium, Dinoflagellata)*. In: *PloS one*, **7**, 6: e38253.
- Murray, S. A., Kohli, G. S., Farrell, H., Spiers, Z. B., Place, A. R., Dorantes-Aranda, J. J. & Rusczyk, J. (2015): *A fish kill associated with a bloom of Amphidinium carterae in a coastal lagoon in Sydney, Australia*. In: *Harmful Algae*, **49**: 19–28.
- NOAA (2015): *Assessment of the Western Gulf of Mexico Harmful Algal Bloom Operational Forecast System (GOMX HAB-OFS): An Analysis of Forecas Skill and Utilization from October 1, 2010 to April 30, 2014*. URL https://tidesandcurrents.noaa.gov/publications/NOAA_Technical_Report_NOS_COOPS_080.pdf.
- NOAA (2019): *Fall 2018 Red Tide Event That Affected Florida and the Gulf Coast*. URL <https://oceanservice.noaa.gov/hazards/hab/florida-2018.html>.
- Nuzzo, G., Cutignano, A., Sardo, A. & Fontana, A. (2014): *Antifungal amphidinol 18 and its 7-sulfate derivative from the marine dinoflagellate Amphidinium carterae*. In: *Journal of natural products*, **77**, 6: 1524–1527.
- Olano, C., Lomovskaya, N., Fonstein, L., Roll, J. T. & Hutchinson, C. R. (1999): *A two-plasmid system for the glycosylation of polyketide antibiotics: Bioconversion of e-rhodomyconone to rhodomycon D*. In: *Chemistry & Biology*, **6**, 12: 845–855.
- Özsoy, E. & Ünlüata, Ü. (1997): *Oceanography of the Black Sea: A review of some recent results*. In: *Earth-Science Reviews*, **42**, 4: 231–272.

- Paz, B., Daranas, A. H., Norte, M., Riobó, P., Franco, J. M. & Fernández, J. J. (2008): *Yessotoxins, a group of marine polyether toxins: An overview*. In: Marine drugs, **6**, 2: 73–102.
- Peteva, Z., Georgieva, S., Krock, B. & Stancheva, M. (2018a): *Selected contaminants in fish and mussels from the Bulgarian Black Sea*. In: CBU International Conference Proceedings, **6**: 1144–1149.
- Peteva, Z., Krock, B., Georgieva, S., Gerasimova, A., Stancheva, M. & Makedonski, L. (2018b): *Summer profile of lipophilic toxins in shellfish from the Black Sea, Bulgaria*. In: Ovidius University Annals of Chemistry, **29**, 2: 117–121.
- Peteva, Z., Krock, B., Georgieva, S. & Stancheva, M. (2018c): *Occurrence and Variability of Marine Biotoxins in Mussel (*Mytilus Galloprovincialis*) and in Plankton Samples from Bulgarian Coast in Spring 2017*. In: International Journal of Agriculture & Environmental Science, **5**, 4: 1–11.
- Peteva, Z., Stancheva, M., Georgieva, S., Gerasimova, A. & Makedonski, L. (2018d): *Phycotoxin profile of plankton net and shellfish samples from Bulgarian Black Sea south coast: a case study*. In: 4th International Conference Water resources and wetlands.
- Place, A. R., Bowers, H. A., Bachvaroff, T. R., Adolf, J. E., Deeds, J. R. & Sheng, J. (2012): *Karlodinium veneficum—The little dinoflagellate with a big bite*. In: Harmful Algae, **14**: 179–195.
- Preiß-Weigert, A. (2018): *Auswirkungen der Verarbeitung auf Gehalte an Marinen Biotoxinen in Muscheln*. URL <https://www.bfr-akademie.de/media/wysiwyg/2018/WSVF2018/auswirkungen-der-verarbeitung-auf-gehalte-an-marinen-biotoxinen-in-muscheln.pdf>.
- Reguera, B., Riobó, P., Rodríguez, F., Díaz, P. A., Pizarro, G., Paz, B., Franco, J. M. & Blanco, J. (2014): *Dinophysis toxins: Causative organisms, distribution and fate in shellfish*. In: Marine drugs, **12**, 1: 394–461.
- Rhodes, L. L., Smith, K. F., Munday, R., Selwood, A. I., McNabb, P. S., Holland, P. T. & Bottein, M.-Y. (2010): *Toxic dinoflagellates (Dinophyceae) from Rarotonga, Cook Islands*. In: Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology, **56**, 5: 751–758.

- Satake, M., Cornelio, K., Hanashima, S., Malabed, R., Murata, M., Matsumori, N., Zhang, H., Hayashi, F., Mori, S., Kim, J. S., Kim, C.-H. & Lee, J.-S. (2017): *Structures of the Largest Amphidinol Homologues from the Dinoflagellate Amphidinium carterae and Structure-Activity Relationships*. In: Journal of natural products, **80**, 11: 2883–2888.
- Satake, M., Murata, M., Yasumoto, T., Fujita, T. & Naoki, H. (1991): *Amphidinol, a polyhydroxy-polyene antifungal agent with an unprecedented structure, from a marine dinoflagellate, Amphidinium klebsii*. In: Journal of the American Chemical Society, **113**, 26: 9859–9861.
- Smayda, T. J. (1997): *Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea*. In: Limnology and Oceanography, **42**, 5part2: 1137–1153.
- Southard, G. M., Fries, L. T. & Barkoh, A. (2010): *Prymnesium parvum: The Texas Experience 1*. In: JAWRA Journal of the American Water Resources Association, **46**, 1: 14–23.
- Te, M. R., Lohous & Miller, D. J. (1998): *Genetic transformation of dinoflagellates (Amphidinium and Symbiodinium): Expression of GUS in microalgae using heterologous promoter constructs*. In: The Plant Journal, **13**, 3: 427–435.
- Tillmann, U., Elbrächter, M., John, U. & Krock, B. (2011): *A new non-toxic species in the dinoflagellate genus Azadinium: A. poporum sp. nov.* In: European Journal of Phycology, **46**, 1: 74–87.
- Tillmann, U., Elbrächter, M., Krock, B., John, U. & Cembella, A. (2009): *Azadinium spinosum gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins*. In: European Journal of Phycology, **44**, 1: 63–79.
- Tillmann, U., Gottschling, M., Krock, B., Smith, K. F. & Guinder, V. (2019): *High abundance of Amphidomataceae (Dinophyceae) during the 2015 spring bloom of the Argentinean Shelf and a new, non-toxigenic ribotype of Azadinium spinosum*. In: Harmful Algae, **84**: 244–260.
- Tillmann, U., Gottschling, M., Nézan, E., Krock, B. & Bilien, G. (2014): *Morphological and molecular characterization of three new Azadinium species (Amphidomataceae, dinophyceae) from the Irminger sea*. In: Protist, **165**, 4: 417–444.

- Tillmann, U., Salas, R., Gottschling, M., Krock, B., O'Driscoll, D. & Elbrächter, M. (2012a): *Amphidoma languida* sp. nov. (Dinophyceae) reveals a close relationship between *Amphidoma* and *Azadinium*. In: *Protist*, **163**, 5: 701–719.
- Tillmann, U., Soehner, S., Nézan, E. & Krock, B. (2012b): *First record of the genus Azadinium (Dinophyceae) from the Shetland Islands, including the description of Azadinium polongum* sp. nov. In: *Harmful Algae*, **20**: 142–155.
- Vallejo, F., Tomás-Barberán, F. A. & Ferreres, F. (2004): *Characterisation of flavonols in broccoli (Brassica oleracea L. var. italica) by liquid chromatography-uV diode-array detection-electrospray ionisation mass spectrometry*. In: *Journal of chromatography. A*, **1054**, 1-2: 181–193.
- van Dolah, F. M. (2000): *Marine algal toxins: Origins, health effects, and their increased occurrence*. In: *Environmental health perspectives*, **108 Suppl 1**: 133–141.
- Vershinin, A., Morton, S., Leighfield, T., Pankov, S., Smith, L., Quilliam, M. & Ramsdell, J. (2006): *Alexandrium in the Black Sea — identity, ecology and PSP toxicity*. In: *African Journal of Marine Science*, **28**, 2: 209–213.
- Washida, K., Koyama, T., Yamada, K., Kita, M. & Uemura, D. (2006): *Karatungiols A and B, two novel antimicrobial polyol compounds, from the symbiotic marine dinoflagellate Amphidinium* sp. In: *Tetrahedron Letters*, **47**, 15: 2521–2525.
- Waters Corporation (2016): *Waters Xevo TQ-XS Mass Spectrometry System: Overview and Maintenance Guide*. In: , 31–33.
- Wells, M. L., Trainer, V. L., Smayda, T. J., Karlson, B. S. O., Trick, C. G., Kudela, R. M., Ishikawa, A., Bernard, S., Wulff, A., Anderson, D. M. & Cochlan, W. P. (2015): *Harmful algal blooms and climate change: Learning from the past and present to forecast the future*. In: *Harmful Algae*, **49**: 68–93.
- Zumdahl, S. S. (1999): *Chemistry*. 5 Aufl. Houghton Mifflin Harcourt.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Algenblüte vor der Küste Floridas	3
Abbildung 2	Nahrungsnetz	4
Abbildung 3	Strukturen verschiedener Schalentier-Toxine	8
Abbildung 4	Lichtmikroskopaufnahme von <i>Amphidinium carterae</i>	9
Abbildung 5	Struktur von Amphidinol 1	11
Abbildung 6	Schwarzes Meer mit Anrainerstaaten und Untersuchungsgebiet . .	15
Abbildung 7	Stationsplan	16
Abbildung 8	Chromatogramm des PSP-Multitoxinstandards	33
Abbildung 9	Struktur von PTX-1, -11, -13	36
Abbildung 10	Chromatogramm und Produktionenspektren der nicht-identifizierten PTX	37
Abbildung 11	Stationsplan Netzzüge	38
Abbildung 12	Toxingehalt >200 µm	39
Abbildung 13	Toxingehalt 50-200 µm	40
Abbildung 14	Toxingehalt 20-50 µm	41
Abbildung 15	Adduktbildung von LPD	47
Abbildung 16	Produktionen-Spektrum und Fragmentierungsschema von AM21 .	48
Abbildung 17	Produktionen-Spektrum und Fragmentierungsschema von LPD .	50
Abbildung 18	Produktionen-Spektrum und Fragmentierungsschema von AM18 nach Nuzzo et al.	52
Abbildung 19	Neu vorgestelltes Fragmentierungsschema von AM18	55
Abbildung 20	Produktionenspektrum von AMB	60
Abbildung 21	Neutralverlust-Scan von 398 Da von DN241EHU	64
Abbildung 22	Neutralverlust-Scan von 518 Da von DN241EHU	65
Abbildung 23	Neutralverlust-Scan von 392 Da von ACRN02	66
Abbildung 24	Vergleich der Produktionen-Spektren von U1 und LSA	67
Abbildung 25	Strukturvorschlag und Fragmentierungsschema von U1	68
Abbildung 26	Produktionen-Spektrum und Strukturvorschlag zu U2	69
Abbildung 27	Produktionen-Spektrum und Strukturvorschlag zu U3	70
Abbildung 28	Produktionen-Spektrum von U4	71
Abbildung 29	Produktionen-Spektrum von U5	72
Abbildung 30	Produktionen-Spektrum und Strukturvorschlag zu U6	73
Abbildung 31	Produktionen-Spektrum von U7	74
Abbildung 32	Produktionen-Spektrum und Strukturvorschlag zu U8	75

Abbildung 33	Produktionen-Spektrum und Strukturvorschlag zu U9	76
Abbildung 34	Produktionen-Spektrum und Strukturvorschlag zu U10	77
Abbildung 35	Produktionen-Spektrum zu U11	78
Abbildung 36	Produktionen-Spektrum und Strukturvorschlag zu U12	79
Abbildung 37	Produktionen-Spektrum und Strukturvorschlag zu U13	80
Abbildung 38	Produktionen-Spektrum zu U14	81
Abbildung 39	Produktionen-Spektrum und Strukturvorschlag zu U15	82
Abbildung 40	Produktionen-Spektrum zu U16	83
Abbildung 41	Produktionen-Spektrum zu U17	84
Abbildung 42	Produktionen-Spektrum und Strukturvorschlag zu U18	85
Abbildung 43	Amphidinolgesamtgehalte verschiedener <i>Amphidinium</i> -Extrakte .	87
Abbildung 44	Amphidinolprofile der <i>Amphidinium carterae</i> -Stämme CCMP1314A/B, DN241EHU, ACRN02 und ACRN03	89
Abbildung 45	Strukturen von Amphidinolen mit Carbonylgruppe	110
Abbildung 46	Produktionen-Spektrum zur Bestätigung von Amphidinol 18 . . .	111
Abbildung 47	Produktionen-Spektrum zur Bestätigung von Amphidinol 19 . . .	112
Abbildung 48	Produktionen-Spektrum zur Bestätigung von Amphidinol 22 . . .	113
Abbildung 49	Produktionen-Spektrum zur Bestätigung von Luteophanol B/C .	114
Abbildung 50	Produktionen-Spektrum zur Bestätigung von Luteophanol D . . .	115
Abbildung 51	Produktionen-Spektrum zur Bestätigung von Lingshuiol A	116
Abbildung 52	Produktionen-Spektrum zur Bestätigung von Amphidinol 4	117
Abbildung 53	Produktionen-Spektrum zur Bestätigung von Carteraol E	118
Abbildung 54	Produktionen-Spektrum zur Bestätigung von Amphidinol A	119
Abbildung 55	Produktionen-Spektrum zur Bestätigung von Amphidinol B	120

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Mitglieder der Amphidinolfamilie und deren bisher untersuchten bioaktiven Eigenschaften	12
Tabelle 2	Kulturbedingungen und Eigenschaften der untersuchten <i>Amphidinium carterae</i> Proben aus Spanien	19
Tabelle 3	Kulturbedingungen und Eigenschaften der untersuchten <i>Amphidinium</i> Proben aus Mexiko	19
Tabelle 4	Massenspektrometrische Parameter	26
Tabelle 5	Untersuchte lipophile Toxine inklusive zugehöriger Übergänge	27
Tabelle 6	Untersuchte Azaspirosäuren inklusive zugehöriger Übergänge	29
Tabelle 7	Nachweisgrenzen für lipophile Toxine und Domoinsäure	35
Tabelle 8	Aufsummierte Toxingehalte	41
Tabelle 9	Durchschnittliche Bindungsenergien der bei Amphidinolen vorkommenden Atombindungen	49
Tabelle 10	Berechnete und gemessene Massen von AM18	53
Tabelle 11	Berechnete und gemessene Massen neuer Fragmente von AM18	54
Tabelle 12	Berechnete und gemessene Massen neuer Fragmente von AMA	56
Tabelle 13	Berechnete SRM-Übergänge von bekannten Amphidinolen	60
Tabelle 14	Durch SRM-Messung detektierte Amphidinole verschiedener <i>Amphidinium carterae</i> Stämme	61
Tabelle 15	Auftretende Typen von Neutralverlusten innerhalb der Amphidinolfamilie	63
Tabelle 16	Neutralverlust-Typen für sulfatierte Amphidinole	64
Tabelle 17	Berechnete SRM-Übergänge von bekannten und neu entdeckten Amphidinolen	86
Tabelle 18	Quantifizierungsdaten lipophile Toxine	106
Tabelle 19	Quantifizierungsdaten Amphidinole	121

Anhang

Anlage 1: Quantifizierungsdaten der lipophilen Toxine

Tabelle 18. Quantifizierungsdaten lipophile Toxine. * = in PTX-2-Äquivalenten

Station	Fraktion	Tpxingehalt [ng/Netzzug]			
		YTX	PTX-2	PTX-1*	PTX-11/-13*
1	20-50 µm	504,86	0,43	2,14	0,05
	50-200 µm	1496,62	19,42	38,82	0,00
	>200 µm	261,38	6,45	9,34	0,00
3	20-50 µm	0,00	0,37	0,00	0,09
	50-200 µm	0,00	0,16	0,37	0,03
	>200 µm	0,00	0,06	0,00	0,00
4	20-50 µm	0,00	24,19	0,00	1,64
	50-200 µm	0,00	2,19	0,00	0,00
	>200 µm	0,00	0,16	0,00	0,00
7	20-50 µm	348,55	7,50	0,00	0,69
	50-200 µm	11,98	11,81	0,00	0,55
	>200 µm	0,00	0,00	0,00	0,00
8	20-50 µm	8,13	19,25	0,00	0,87
	50-200 µm	0,00	4,49	0,00	0,00
	>200 µm	0,00	0,05	0,00	0,00
12	20-50 µm	1700,89	1,93	1,18	0,00
	50-200 µm	561,04	33,66	34,49	1,01
	>200 µm	33,16	1,19	0,83	0,21
13	20-50 µm	1098,26	32,16	1,06	0,96
	50-200 µm	941,25	64,07	24,75	0,77
	>200 µm	233,41	4,41	14,99	0,00
15	20-50 µm	1155,16	6,70	0,00	0,24
	50-200 µm	761,91	16,30	14,22	0,76
	>200 µm	67,92	0,93	0,59	0,00
16	20-50 µm	1179,57	8,81	1,94	0,70
	50-200 µm	537,35	59,97	40,92	3,28
	>200 µm	56,11	1,52	1,92	0,00
19	20-50 µm	593,09	17,97	1,36	1,05
	50-200 µm	522,12	58,22	13,93	2,21

	>200 µm	22,23	0,46	0,64	0,00
20	20-50 µm	1900,64	7,89	4,29	0,30
	50-200 µm	1140,23	36,59	40,21	0,81
	>200 µm	41,40	0,34	0,63	0,00
23	20-50 µm	911,08	75,28	7,91	4,91
	50-200 µm	0,36	8,52	9,04	0,00
	>200 µm	0,00	0,00	0,00	0,00
24	20-50 µm	0,00	39,65	0,00	3,23
	50-200 µm	0,00	12,86	0,24	0,63
	>200 µm	0,00	0,02	0,00	0,00
27	20-50 µm	8,57	6,90	0,00	0,37
	50-200 µm	942,33	12,24	0,77	0,36
	>200 µm	0,00	0,60	0,00	0,00
28	20-50 µm	1281,55	46,11	0,95	15,29
	50-200 µm	794,13	25,99	6,98	5,15
	>200 µm	7,81	0,00	0,00	0,00
31	20-50 µm	177,74	9,26	2,51	0,45
	50-200 µm	594,61	182,57	289,32	0,00
	>200 µm	0,00	2,74	29,82	0,00
32	20-50 µm	153,75	2,79	7,53	0,00
	50-200 µm	206,42	7,19	127,53	0,00
	>200 µm	22,85	3,40	31,71	0,00
35	20-50 µm	700,04	5,93	2,83	0,00
	50-200 µm	3015,69	333,03	156,87	5,42
	>200 µm	715,87	35,31	43,57	0,57
36	20-50 µm	476,34	30,96	2,22	0,96
	50-200 µm	833,40	70,69	31,11	1,35
	>200 µm	471,83	24,69	23,96	0,00
38	20-50 µm	148,97	13,55	2,61	0,23
	50-200 µm	180,14	33,68	30,70	0,90
	>200 µm	17,63	31,01	29,64	0,00
39	20-50 µm	1111,09	38,89	13,37	0,94
	50-200 µm	3460,24	119,67	70,94	2,94
	>200 µm	0,00	0,06	0,00	0,00
42	20-50 µm	2878,15	95,54	16,59	6,03
	50-200 µm	3261,16	426,32	335,81	13,99

	>200 µm	39,02	0,45	2,67	0,00
43	20-50 µm	5013,87	86,40	18,23	4,96
	50-200 µm	808,21	94,48	81,86	6,07
	>200 µm	0,00	0,09	0,00	0,00
46	20-50 µm	2,46	18,77	2,69	0,50
	50-200 µm	0,00	16,34	10,59	0,89
	>200 µm	0,00	0,00	0,00	0,00
47	20-50 µm	0,00	205,91	2,75	8,44
	50-200 µm	2,51	27,75	4,19	2,72
	>200 µm	0,00	0,00	0,00	0,00
50	20-50 µm	204,13	76,59	1,70	11,29
	50-200 µm	621,38	25,68	1,76	3,69
	>200 µm	0,00	0,00	0,07	0,19
51	20-50 µm	11,07	12,96	0,89	0,71
	50-200 µm	0,00	0,72	0,51	0,00
	>200 µm	0,00	0,00	0,00	0,00
54	20-50 µm	63,37	41,05	0,40	2,87
	50-200 µm	0,00	0,78	0,00	0,00
	>200 µm	0,00	0,00	0,00	0,00
55	20-50 µm	50,64	25,83	0,25	1,48
	50-200 µm	0,00	0,53	0,00	0,00
	>200 µm	0,00	0,00	0,00	0,00
58	20-50 µm	65,61	32,64	2,03	1,88
	50-200 µm	0,00	21,68	1,27	2,12
	>200 µm	0,00	0,00	0,00	0,00
59	20-50 µm	2396,52	22,15	3,11	0,74
	50-200 µm	1291,17	28,61	8,88	1,72
	>200 µm	0,00	0,00	0,00	0,00
62	20-50 µm	9876,62	69,67	11,77	2,15
	50-200 µm	2956,08	41,10	67,37	2,66
	>200 µm	0,00	0,24	0,65	0,00
63	20-50 µm	5819,55	65,11	33,28	1,98
	50-200 µm	6858,77	51,90	39,61	0,47
	>200 µm	15,84	0,34	1,30	0,00
66	20-50 µm	1207,80	47,96	4,60	1,69
	50-200 µm	9,01	16,03	8,28	0,37
	>200 µm	0,00	0,00	0,00	0,00

67	20-50 μm	478,67	5,31	0,59	0,00
	50-200 μm	187,38	7,05	4,51	0,12
	>200 μm	0,00	0,00	0,00	0,00
70	20-50 μm	6,15	21,14	0,17	0,73
	50-200 μm	0,00	0,01	0,03	0,00
	>200 μm	0,00	0,00	0,00	0,00
71	20-50 μm	46,00	48,87	0,44	1,40
	50-200 μm	0,00	1,42	0,13	0,03
	>200 μm	0,00	0,06	0,00	0,00
74	20-50 μm	52,20	9,05	0,27	0,17
	50-200 μm	0,00	0,56	0,06	0,00
	>200 μm	0,00	0,00	0,00	0,00
75	20-50 μm	0,00	28,77	1,40	0,27
	50-200 μm	0,00	1,63	0,48	0,00
	>200 μm	0,00	0,00	0,00	0,00
78	20-50 μm	17145,26	75,10	20,19	1,31
	50-200 μm	4653,29	14,14	24,10	0,00
	>200 μm	12697,50	188,99	48,72	4,32
79	20-50 μm	3172,56	48,48	36,50	0,41
	50-200 μm	2493,78	77,78	54,70	0,86
	>200 μm	1166,45	1,67	15,05	0,00

Anlage 2: Strukturen von Amphidinolen mit Carbonylgruppe

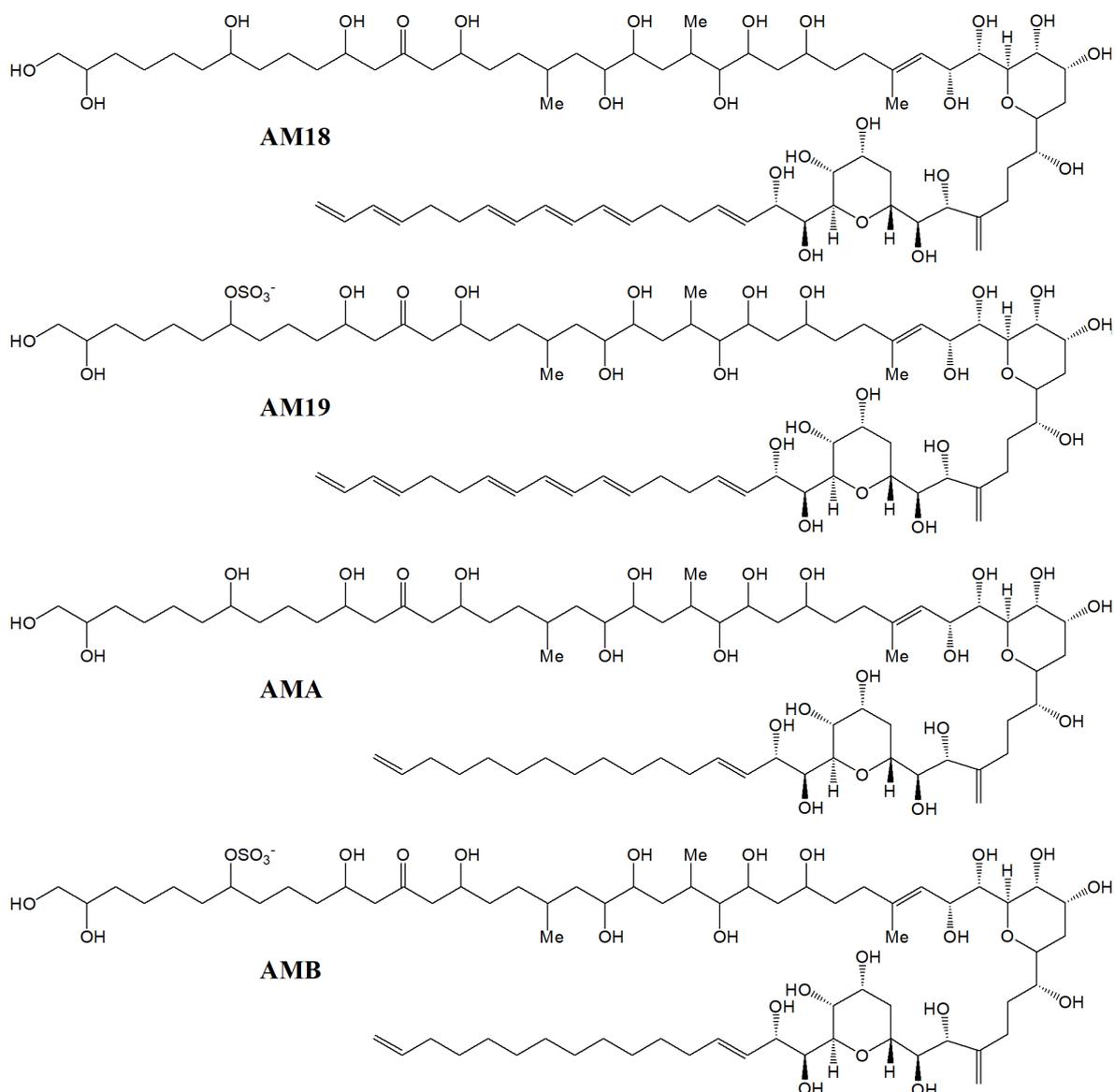


Abbildung 45. Strukturen der Amphidinole 18, 19, A und B, welche eine Carbonylgruppe am hydrophilen Arm tragen. AM19 und AMB sind die sulfatierten Derivate von AM18 und AMA. Letztere unterscheiden sich in der Länge des lipophilen Arms und Anzahl der darin vorkommenden Doppelbindungen.

Anlage 3: Produktionen-Spektren zur Bestätigung der mittels SRM detektierten Substanzen

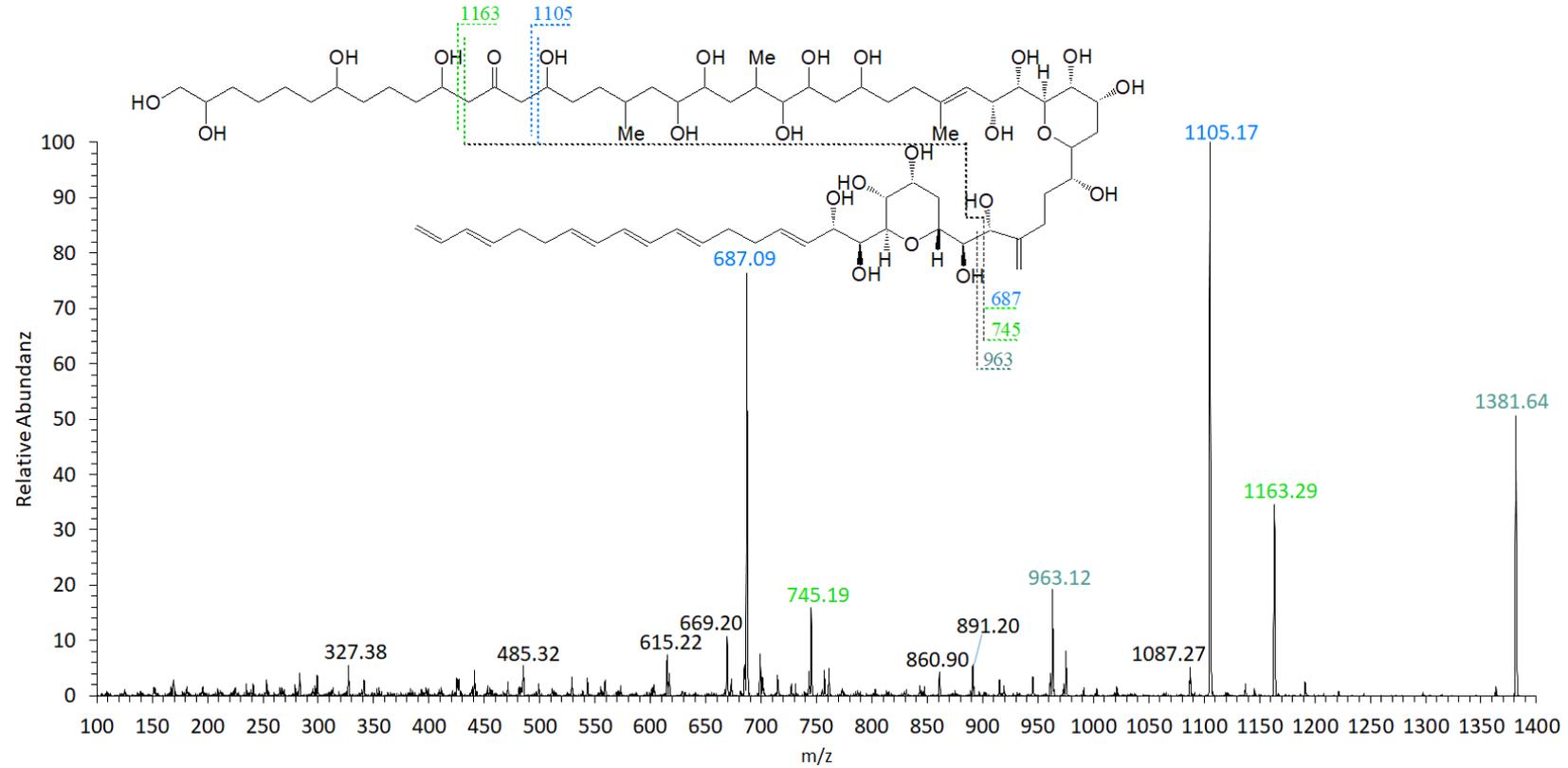


Abbildung 46. Produktionen-Spektrum von 1382 Da des *Amphidinium carterae* Stamms CCMP1314A, mit dem die Substanz bei $t_R=2,71$ min als Amphidinol 18 bestätigt werden konnte.

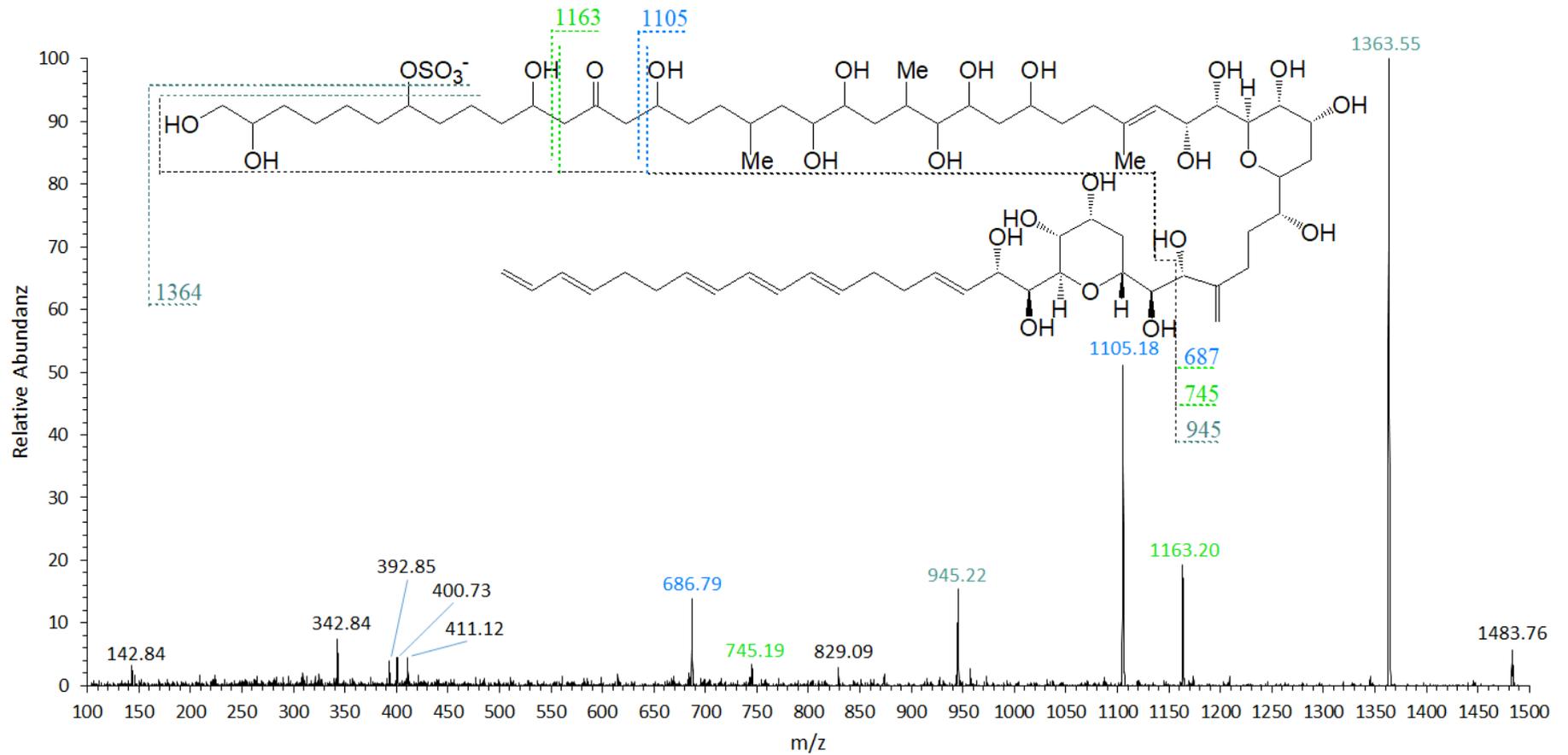


Abbildung 47. Produktions-Spektrum von 1484 Da des *Amphidinium carterae* Stammes CCMP1314A, mit dem die Substanz bei $t_R=2,20$ min als Amphidinol 19 bestätigt werden konnte.

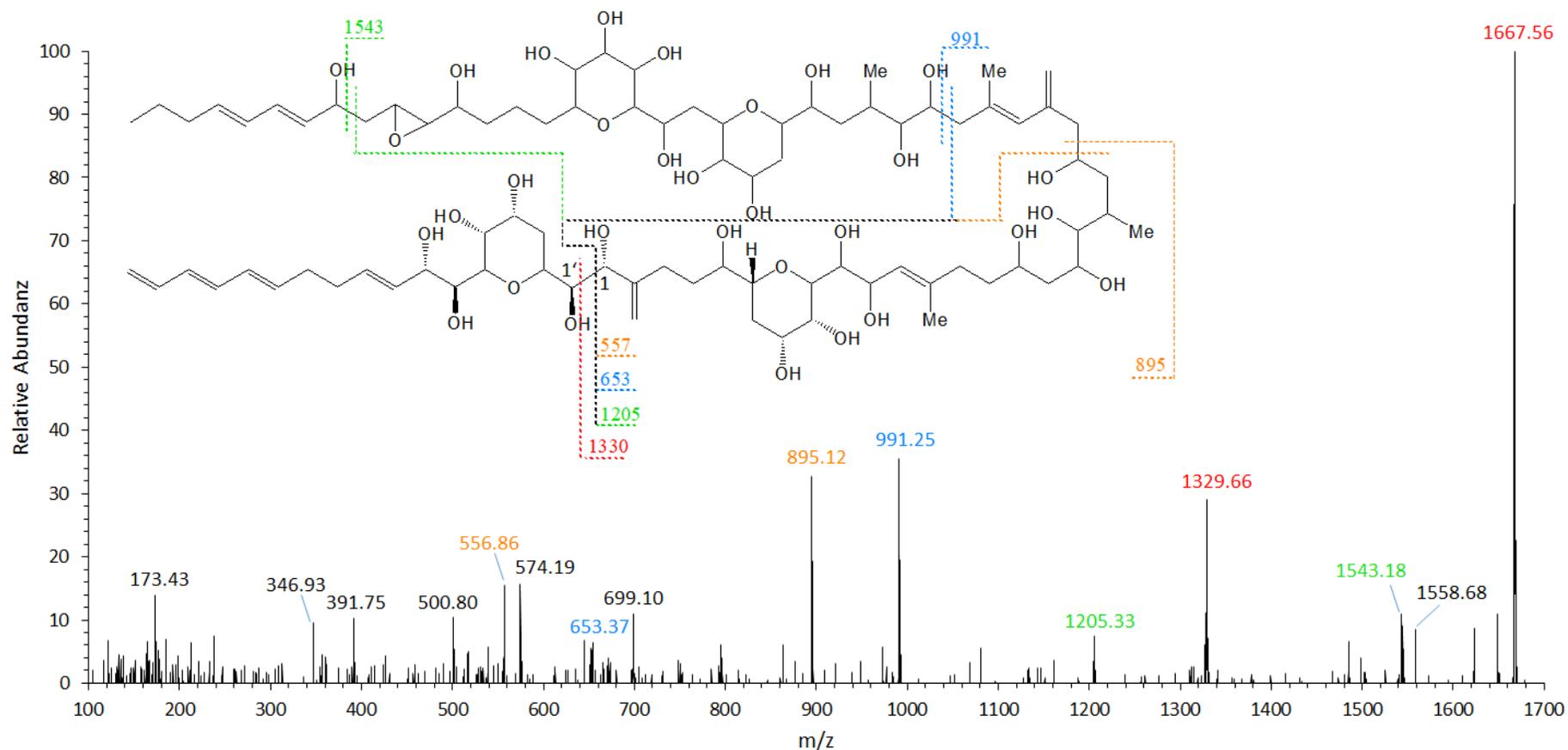


Abbildung 48. Produktions-Spektrum von 1668 Da des *Amphidinium carterae* Stamms DN241EHU, mit dem die Substanz bei $t_R=2,60$ min als Amphidinol 22 bestätigt werden konnte. Auch wenn der C-1'/C-1-Bindungsbruch in diesem Fall nicht zum abundantesten Fragment führt (1330 Da), können mehrere Paarfragmente ermittelt werden, welche eine Differenz von 338 Da aufweisen und charakteristisch für AM22 sind.

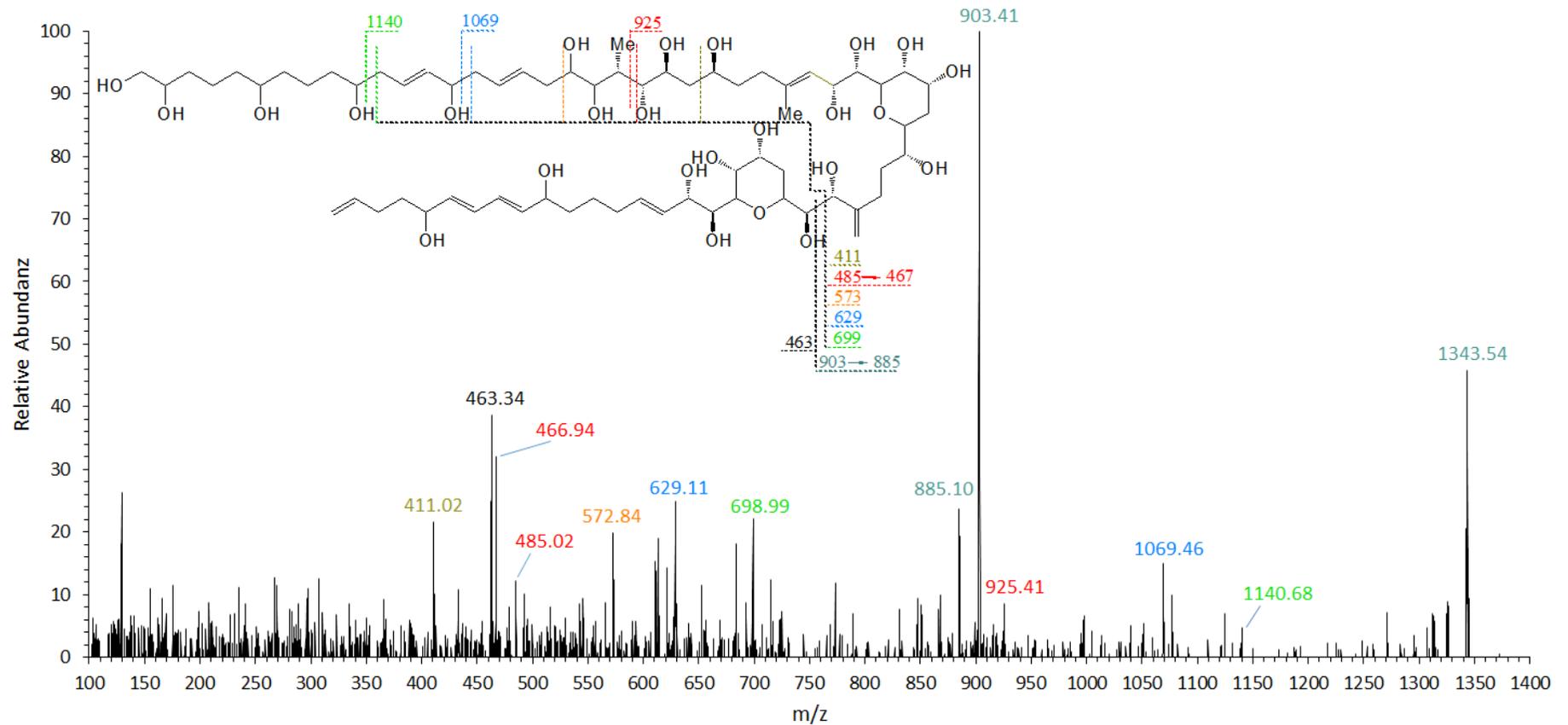


Abbildung 49. Produktions-Spektrum von 1344 Da des *Amphidinium carterae* Stamms ACRN02, mit dem die Substanz bei $t_R=2,23$ min als Luteophanol B oder C bestätigt werden konnte. Die Fragmente sind an der Struktur von Luteophanol B gezeigt; bei Luteophanol C sind zwei der vier Hydroxylgruppen am lipophilen Arm an anderer Position, was jedoch keinen Einfluss auf die Fragmentierung hat.

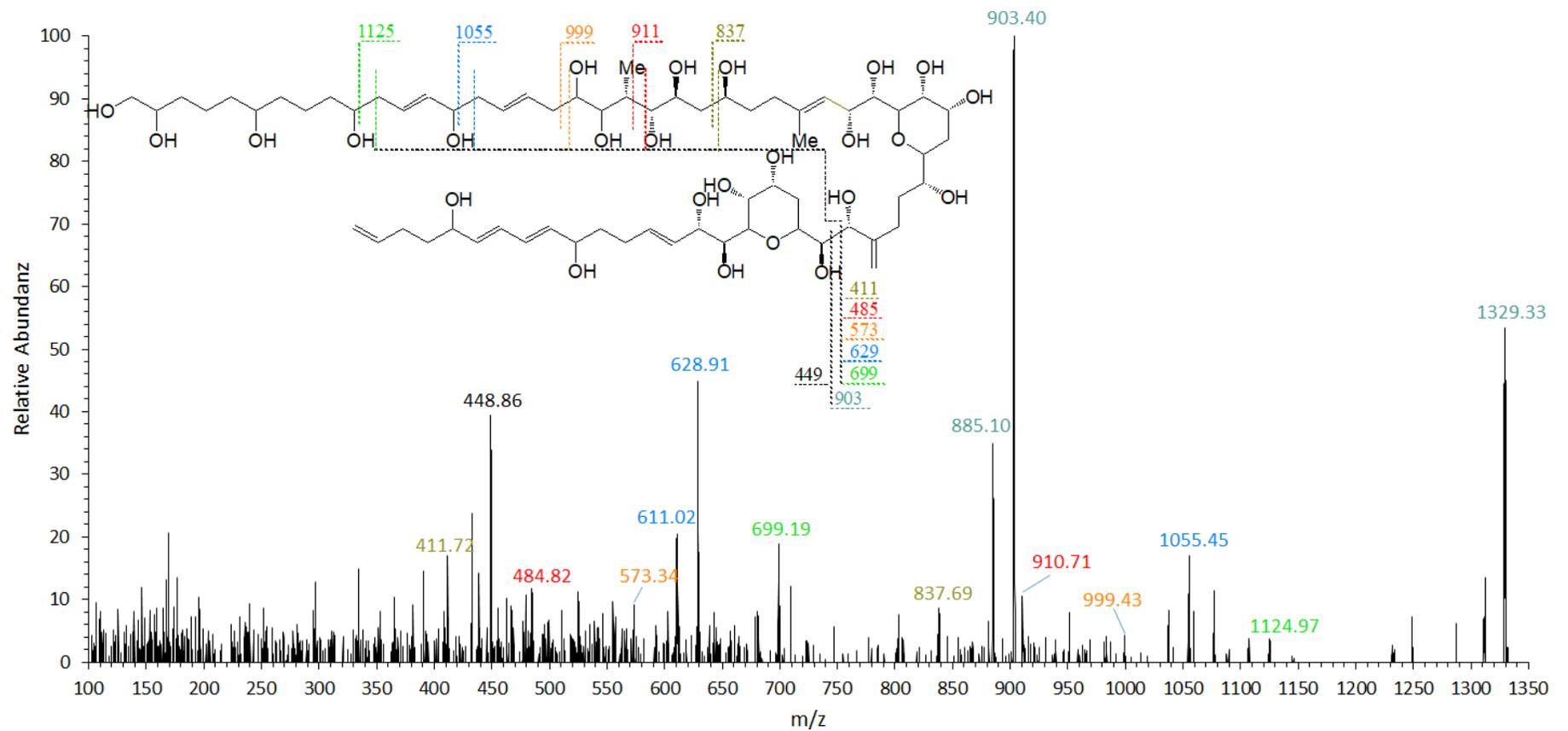


Abbildung 50. Produktions-Spektrum von 1330 Da des *Amphidinium carterae* Stamms ACRN02, mit dem die Substanz bei $t_R=2,0$ min als Luteophanol D bestätigt werden konnte.

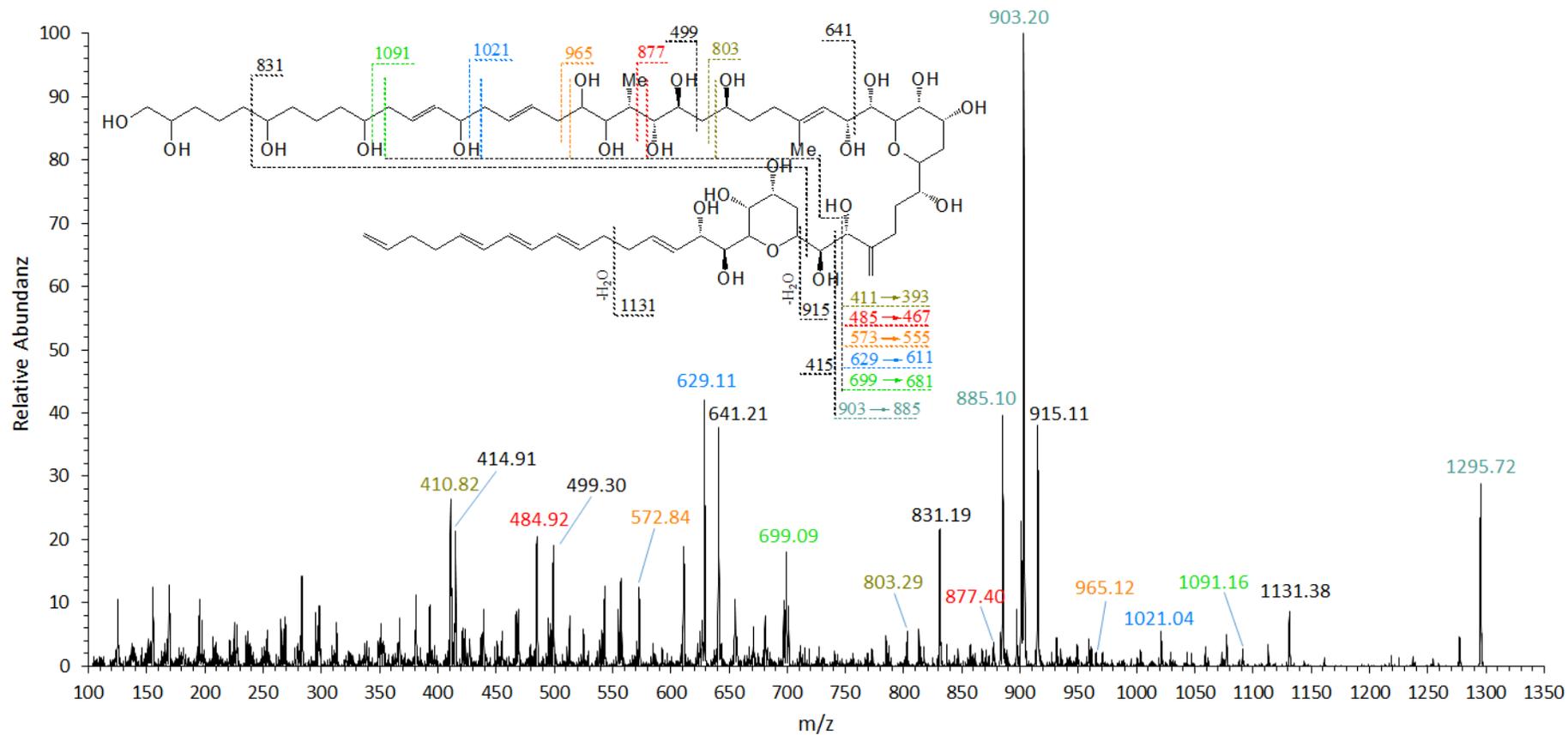


Abbildung 51. Produktions-Spektrum von 1296 Da des *Amphidinium carterae* Stamms ACRN02, mit dem die Substanz bei $t_R=2,58$ min als Lingshuiol A bestätigt werden konnte. Während die Paarfragmente in diesem Fall teilweise nur sehr geringe Peaks bilden, konnten bisher unbekannte Brüche festgestellt werden.

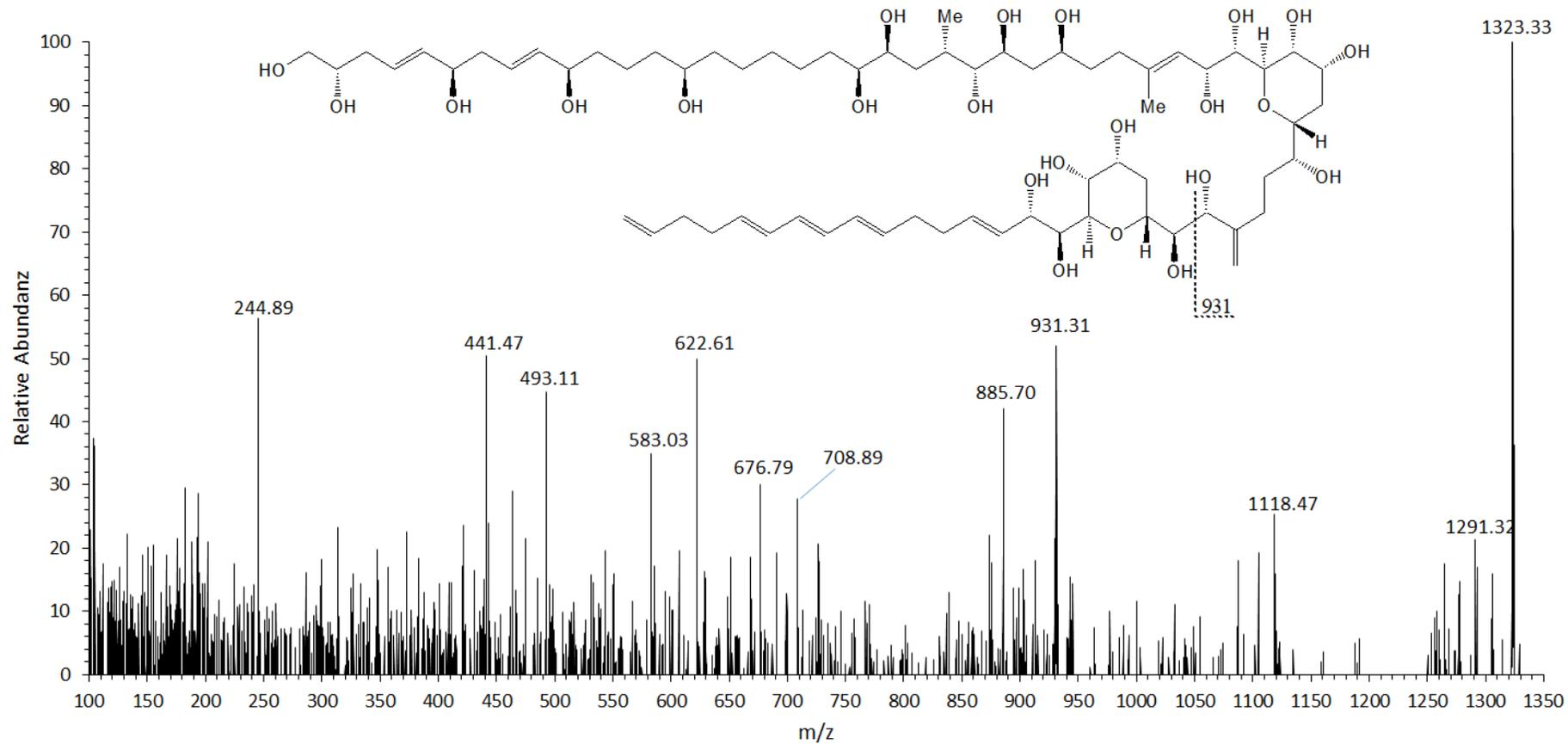


Abbildung 52. Produktions-Spektrum von 1323 Da des *Amphidinium carterae* Stamms ACRN02, mit dem die Substanz bei $t_R=2,62$ min als Amphidinol 4 bestätigt werden sollte. Wegen zu geringer Abundanz der Substanz konnte das aussageschwache Produktions-Spektrum jedoch nicht sicher interpretiert und lediglich der C-1'/C-1-Bindungsbruch zugeordnet werden.

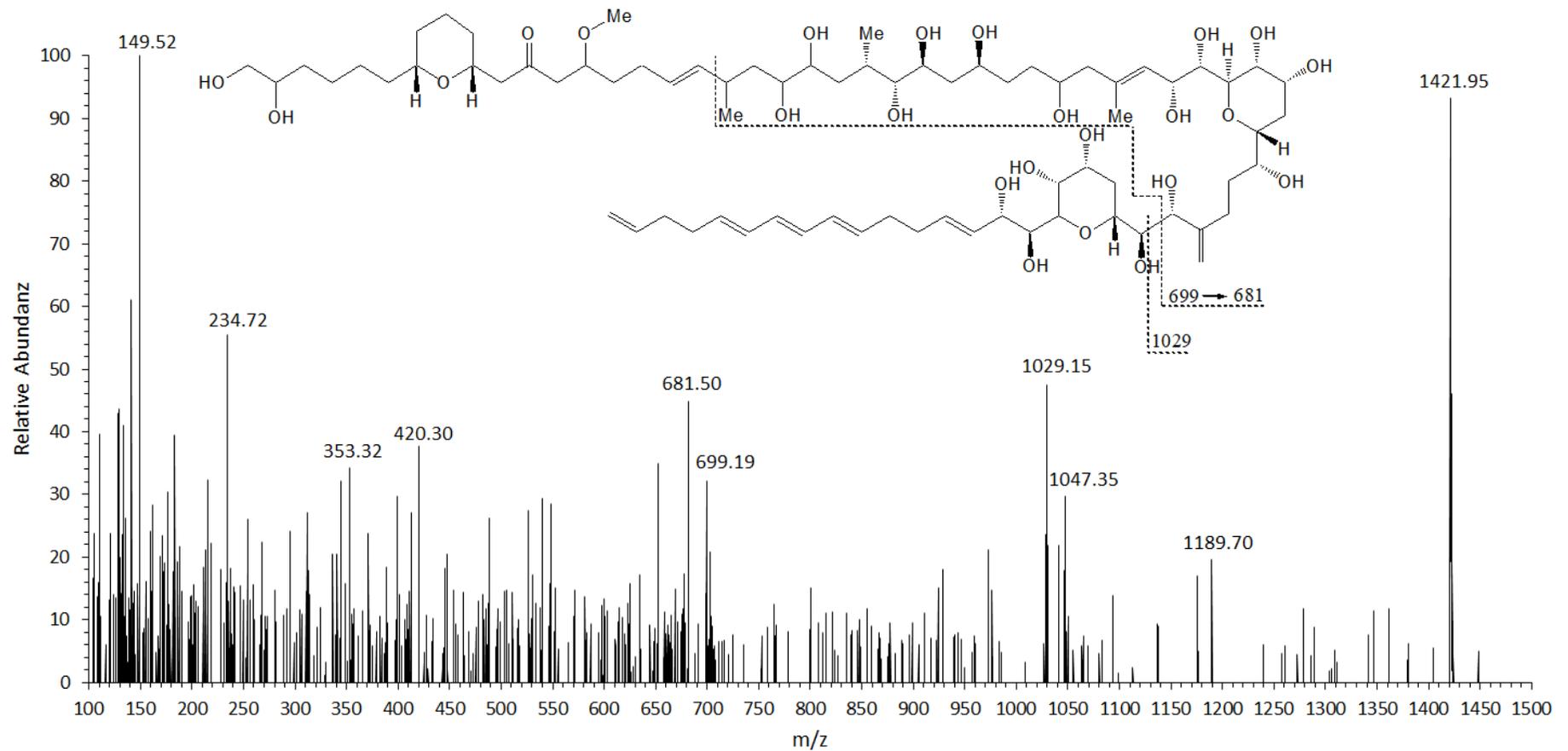


Abbildung 53. Produktions-Spektrum von 1422 Da des *Amphidinium carterae* Stamms ACRN02, mit dem die Substanz bei $t_R=2,52$ min als Carteraol E bestätigt werden sollte. Wegen zu geringer Abundanz der Substanz konnte das aussageschwache Produktions-Spektrum jedoch nicht sicher interpretiert und lediglich die Fragmente m/z 1029, 699 und 681 zugeordnet werden.

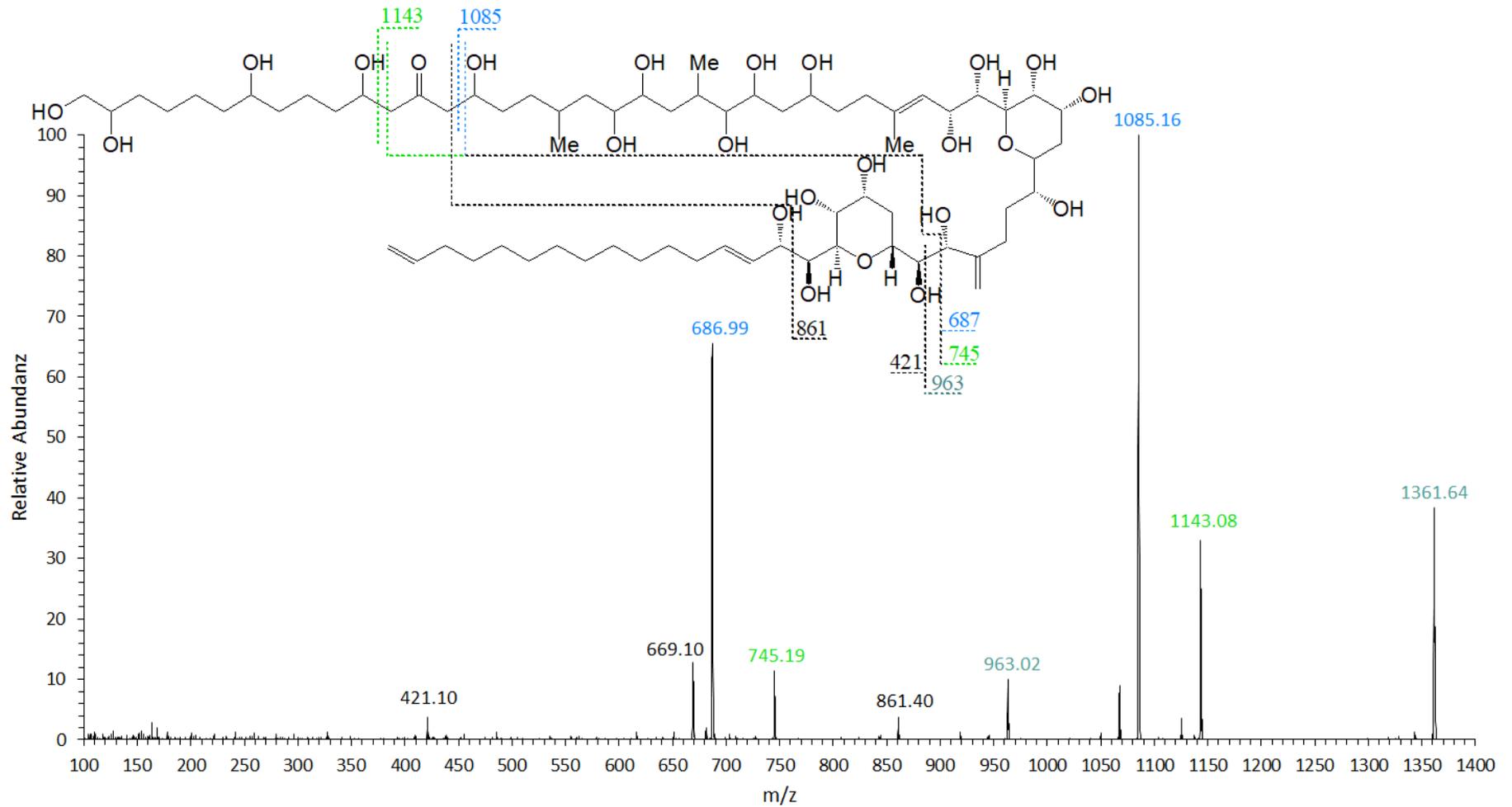


Abbildung 54. Produktions-Spektrum von 1362 Da des *Amphidinium carterae* Stamms DN241EHU, mit dem die Substanz bei $t_R=2,76$ min als Amphidinol A bestätigt werden konnte.

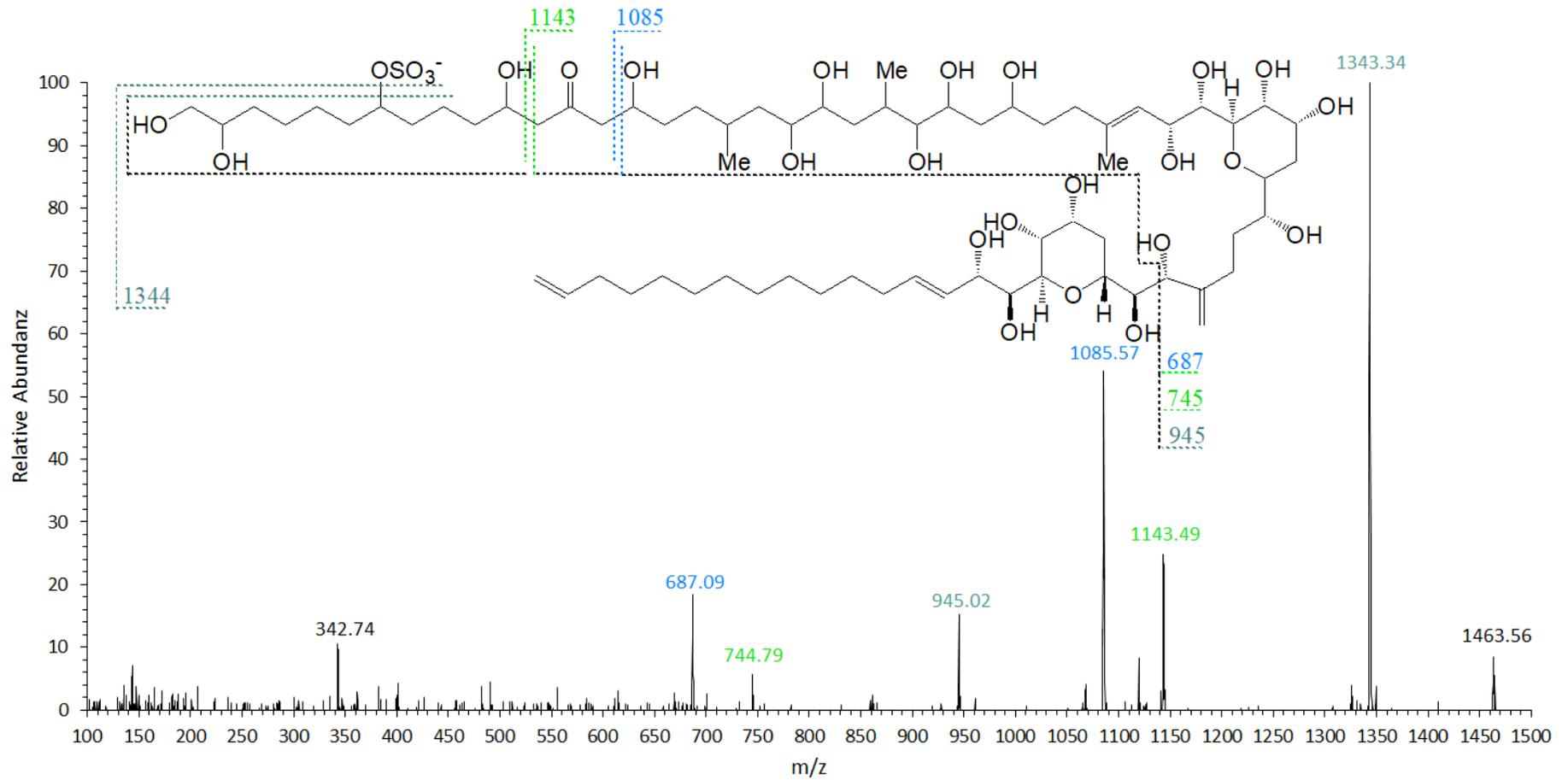


Abbildung 55. Produktions-Spektrum von 1464 Da des *Amphidinium carterae* Stamms DN241EHU, mit dem die Substanz bei $t_R=2,20$ min als Amphidinol B bestätigt werden konnte.

Anlage 4: Quantifizierungsdaten der Amphidinole

Tabelle 19. Quantifizierungsdaten Amphidinole, angegeben in fg/Zelle und in LPD-Äquivalenten

	CCMP1314A	CCMP1314B	ACRN02	ACRN03	DN241EHU
AM18	447,04	754,62			
AM19	97,03	168,83			
U7	4,96	19,22			
U8	1,22	4,63			
U9	9,18	18,30			
U10	17,68	40,23			
U11	46,91	59,78			
U12	16,96				
U13	61,74	292,72			
AM22	4,96	92,58			10,60
LSA			1875,78	2,57	
U3			149,09		
U1			1411,89		
U2			38,85		
LPD			130,73	0,09	
LPB/LPC			52,57		
U6			14,13		
AM4			4,07		
CARE			2,19		
AMA					121,32
AMB					27,46
U14					16,42
U15					77,71
U16					28,70
U17					43,13
U18					148,79

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form in keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Bremerhaven, den 17. Februar 2020

Marvin Wellkamp