

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”  
FACOLTÀ DI AGRARIA**



**DOTTORATO DI RICERCA IN  
“SCIENZE E TECNOLOGIE DELLE  
PRODUZIONI AGRO-ALIMENTARI”  
XXV CICLO 2010-2013**

**SVILUPPO DI UN METODO IN LCMSTOF PER L’ANALISI DI  
PALITOSSINE IN COLTURE ALGALI E MITILI RACCOLTI LUNGO LE  
COSTE CAMPANE**

**TUTORE**

CH.MO PROF.  
GIANCARLO BARBIERI

**CANDIDATO**

DOTT.  
VINCENZO CASTELLANO

**CO-TUTORE**

DOTT.  
VITTORIO SOPRANO

## INDICE

<b>Introduzione</b> .....	pag. 4
Riferimenti.....	pag. 6

### Capitolo 1 - Obiettivi

<b>1.1 Biotossine marine</b> .....	pag. 7
1.1.1 Biotossine marine.....	pag 7
1.1.2 Palitossine ed Ostreocina D .....	pag 8
1.1.3 Ovatossine.....	pag. 11
1.1.4 Mascarenotossine.....	pag. 12
Riferimenti.....	pag. 13

### Capitolo 2 - Materiali e Metodi

<b>2.1 Metodi analitici impiegati</b> .....	pag. 15
2.1.1 Spettrometria di massa.....	pag 15
<b>2.2 Metodi analitici di rivelazione delle Palitossine</b> .....	pag. 19
2.2.1 Saggi biologici: tossicità sul topo .....	pag 19
2.2.2 Metodi Chimici.....	pag. 21
Riferimenti.....	pag. 23

### Capitolo 3 - Risultati

<b>3.1 Determinazione della Palitossina mediante HPLC-TOF-MS</b> .....	pag. 25
3.1.1 Parte sperimentale e Risultati.....	pag 25
<b>3.2 Determinazione HPLC-TOF-MS di Ovatossine in colture algali</b> .....	pag. 47
3.2.1 Parte sperimentale e Risultati.....	pag 47

<b>3.3 Determinazione HPLC-TOF-MS di Palitossine ed Ovatossine in mitili del Golfo di Napoli...</b>	pag. 61
3.3.1 Parte sperimentale e Risultati.....	pag 61
Riferimenti.....	pag. 73
<b>Conclusioni.....</b>	pag. 74
<b>Pubblicazioni.....</b>	pag. 75
<b>Ringraziamenti.....</b>	pag. 85

## **Introduzione.**

Questa tesi di dottorato in “Scienze e tecnologie delle produzioni agro-alimentari”, svolta sotto la supervisione del Prof. Giancarlo Barbieri e del Dott. Vittorio Soprano, verte sullo:

### **Sviluppo di un metodo in LCMSTOF per l’analisi di palitossine in colture algali e mitili raccolti lungo le coste campane.**

In questi ultimi anni il rischio di contaminazione degli alimenti di origine marina da parte di biotossine algali è di estrema attualità, anche in considerazione del fatto della presenza sui nostri mercati di alimenti spesso provenienti da altre parti del globo, che possono comportare un rischio sanitario non sempre di facile valutazione. Il rischio di contaminazione degli alimenti da parte di biotossine algali di diversa natura prodotte da alcune specie fitoplanctoniche o fitobentoniche è ancor di più di attualità in considerazione di cambiamenti climatici che possono favorire la diffusione di specie tossiche, come è stato ipotizzato nel caso delle fioriture di *Ostreopsis* spp., un problema emergente lungo le coste italiane dove negli ultimi anni vengono riportate con sempre maggiore frequenza nel corso della stagione estiva. *Ostreopsis* spp. è un genere di dinoflagellato bentonico che nei mari italiani è rappresentato da almeno due specie diverse, *O. ovata* e *O. cf. siamensis*, entrambe capaci di produrre una tossina simile alla palitossina (Penna et al., 2005), una delle più potenti tossine ad oggi conosciute.

A differenza della maggior parte dei dinoflagellati, che sono planctonici, *Ostreopsis* prolifera su substrati fissi rappresentati da rocce, scogli, ovvero da macroalghe bentoniche. In occasione delle fioriture sono stati riscontrati estesi danni alla fauna bentonica (Sansoni, 2003; Simoni, 2004) e, nell’uomo, problemi respiratori e dermatologici e, almeno nei casi segnalati nel Tirreno settentrionale, è stata confermata la presenza di palitossina (Ciminiello et al., 2006). Lungo le coste campane non sono state notate negli anni passati fioriture di rilievo, sebbene la presenza della specie sia segnalata da alcuni anni, in associazione con altre microalghe bentoniche produttrici di tossine di tipo diverso (Acido okadaico, cooliatossina) (Zingone et al., 2006). È pertanto necessario avere a disposizione metodiche di analisi sensibili ed efficaci, che permettano il rilevamento di quantità anche minime di tossina, per poter gestire prontamente situazioni che possono preludere a casi di contaminazione da biotossine in alimenti di origine marina o

comunque in specie animali presenti nella fascia costiera che potrebbero essere vettori di palitossine

Pertanto ci si è proposti di condurre analisi su molluschi, crostacei e pesci bentonici o strettamente costieri che, nutrendosi di *Ostreopsis* o delle macroalghe sulle quali questa microalga prolifera, potrebbero veicolare la palitossina.

L'obiettivo principale è stato lo sviluppo di metodi idonei per l'identificazione di tossine prodotte da microalghe del genere *Ostreopsis* in prodotti alimentari di origine marina che potrebbero rappresentare un rischio per la salute umana, attraverso i passi descritti di seguito:

- ricerca bibliografica per identificare i possibili vettori e le metodologie e tecniche analitiche adatte a identificare le tossine di interesse
- messa a punto di idonei metodi in cromatografia liquida per la determinazione delle tossine
- trasferimento delle conoscenze acquisite mediante seminari, pubblicazioni e incontri di formazione in particolar modo con i servizi veterinari delle AA.SS.LL.

Questo studio si è proposto di ottenere metodi quanto più rapidi e semplici per la determinazione delle tossine prodotte da *Ostreopsis cf. ovata*. Ci si propone di mettere a punto una metodologia per la determinazione delle tossine sia da campioni di alimenti di origine marina che su specie animali che si sviluppano nella stessa nicchia ecologica di *Ostreopsis cf. ovata*, di modo da poter beneficiare di un sistema di controllo analitico a monte della catena alimentare stessa.

L'individuazione di metodiche analitiche per la rivelazione ed il dosaggio della tossina sarà rivolta sia ad un approccio biotossicologico (mouse test) che chimico in HPLC utilizzando come rivelatore l'analizzatore di massa a tempo di volo (TOF).

Le condizioni cromatografiche utilizzate negli esperimenti HPLC-TOF-MS derivano da un attento studio della bibliografia tenendo conto delle differenze strumentali (gli strumenti utilizzati sino ad oggi erano LC-MS-MS) e fanno sì che il lavoro si sia articolato su due distinte fasi:

❖ **FASE I: studio in modalità a ioni positivi**

*Colonna:* TSK-GEL AMIDE-80

*Fase Mobile:* A = 0.1% Acido Formico in Acqua; B = 0.1% Acido Formico in Acetonitrile

*Eluizione a gradiente:* t = 0 min, 20% B; t = 2 min, 20% B; t = 6 min, 80% B

*Flusso:* 0.3 ml/min

*Volume di iniezione:* 10 µl

❖ **FASE II: studio in modalità a ioni negativi**

*Colonna:* Phenomenex Luna PFP(2) 150x2.00mm

*Fase Mobile:* A = 0.1% Acido Formico in Acqua; B = Acetonitrile

*Eluizione a gradiente:* t = 0 min, 20% B; t = 2 min, 20% B; t = 6 min, 80% B

*Flusso:* 0.2 ml/min

*Volume di iniezione:* 5 µl

## Riferimenti

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S.G., Tartaglione, L., Grillo, C., Melchiorre, N., 2006. "The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography mass spectrometry method." *Anal. Chem.* **78**, 6153–6159.

Penna, A., Vila, M., Fraga, S., Giacobbe, M.G., Andreoni, F., Riobò, P., Vernesi, C., 2005. "Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8s rDNA sequences." *J. Phycol.* **41**, 212–225.

Sansoni G., Borghini B., Camici G., Casotti M., Righini P., Rustighi C. 2003, "Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* (Gonyaulacales:Dinophyceae): un problema emergente" *Biologia Animale*, **17**, 17-23

Simoni F., di Paolo C., Gori L., Lepri L. , 2004. "Further investigation on blooms of *Ostreopsis ovata*, *Coolia monotis*, *Prorocentrum lima*, on the macroalgae of artificial and natural reefs in the northern Tyrrhenian Sea" *Harmful Algae News* **26**, 5-7

Zingone, A., Siano, R., D'Alelio, D., Sarno, D., 2006. "Potentially toxic and harmful microalgae from coastal waters of the Campania region (Tyrrhenian Sea, Mediterranean Sea)." *Harmf. Algae* **5**, 321–337.

## Capitolo 1

### 1.1 Biotossine marine

#### 1.1.1 Biotossine marine

Le biotossine marine sono un gruppo eterogeneo di composti strutturalmente divisi che possono essere raggruppati in base alla loro solubilità ai solventi in:

-idrosolubili (PSP, ASP, TTX)

-liposolubili (NSP, DSP, ciguatossina, palitossina)

La **PSP** (Paralytic Shellfish Poisoning) viene contratta dall'uomo con l'ingestione del mollusco che contiene queste tossine. La PSP viene accumulata dal mollusco che filtra l'acqua contenente le tossine o le alghe che producono queste tossine. I sintomi che determinano la PSP nell'uomo, variano, da un formicolio alla paralisi respiratoria che porta alla morte. La sindrome PSP è causata dalla saxitossina (una tossina idrosolubile di natura basica derivante da un nucleo purinico) e da 18 altri composti con proprietà chimiche simili. Le PSP si possono suddividere in quattro sottogruppi in base ai gruppi sostituenti e differiscono di tossicità a seconda del quarto gruppo sostituito. La STX risulta essere la più tossica. Le tossine di PSP sono prodotte principalmente da una dinoflagellata che appartiene al genere *Alexandrium* e che si trova sia nelle zone tropicali che temperate ed in una specie di alghe blu-verde.

Le tossine **ASP** (Amnesic Shellfish Poisoning) sono state isolate da una varietà di fonti marine incluse micro- e macroalghe. La sindrome ASP è causata dall'acido domoico (DA), un amminoacido neurotossico che agisce sui recettori degli amminoacidi eccitabili (ac. glutammico ed ac. aspartico) e quindi sulla trasmissione sinaptica solubile in acqua.

Le tossine **NSP** (Neurotoxin Shellfish Poisoning) sono prodotte da dinoflagellate come le *Gymnodium*. Queste tossine sono dannose per i pesci, mammiferi marini, uccelli e l'uomo ma non per i molluschi.

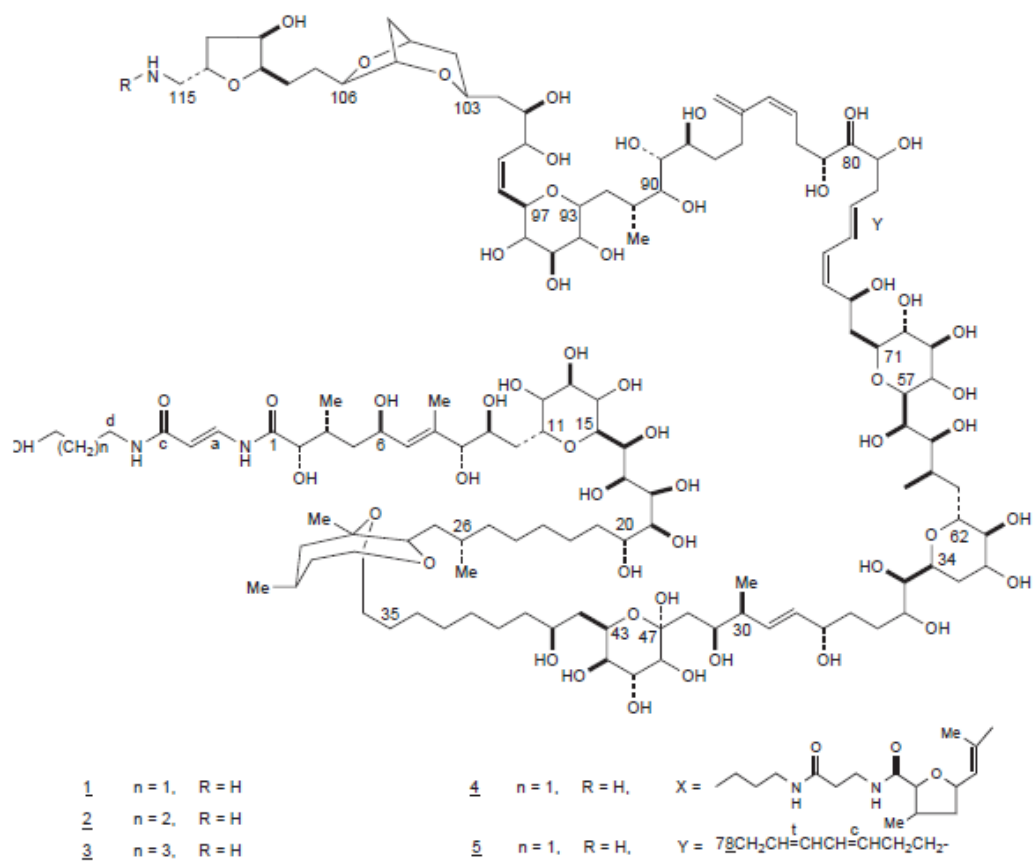
Le tossine **DSP** (Diarrheic Shellfish Poisoning) sono prodotte principalmente da dinoflagellate e la loro produzione può variare da specie a specie e dalla stagione. Sono solubili e tendono ad accumularsi nei tessuti grassi dei bivalvi. L'ingestione di

DSP determina disturbi gastrointestinali ed un dolore addominale che inizia 30 minuti dopo l'assimilazione. Il recupero completo si ottiene dopo 3 giorni.

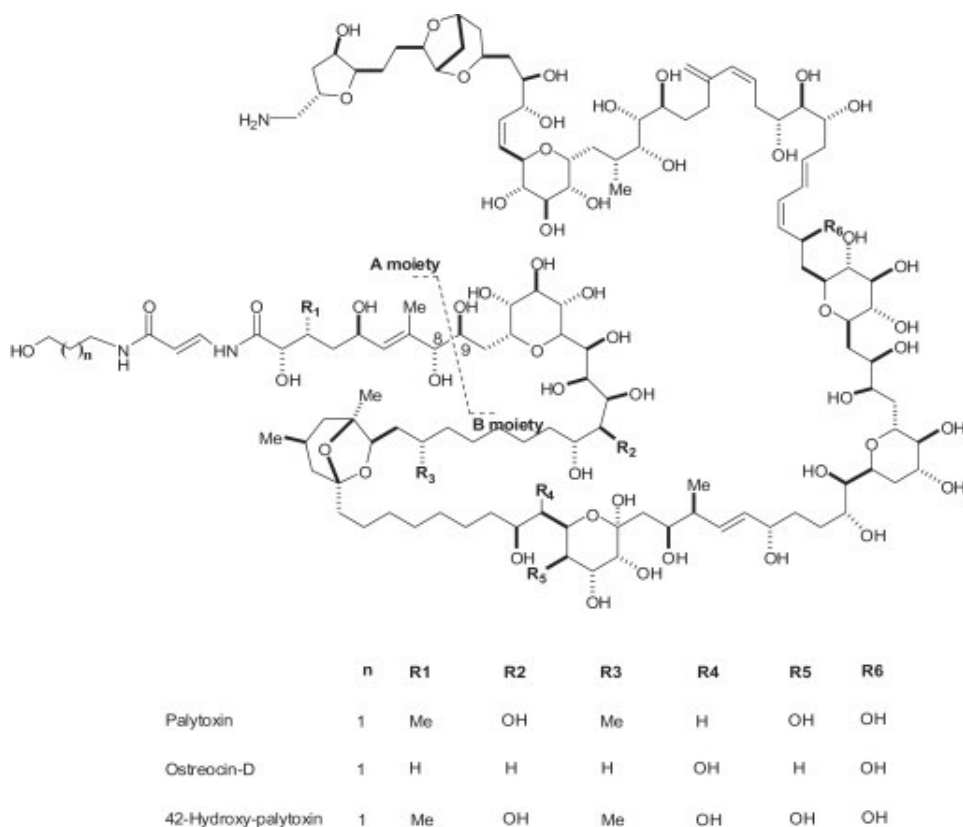
### 1.1.2 Palitossine e Ostreocina D.

Le tossine del gruppo della Palitossina (PITX) sono biotossine marine rilevate principalmente negli zoantidi (coralli molli) del genere *Palythoa* e nei dinoflagellati bentici del genere *Ostreopsis*. Sebbene le tossine del gruppo PITX siano state identificate inizialmente nelle Hawaii e in Giappone, attualmente sono presenti in tutto il mondo. Fioriture di *Ostreopsis spp.* sono state identificate recentemente in quattro Paesi europei: Francia, Grecia, Italia e Spagna. La presenza di *Ostreopsis spp.* può comportare la contaminazione delle specie di molluschi destinati al consumo umano. La struttura della PITX (Figura 1; formula minima  $C_{129}H_{223}N_3O_{54}$ ; peso molecolare 2678.479594 Dalton) è convenzionalmente suddivisa in una catena alifatica poli-idrossilata di 115 atomi di carbonio (la più lunga tra i composti naturali, detta palitossina acido carbossilico) e una coda di 3-amido-N-(3-idrossipropil)-acrilamide, unita al C1 della catena alifatica da un legame ammidico. Si conoscono almeno 7 diversi analoghi di PITX: PITX, Homo-palitossina, Bis-homo-palitossina, Neo-palitossina, Deossi-palitossina (Fig 1), Ostreocina-d e 42-idrossi-palitossina (Fig 2).





**Figura 1.** Struttura completa delle Palitossine in *P. Tuberculosis*: (1) Palitossina, (2) Homopalitossina, (3) Bishomopalitossina, (4) Neopalitossina e (5) Deossipalitossina. (Uemura et al. 1985)



**Figura 2.** Struttura della 42-OH-palitossina e dell' Ostreocina-D paragonate alla Palitossina, (Ciminiello et al 2009)

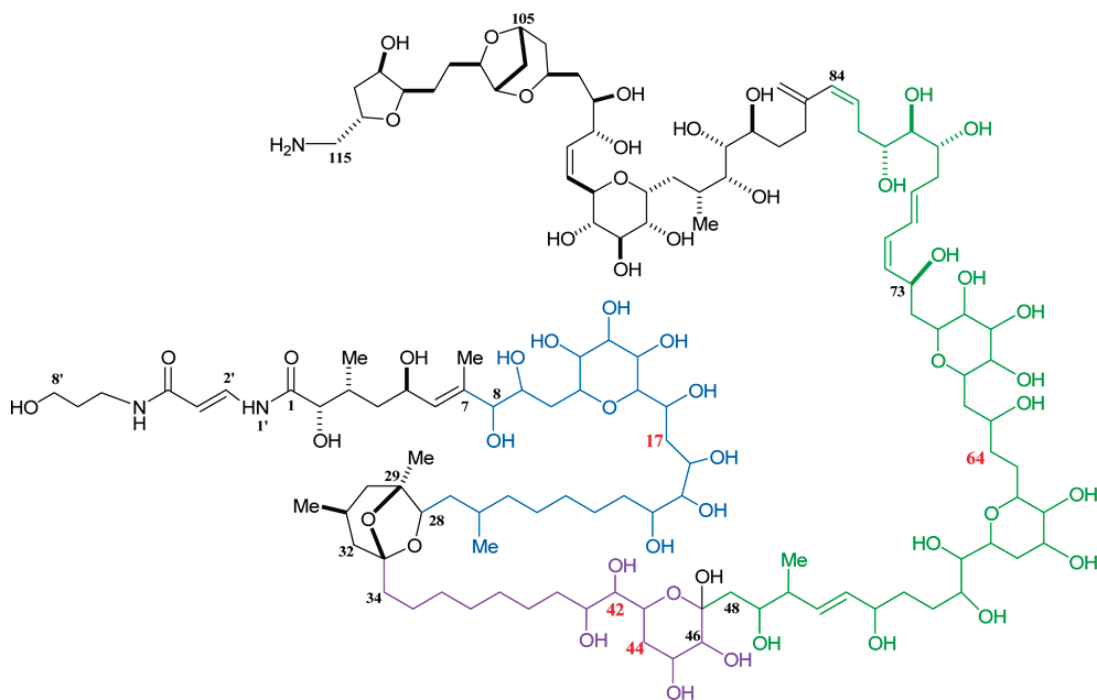
I dati di presenza registrati nei paesi europei sono stati limitati e hanno riguardato solo PITX nei mitili e nei ricci di mare. Attualmente non esistono regolamenti riguardo alle tossine del gruppo PITX nei molluschi né nell'Unione Europea (UE) né in altre regioni del mondo. La sintomatologia dell'intossicazione da tossine del gruppo PITX non è ben definita, ma include mialgia e debolezza accompagnate eventualmente da febbre, nausea e vomito. L'esito è raramente fatale, sebbene siano stati riportati alcuni casi gravi in cui i pazienti sono deceduti dopo circa 15 ore. La banca dati tossicologica è limitata e comprende solamente alcuni studi sulla tossicità acuta attraverso vari metodi di somministrazione in varie specie animali. La tossicità di PITX dipende in larga misura dalla via di somministrazione; negli animali da esperimento, PITX e Ostreocina-d risultano molto meno tossici se somministrati per via orale piuttosto che per via parenterale. Tossicità acuta e decessi sono stati riportati in episodi umani, ma non esistono dati quantitativi affidabili inerenti la tossicità acuta delle tossine del gruppo PITX sull'uomo. Le tossine del gruppo PITX sono molto tossiche, principalmente per interferenza con la pompa ionica  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -

ATPasi. L'assenza di studi sulla tossicità a lungo termine rende impossibile fissare una dose giornaliera tollerabile (TDI); considerando la tossicità acuta delle tossine del gruppo PITX, il gruppo CONTAM ha deciso di fissare, come punto di riferimento, una dose acuta di riferimento (ARfD) di 200 µg/kg di peso corporeo in base al livello più basso in cui è osservabile l'effetto nocivo (LOAEL) di tossicità orale nei topi. Si è notato che la somministrazione sublinguale di PITX di circa 200 µg/kg di peso corporeo causa tossicità sistemica. Poiché non è stato possibile escludere l'assorbimento di PITX per via transmucosa orale e poiché i topi sembrano essere meno sensibili di altre specie, il gruppo CONTAM ha deciso di applicare un fattore di incertezza supplementare di 10, oltre ai fattori di incertezza predefiniti di 10 per la variazione sia intra- che inter-specie, ed ha fissato un'ARfD orale di 0.2 µg/kg di peso corporeo. Questa ARfD si applica alla somma di PITX e Ostreocina-d (EFSA)

Gli effetti tossici prodotti sono una potente vasocostrizione, depressione della funzione cardiaca, ischemia e danno al miocardio, fibrillazione ventricolare e blocco cardiaco. Sintomi: sapore metallico o amaro, nausea, ipersalivazione, vomito, dolori addominali, diarrea, paralisi degli arti inferiore, spasmi muscolari e difficoltà respiratoria. Casi mortali da Palitossine sono stati attribuiti a persone che avevano mangiato pesci e crostacei.

### 1.1.3 Ovatossine.

A partire dal 1998 lungo le coste Italiane vengono registrate massive fioriture della microalga marina tossica *Ostreopsis ovata*, un dinoflagellato bentonico originario dei mari tropicali (Sansoni et al., 2003). Studi effettuati da numerosi un gruppo di ricerca italiano, in concomitanza a intense fioriture dell'alga associate a intossicazioni umane verificatesi lungo le coste genovesi nelle estati 2005 e 2006, hanno permesso di individuare nella palitossina ed in un suo nuovo analogo, l'Ovatossina-a (OvTX-a) (Fig. 3), gli agenti tossici prodotti da *O. ovata* (Ciminiello et al., 2006, Ciminiello et al., 2008).



**Figura 3.** Struttura della Ovatoxina-a paragonata alla Palitossina. In rosso le differenze tra le due molecole. Anche per la Ovatoxina-a, come già visto per la Palitossina, la rottura del legame tra C8 e C9 porta alla formazione della A moiety ( $m/z$  327). (Ciminiello et al 2012)

Analisi in LC-MS hanno permesso di identificare altre tossine nelle colture di *O. ovata*: OvTX-b, -c, -d, -e, ed -f, (Ciminiello et al, 2010; Rossi et al. 2010, Ciminiello et al. 2012). Studi quantitativi, effettuati su colture di *O. ovata* hanno inoltre evidenziato che l'OvTX-a, rappresenta il componente principale prodotto dalla microalga.

La diffusione di queste microalghe aumenta nel mondo ogni anno e questo rappresenta una potenziale minaccia per la salute umana. Le fioriture di *Ostreopsis ovata* sono registrate ogni estate da alcuni anni a questa parte in alcune zone del Mediterraneo, Italia compresa. In queste aree, per ora, non si registrano casi di intossicazione umana per consumo di prodotti ittici.

#### 1.1.4 Mascarenotossine.

Nel 1996, nell'isola di Rodrigues (situata a nord est di Mauritius, nell'Oceano Indiano), fu segnalato un bloom algale di *Ostreopsis mascarenensis*. L'estratto metanolico e la frazione butanolica di queste alghe è risultato tossico mediante test biotossicologico ( $LD_{50} \sim 0.9$  mg/kg – dove per  $LD_{50}$  si definisce la dose di una

sostanza, somministrata in una volta sola, in grado di uccidere il 50% di una popolazione campione di cavie) inducendo sintomi simili a quelli provocati dalla Palitossina, ma senza diarrea. Inoltre, sia l'estratto metanolico che la frazione butanolica, hanno mostrato l'attività emolitica tipica della Palitossina.

La frazione butanolica venne successivamente analizzata mediante HPLC-DAD e paragonata allo standard della Palitossina. Da questa analisi si ottennero due picchi di assorbimento a 233 e 263 nm, identici a quelli riscontrati per la Palitossina. I due picchi vennero successivamente raccolti separatamente ed identificati col nome di Mascarenotossina-a (McTX-a) e Mascarenotossina-b (McTX-b) (Lenoir et al. 2004). Il profilo di frammentazione ottenuto dall'analisi in LC-MS/MS delle due molecole è risultato molto simile a quello della Palitossina, anche se la massa molecolare era stata stimata inferiore (tra 2500 e 2535 Da). Studi successivi hanno permesso di identificare una nuova Mascarenotossina (McTX-c) nell'estratto di una coltura di *Ostreopsis cf. ovata* e di identificare il peso molecolare sia della McTX-a (2588 Da) che della McTX-c (2628 Da).

## Riferimenti

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S.G., Tartaglione, L., Grillo, C., Melchiorre, N., 2006. "The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography mass spectrometry method." *Anal. Chem.* **78**, 6153–6159.

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Grillo, C., Melchiorre, N., 2008. "Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak." *J. Am. Soc. Mass Spectr.* **19**, 111–120.

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Florio, C., Lorenzon, P., De Bortoli, M., Tubaro, A., Poli, M., Bignami, G., 2009. "Stereostructure and biological activity of 42-hydroxy-palytoxin: a new palytoxin analogue from Hawaiian *Palythoa* subspecies." *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 1851–1859.

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Guerrini, F., Pistocchi, R., 2010. "Complex palytoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry." *Rap. Comm. Mass Spectrom.* **24**, 2735–2744.

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Guerrini, F., Pezolesi, L., Pistocchi, R., Vanucci, S., 2012 "Isolation and structure elucidation of Ovatoxin-a, the major toxin produced by *Ostreopsis ovata*" *Journal of the American Chemical Society*, **134** 1869–1875

EFSA - Parere scientifico sulle biotossine marine nei molluschi e crostacei – Gruppo della palitossina 15 dicembre 2009

Lenoir, S., Ten-Hage, L., Quod, J.P., Bernard, C., Hennion, M.C., 2004. “First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dinophyceae) benthic bloom in southwestern Indian Ocean.” *J. Phycol.* **40**, 1042–1051.

Rossi, R., Castellano, V., Scalco, E., Serpe, L., Zingone, A., Soprano, V., 2010. “New palytoxin-like molecules in Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* (dinoflagellates) and in *Palythoa tuberculosa* detected by liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry.” *Toxicon* **56**, 1381–1387.

Sansoni G., Borghini B., Camici G., Casotti M., Righini P., Rustighi C. 2003, “Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* (Gonyaulacales:Dinophyceae): un problema emergente” *Biologia Animale*, **17**, 17-23

Uemura, D., Hirata, Y., Iwashita, T., Naoki, H., 1985. “Studies on palytoxin.” *Tetrahedron* **41**: 1007-1017.

## Capitolo 2

### 2.1 Metodi analitici impiegati

La tecnica analitica su cui è stata focalizzata l'attenzione è stata la Spettrometria di Massa accoppiata alla cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS).

#### 2.1.1 Spettrometria di Massa

La spettrometria di massa consiste in un insieme di tecniche analitiche, particolarmente usate in chimica organica, che consentono di misurare le masse molecolari e di determinare quindi la formula di struttura di composti conosciuti o analiti, anche avendone a disposizione piccole quantità.

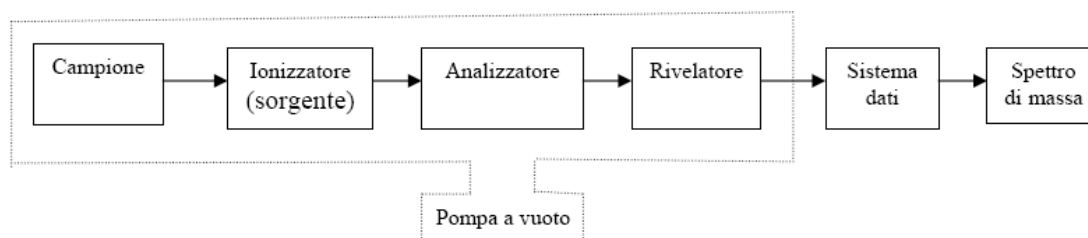
Alle molecole dell'analita viene trasferita dell'energia in modo da produrre la loro ionizzazione. Tale varietà di ioni molecolari costituisce lo spettro di massa.

Nell'interpretazione dello spettro di massa risulta di notevole importanza l'analisi isotopica.

Quest'ultima consiste nella determinazione della distribuzione degli isotopi di un elemento in un campione. In natura ogni elemento ha una distribuzione isotopica fissa infatti, eccetto pochi elementi monoisotopici, tutti gli altri hanno una distribuzione caratteristica che si ritrova in maniera additiva nelle sostanze in cui entrano in composizione.

L'interpretazione dei dati si completa con l'analisi della frammentazione che segue regole caratteristiche per ogni classe di composti.

In figura x viene rappresentata schematicamente la composizione di uno spettrometro di massa classico:



Lo strumento da me utilizzato in questo studio è un HPLC-ESI-TOF: uno spettrometro di massa con rivelatore a tempo di volo, quindi descriveremo in dettaglio i suoi componenti.

- *Introduzione del campione.*

L'introduzione del campione nella camera di ionizzazione è stata fatta allo stato liquido usando un sistema HPLC come ingresso dello spettrometro di massa. Questa tecnica è estremamente utile nell'analisi di miscele di prodotti.

- *Sorgente ionica*

Il sistema di ionizzazione svolge un ruolo essenziale nella spettrometria di massa, perché da esso dipende anche il numero, la natura e l'abbondanza dei frammenti molecolari che compaiono nello spettro di massa. Per questo motivo le tecniche utilizzate sono numerose e alcune di esse danno origine a particolari varianti nella spettrometria di massa. L' *Electron Spray Ionisation (ESI)* è una tecnica che permette di nebulizzare il campione, sciolto in un solvente polare, a pressione atmosferica dentro la camera di ionizzazione attraverso un ago tenuto ad un alto potenziale elettrico

Le goccioline di spray, che si sono caricate positivamente per azione del campo elettrico, vengono attratte verso una "lente di estrazione di ioni", che grossolanamente è costituito da un capillare mantenuto sotto vuoto e a un potenziale negativo; in tal modo il solvente evapora e gli ioni carichi sono accelerati verso l'analizzatore.

- *Analizzatore a tempo di volo*

Il principio su cui si basa questo analizzatore è che ioni di differente valore massa/carica hanno uguale energia, ma differente velocità dopo l'accelerazione subita nella camera di ionizzazione.

Ne deriva che il tempo che ciascuno mette per attraversare l'analizzatore è differente.

- *Rivelatore*

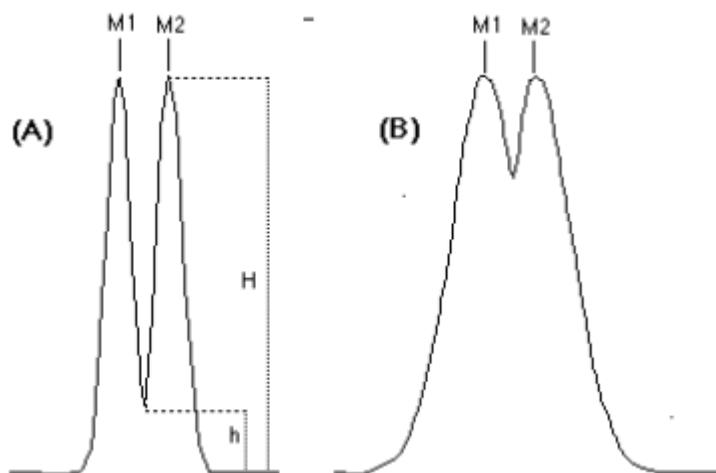
Come collettore e rivelatore degli ioni si usa comunemente un moltiplicatore elettronico, costituito da una serie di elettrodi in cascata. Quando uno ione arriva sul



primo elettrodo questo emette un fascio di elettroni che vanno a colpire il secondo elettrodo, il quale a sua volta emette una quantità maggiore di elettroni e così via. Il risultato è una forte amplificazione del segnale che viene poi digitalizzato ed elaborato infine dal calcolatore dello spettrometro per la presentazione dello spettro di massa.

- *Risoluzione dello strumento*

Il potere risolutivo dello strumento determina la capacità di separare tra di loro ioni di uguale massa nominale ma diversa massa esatta. Nell'esame delle caratteristiche di uno strumento e' necessario stabilire cosa si intenda per "separare". Nella figura, gli ioni sono in entrambi i casi separati, ma ovviamente la risoluzione e' maggiore nel caso A. I dati di potere risolutivo sono per convenzione misurati su coppie di segnali separati tra di loro da una valle (h) alta il 10% dell'altezza (H).



Il potere risolutivo viene quindi definito come:

$$\text{Potere Risolutivo} = \frac{\text{Massa 1}}{\text{Massa 2} - \text{Massa 1}}$$

Il livello di informazione che possiamo ottenere da uno spettrometro di massa dipende dal suo potere risolutivo. Strumenti a bassa risoluzione forniscono solo la massa nominale degli ioni. Strumenti ad alta risoluzione forniscono la massa esatta degli ioni, che in genere, definisce univocamente la composizione elementare degli ioni corrispondenti. Ad esempio, in uno strumento a bassa risoluzione CO (27.9949), C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (28.0313) ed N<sub>2</sub> (28.0061) forniscono un unico segnale a massa nominale 28;

in uno strumento ad alta risoluzione si possono osservare invece tre ioni separati di massa esatta. Il rivelatore TOF permette di individuare la massa di una sostanza con una precisione nell'ordine della quarta cifra decimale. La determinazione della massa accurata permette così l'identificazione pressoché univoca degli analiti. Questa capacità strumentale risponde in modo ottimale alla necessità di individuare le sostanze attive di nostro interesse ed inoltre rende possibile l'individuazione di tossine che si diversificano tra loro solo per pochi sostituenti. Altra peculiarità di estremo interesse per gli scopi di questa ricerca è la caratteristica del TOF di lavorare sempre in scansione rilevando tutti gli analiti presenti (non essendoci vantaggi di incremento di sensibilità nel selezionare l'acquisizione di solo alcuni ioni di interesse per la sostanza target cosa che invece avviene tipicamente per i quadrupoli o ancor di più per i rivelatori massa-massa). In questo modo, archiviati i file di dati, è possibile consultarli anche a distanza di tempo per verificare la presenza/assenza di sostanze non conosciute o non investigate al momento dell'analisi. Questa peculiarità permette di riprocessare rapidamente i dati acquisiti nel corso della ricerca ogni qualvolta dovesse sorgere l'interesse nel verificare la presenza/assenza di una sostanza di interesse in una determinata coltura o campione di mitili.

- *Spettro di Massa*

Lo spettro di massa si presenta quindi come un insieme di linee verticali (*picchi*) di intensità diversa, ciascuna corrispondente al valore di massa di uno ione frammento. Il picco a valore di massa più elevato è quello relativo allo ione molecolare. In genere, la corrente ionica è normalizzata a 100, ossia il picco più alto (*picco base*) ha valore 100, indipendentemente dal suo valore assoluto. Dallo spettro di massa si può risalire dunque alla struttura di un composto incognito, attribuendo ai singoli ioni una composizione elementare e ricostruendo i meccanismi di frammentazione seguendo schemi tipici per le varie classi di composti. Nell'interpretazione di uno spettro si segue una procedura abbastanza semplice:

1. identificazione dello ione molecolare.
2. identificazione di ioni caratteristici.
3. identificazione di processi di frammentazione caratteristici.
4. ricostruzione della struttura della molecola sulla base della conoscenza di meccanismi di frammentazione standard

## 2.2 Metodi analitici di rivelazione delle Palitossine.

Generalmente i metodi analitici vengono suddivisi in due gruppi: i saggi biologici e le analisi chimico-strumentali. I saggi biologici includono il saggio di tossicità sul topo o sul ratto, i saggi in vitro di citotossicità, i saggi biochimici di inibizione della fosfatasi o recettoriali, i saggi immunologici ELISA e RIA. Essi sono rapidi, molto sensibili e realizzabili a bassi costi, tuttavia non forniscono informazioni quantitative sul contenuto tossico di un campione biologico, sono soggetti a falsi positivi, e, soprattutto, non forniscono informazioni dettagliate sulla natura delle singole sostanze responsabili della tossicità. È per questo motivo che sono richiesti metodi strumentali che rispondano a requisiti di sensibilità, precisione e specificità come i metodi in LC-MS.

### 2.2.1 Saggi biologici: tossicità sul topo

I Bioassay o test biotossicologici sono un potente strumento per la valutazione reale dell'impatto ambientale di un composto chimico o di un qualunque agente di stress. Come il termine stesso chiarisce si tratta di utilizzare strutture biologiche quanto più possibili correlabili all'uomo per saggiare la capacità tossica di uno o più composti chimici nei confronti dell'essere umano.

I metodi di test biologici, combinati con quelli chimici, debbono permettere :

- l'identificazione, mediante analisi strumentale quali-quantitativa delle molecole presenti nel concentrato;
- la caratterizzazione chimico-fisica delle molecole stesse;
- la valutazione degli effetti tossici a breve o a lungo termine, mediante test in vivo o in vitro;
- l'estrapolazione dai dati relativi alle analisi chimiche e tossicologiche della relazione dose-risposta e delle relazioni tra struttura ed attività biochimica delle molecole.

L'utilizzazione dei test di tossicità è sempre fondamentale in quanto la determinazione chimica quali-quantitativa delle sostanze presenti nel campione concentrato non è sempre sufficiente a dare informazioni riguardanti gli effetti su

organismi viventi ed inoltre non può valutare gli eventuali *effetti sinergici* tra le sostanze o gli effetti determinati dal loro accumulo nell'organismo.

Mediante estrapolazione dei dati di tossicità ricavati da test di bioassay, invece, si può ricavare un'indicazione del rischio potenziale a cui può andare incontro una popolazione che utilizza, per esempio, a scopo alimentare un certo tipo di animali.

Molti sono i test messi a punto in tutto il mondo, tra tutti, noi abbiamo utilizzato la metodica prevista dal Decreto Ministeriale del 16-05-2002 Protocollo 2 – Step 1 e Step 2, qui di seguito brevemente descritta.

Questa procedura ha lo scopo di determinare alcuni tipi di tossine nei molluschi bivalvi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini. Il metodo è semiquantitativo. La quantità di tossina capace di uccidere un topo di 18-20 g entro le 24 ore, dopo iniezione intraperitoneo, è definita unità topo (UT). Per iniezione intraperitoneale la Palitossina è eccezionalmente tossica. LD<sub>50</sub> di Palitossina pura, in topo, è di 0,72 µg/kg p.c.. La Palitossina è meno tossica se somministrata per via orale LD<sub>50</sub> di 510 µg/kg p.c.. (Rhodes et al, 2002) specie Swiss albina di peso compreso tra 18-20gr.

1. Il campione di prova viene lavato esternamente, si prelevano 100 g di corpo intero e si omogeneizza finemente;
2. Si aggiungono all'omogenato 300 ml di acetone e si centrifuga a 3000 rpm per 5 minuti, successivamente si raccoglie il surnatante in un pallone da 1000 ml.
3. Riprendiamo il residuo, lo estraiamo nuovamente con 300 ml di metanolo e si centrifuga a 3000 rpm per 5 minuti.
4. Il surnatante si raccoglie nel pallone da 1000 ml (insieme all'estratto acetone) e viene fatto evaporare sotto pressione ridotta.
5. Circa 50 ml di residuo vengono trasferiti in un imbuto separatore con 30 ml di diclorometano e 60 ml di metanolo al 60%.
6. Terminata la separazione delle due fasi, l'estratto metanolico viene raccolto in un cilindro da 200 ml mentre l'estratto diclorometanico viene lavato una seconda volta con 60 ml di metanolo al 60%.
7. Gli estratti metanolici vengono riuniti e si porta a volume di 200 ml con metanolo al 60%; l'estratto diclorometanico viene portato a secco sotto pressione ridotta.

8. 16 ml della soluzione metanolica acquosa vengono portati a secco sotto pressione ridotta.
9. Entrambi gli estratti vengono ripresi con 4 ml di Tween 60 all'1% di cui 3 ml vengono inoculati in tre topi di 18-20 g per ciascun estratto.
10. La morte di due dei tre topi entro 24 h indica la presenza di DSP nell'estratto diclorometanico o di Palitossina nell'estratto metanolico ed il test è considerato positivo.

I primi test biotossicologici sono stati effettuati utilizzando lo standard della Palitossina sia per la verifica del metodo, sia al fine di individuare delle caratteristiche risposte comportamentali negli animali così da poter essere in grado di distinguere la presenza di tali tossine anche solo in seguito all'osservazione dei sintomi presentati dalle cavie (D.M. 16 Maggio 2002).

### 2.2.2 Metodi chimici

- *Spettrometrie:*

Nello spettro della luce ultravioletta e visibile, la tossina possiede un picco di assorbimento a 233 nm, determinato dalla presenza nella molecola dei dieni coniugati, e uno a 263 nm, dato dal gruppo 3-amido-N-(3-idrossipropil)-acrilamidico all'estremità idrossiterminale. Il rapporto tra l'assorbimento della molecola a 233 nm e quello a 263 nm è pari a 1.7 ed, essendo caratteristico della Palitossina, esso viene considerato un "marker" indicatore di questo composto (Moore e Scheuer, 1971; Moore et al., 1975). In spettrometria a raggi infrarossi (IR) la tossina ha un picco attorno a 1650 cm<sup>-1</sup>, dato dal gruppo amidico alfa-beta insaturo all'estremità idrossiterminale (Moore e Scheuer, 1971). Lo scarso limite di rilevazione riportato per le tecniche spettrofotometriche (5 µg/ml di PITX in acqua) limita l'applicabilità di tali metodi di analisi per campioni naturali (Mereish et al., 1991).

- *Spettrometria accoppiata alla cromatografia:*

Molto più sensibile e più usata nell'analisi di campioni naturali è la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa, attualmente considerata il metodo più affidabile per l'analisi delle Palitossine. L'LC-MS si è dimostrato uno strumento estremamente utile per la determinazione qualitativa e quantitativa delle tossine nel

plankton e nei mitili, per l'identificazione di nuove tossine e la ricerca sul metabolismo delle tossine nei molluschi eduli (Quilliam M.A., 1996; Quilliam M.A. 1997). Metodi analitici basati sulla combinazione LC-MS sono stati sviluppati per le principali classi di biotossine marine: acido domoico e altre ASP tossine, acido okadaico e altre DSP tossine, saxitossina e altre PSP tossine, brevitossina, spirolidi e ciguatossina. È, infatti, questa la sola tecnica che si è dimostrata valida per l'analisi di tutte le tossine e che soddisfa le esigenze sia dei laboratori interessati al monitoraggio che alla ricerca sulle biotossine marine. L'accoppiamento LC-MS fornisce infatti:

- Possibilità di rivelazione universale
- Alta sensibilità, con limiti di rivelazione nell'ordine delle parti per bilione
- Alta selettività e specificità
- Minimo clean-up del campione
- Possibilità di esaminare tossine labili e molto diverse strutturalmente
- Quantificazione accurata e precisa
- Ampio range di risposta lineare
- Possibilità di automazione
- Alta produttività
- Rapidità nella messa a punto di metodi analitici
- Accettabilità legale negli studi confirmatori
- Informazioni strutturali per l'identificazione di nuove tossine, analoghi di tossine note e metaboliti.

La metodica di estrazione delle tossine dal pellet sviluppata nel corso di questo progetto di ricerca è la seguente:

- 1) Il campione di pellet viene lasciato scongelare per circa 20 minuti;
- 2) Le cellule vengono sonicate per 10 minuti in bagnetto ad ultrasuoni;
- 3) Si aggiungono 1000 µl di Metanolo-Acqua (1:1) e si agita su vortex per circa 3 minuti;
- 4) Si ripete la sonicazione per 10 min.;
- 5) Si centrifuga a 4000 rpm per 5 min.;
- 6) Si raccoglie il surnatante in una provetta di vetro da 10 ml;
- 7) Si aggiungono nuovamente 1000 µl di Metanolo-Acqua (1:1) al pellet e si agita su vortex per circa 3 min.;

- 8) Si ripetono i punti 4, 5 e 6 (per 2 volte) e si uniscono i surnatanti;
- 9) Si portano a secco gli ml raccolti sotto corrente di azoto ad una temperatura di 45°C;
- 10) Il residuo secco viene ripreso con 500 µl di Metanolo-Acqua (1:1);
- 11) Si centrifuga a 2000 rpm per 5 min.;
- 12) Si ultracentrifuga in filtri Millipore Ultrafree da 0,45 µm a 9000 giri per 10 min.;
- 13) Il campione è ora pronto per l'analisi cromatografica o può essere conservato a -18°C fino al momento dell'analisi.

L'estrazione delle tossine dai mitili è la stessa utilizzata per il mouse test (D.M. 16-05-02), nei casi in cui la quantità di tossina non fosse determinabile nell'estratto tal quale è stata applicata una procedura di concentrazione e purificazione mediante colonnine SPE Oasis (Waters):

- 1) 8 ml di estratto metanolico al 60% viene portato a secco in rotavapor;
- 2) Il residuo secco viene ripreso con 2 ml di metanolo:acqua (1:1);
- 3) Si condizionano le colonnine con 3 ml di metanolo al 100% e 3 ml di acqua;
- 4) Si pipettano i 2 ml di estratto concentrato nella colonnina e si lascia eluire senza raccogliere;
- 5) Si aggiungono 3 ml di metanolo al 5% come lavaggio;
- 6) Si eluiscono le nostre sostanze di interesse con 3 ml di metanolo al 100% e si raccolgono in provetta di vetro da 10 ml;
- 7) L'eluato viene portato a secco sotto corrente di azoto ad una temperatura di 45°C;
- 8) Il residuo secco viene ripreso con 500 µl di Metanolo-Acqua (1:1);
- 9) Si centrifuga a 2000 rpm per 5 min.;
- 10) Si ultracentrifuga in filtri Millipore Ultrafree da 0,22 µm a 9000 giri per 5 min.;
- 11) Il campione è ora pronto per l'analisi cromatografica o può essere conservato a -18°C fino al momento dell'analisi.

## **Riferimenti**

Decreto Ministeriale 16/05/2002, "Tenori massimi e metodiche di analisi delle biotossine algali nei molluschi bivalvi vivi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini." *Gazzetta Ufficiale*, **165** del 16 Luglio 2002

- Keller, M.D., Selvin, R.C., Claus, W. and Guillard, R.R.L. 1987. "Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton." *J. Phycol.* **23**, 633-638.
- Mereish, K.A, Morris, S., Mc Cullers, G., Taylor, T.J. & Bunner, D. L., 1991. "Analysis of palytoxin by liquid chromatography and capillary electrophoresis." *J. Liquid. Chromatogr.*, **14**, 1025-31.
- Moore, R.E., Scheuer, P.J., 1971 "Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate" *Science*, **172** 495-498
- Moore, R.E., Dietrich, R.F., Hatton, B., Higa, T. and Scheuer, P.J., 1975. "The nature of the 263 chromophore in the palytoxins." *J. Org. Chem.*, **40**, 540.
- Quilliam M. A.; 1996, *Applications of LC-MS in Environmental Chemistry*, Elsevier Science Publ. BV, Amsterdam, , 415.
- Quilliam M. A.; 1997, *Harmful Algae Proc. VIII International Conference on Harmful Algae*, Vigo Spain, p 509.
- Quilliam, M.A.; Hess, P.; Dell'Aversano, C. 2001, In: *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Century*, Eds: W.J. deKoe, R.A. Samson, H.P. van Egmond, J. Gilbert and MMM. Sabino, , pp. 383.
- Rhodes, L., Towers, N., Briggs, L., Munday, R., Adamson, J., 2002. "Uptake of palytoxyn-like compounds by shellfish fed *Ostreopsis siamensis* (Dinophyceae)." *N. Z. J. of Mar. and Freshw. Res.* **36**, 631-636



## Capitolo 3

### 3.1 Determinazione della Palitossina nello standard mediante HPLC-TOF-MS.

#### 3.1.1 Parte sperimentale e Risultati

##### ❖ FASE I: studio in modalità a ioni positivi

I campioni analizzati nel corso di questo studio sono stati consegnati all'Istituto dall'ARPAC e dalla Stazione Zoologica "A. Dohrn" di Napoli.

Le analisi chimiche sono state effettuate utilizzando un HPLC Agilent 1100 Series con autocampionatore e come rivelatore uno spettrometro di massa a tempo di volo (TOF) Agilent.

Le condizioni cromatografiche utilizzate negli esperimenti HPLC-TOF-MS sono state impostate in seguito ad un attento studio della bibliografia ed adattate secondo le differenze strumentali (gli strumenti utilizzati sino ad oggi erano LC-MS-MS) e comprendono:

*Colonna:* TSK-GEL AMIDE-80

*Fase Mobile:* A = 0.1% Acido Formico in Acqua; B = 0.1% Acido Formico in Acetonitrile

*Eluizione a gradiente:* t = 0 min, 20% B; t = 2 min, 20% B; t = 6 min, 80% B

*Flusso:* 0.3 ml/min

*Volume di iniezione:* 10 µl

In tali condizioni la Palitossina eluisce a circa 9 minuti.

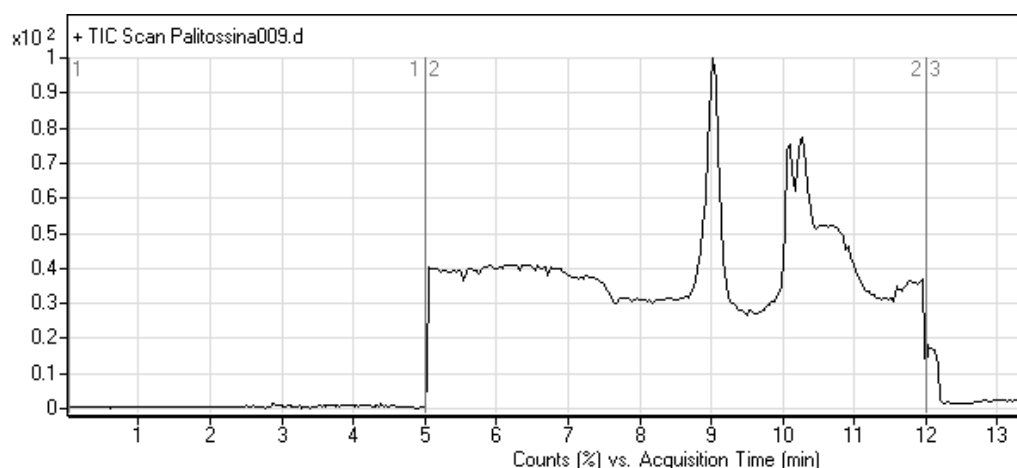
I primi studi sono stati effettuati in modalità a ioni positivi.

La soluzione di riferimento della Palitossina, pervenutaci in fase solida in quantità di 100 µg è stata disciolta in 10 ml di MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1), soluzione finale [10 ppm].

Dalla soluzione madre sono state preparate le successive diluizioni a quattro livelli di concentrazione 2, 1, 0.5 e 0.25 ppm.

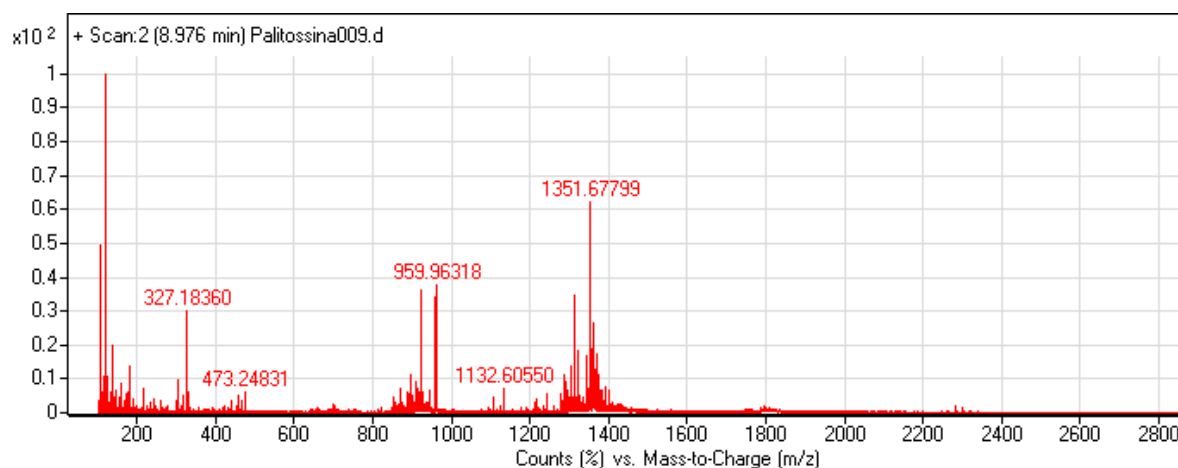
I primi esperimenti sono stati registrati su uno spettrometro di massa Agilent con analizzatore a tempo di volo (TOF), utilizzando una soluzione standard di Palitossina, commercialmente disponibile, alla concentrazione di 10µg/ml. Iniettando nel flusso della fase mobile 20 µl di soluzione standard del composto in esame abbiamo ottenuto il cromatogramma della corrente ionica totale in funzione del

tempo (TIC: Total Ion Current) in cui era ben visibile un picco di eluizione a 9 minuti (Fig. 4).



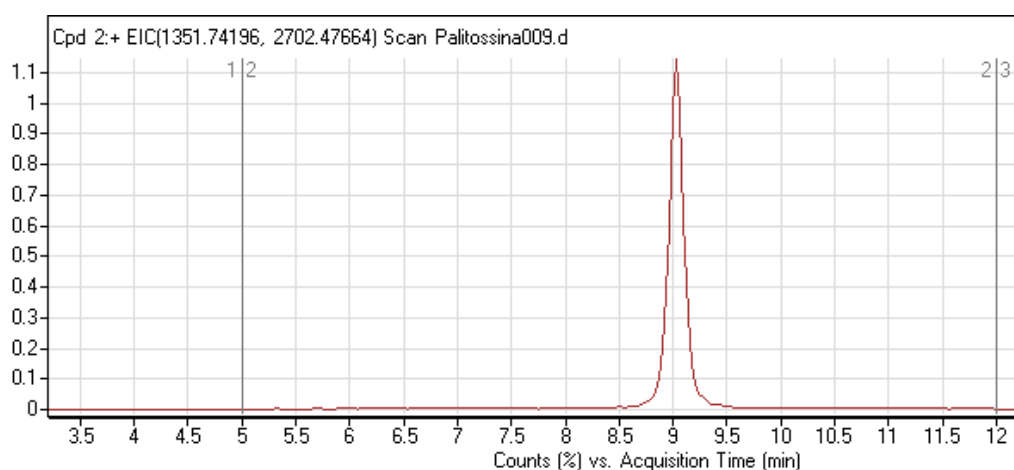
**Figura 4:** TIC della soluzione di riferimento alla concentrazione di 10 ppm

Analizzando nello specifico il pattern spettrale sono stati individuati due ioni più abbondanti: un addotto con il sodio  $[M+H+Na]^{2+}$  ad  $m/z$  1351 e lo ione  $[M+H-Fraz B-H_2O]^+$ , già noto in letteratura, che compare ad  $m/z$  327 (Fig.5), e si ottiene in seguito alla rottura del legame C8-C9 (Fig. 2). Dalla rottura del legame C8-C9 si ottiene il frammento neutro 362, che, in seguito alla perdita di 2 molecole di  $H_2O$ , origina il frammento 327.18.



**Figura 5:** Spettro iniziale

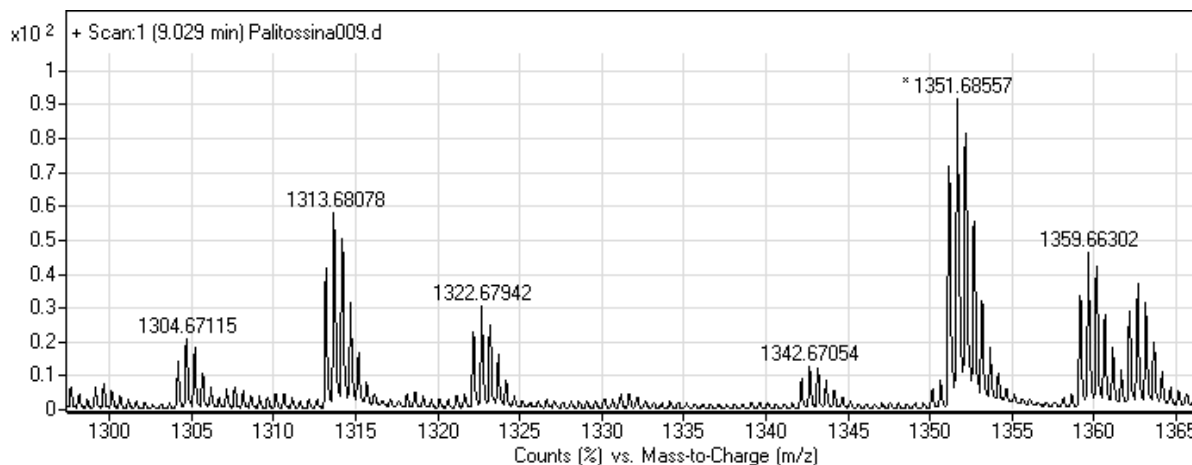
È possibile effettuare una ricerca della molecola anche mediante la sua formula bruta nota (Fig. 6):



**Figura 6:** Picco della Palitossina con formula  $C_{129}H_{224}N_3O_{54}Na$

I risultati di tali esperimenti sono stati utilizzati per selezionare gli ioni da osservare in *Extracted Ion Chromatogram* (EIC). Tutti i parametri di acquisizione (*Gas Temperature* (350°C); *Fragmentor Voltage* (250 V); *Drying Gas* (11 L/min); *Nebulizer* (35); *Skimmer* (60); *Capillary* (3000)) sono stati ottimizzati accuratamente al fine di ottenere il massimo della sensibilità.

Da una attenta analisi della porzione  $m/z$  da 1300 a 1370 è stato possibile vedere il pattern di frammentazione della tossina bicarica (Fig. 7) prodotto nello spettro dello ione  $[M+H]^+$ , che consisteva principalmente in diverse perdite di  $H_2O$ .



**Figura 7:** Pattern di frammentazione della Palitossina Bicarica

In particolare, venivano osservati i seguenti ioni:

$m/z$  1304 corrispondente a  $[M+2H-4H_2O]^{2+}$ ,

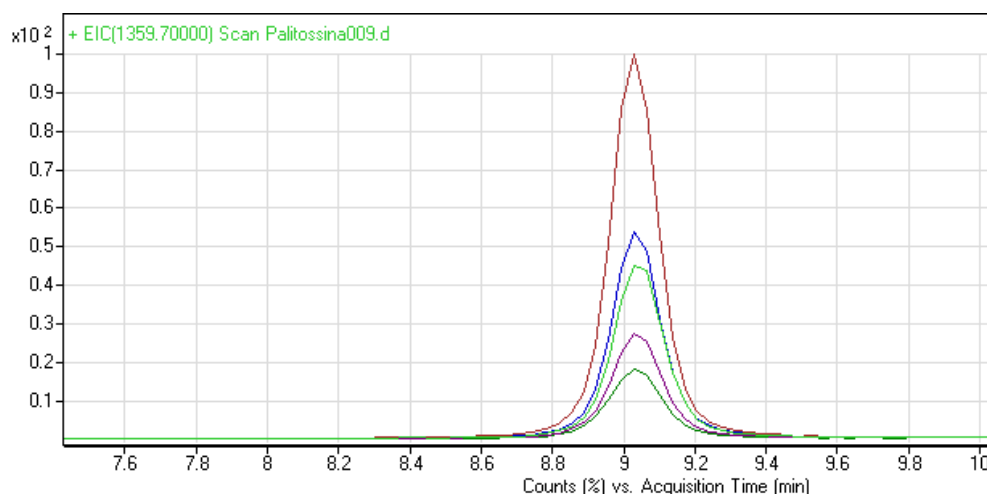
$m/z$  1313 corrispondente a  $[M+2H-3H_2O]^{2+}$ ,

$m/z$  1322 corrispondente a  $[M+2H-2H_2O]^{2+}$ ,

$m/z$  1351 corrispondente a  $[M+H+Na]^{2+}$ , e

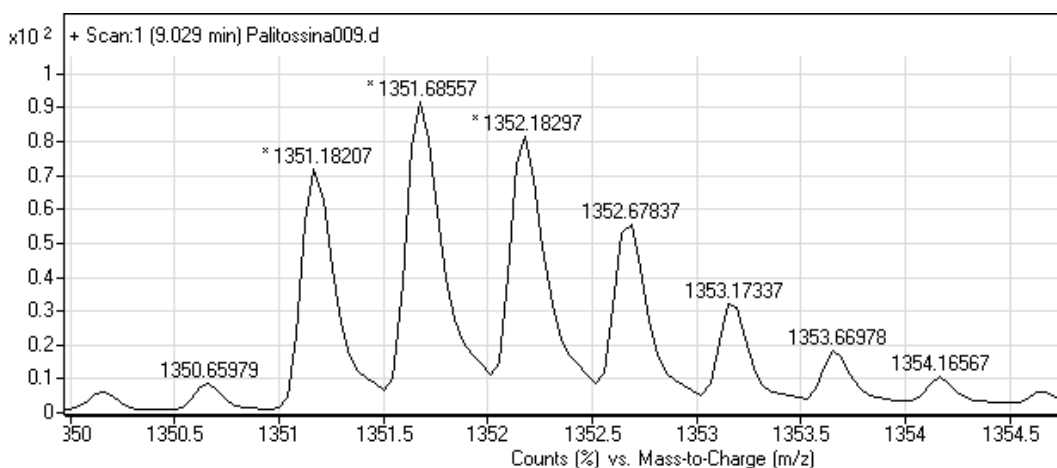
$m/z$  1359 corrispondente a  $[M+H+K]^{2+}$

Le abbondanze dei singoli ioni sono evidenziate dalle aree dei loro picchi: in verde scuro il frammento 1304 (Area 13059059), in blu il 1313 (Area 33530632), in viola il 1322 (Area 23007521), in rosso il 1351 (Area 60952942), in verde chiaro il 1359 (Area 29874627) (Fig. 8).



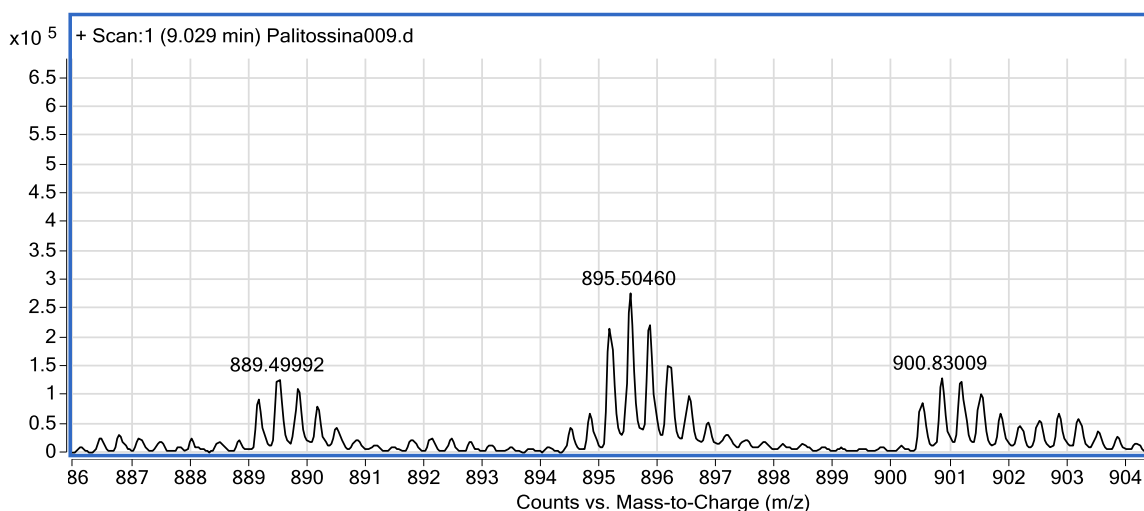
**Figura 8:** Aree dei vari ioni molecolari

La Palitossina presenta uno spettro di massa con un picco molecolare ad  $m/z$  1351 accompagnato da un picco isotopico ad  $m/z$  1352 quasi della stessa intensità. Lo stesso rapporto di intensità viene mantenuto dai picchi ad  $m/z$  1313 e 1314 e ad  $m/z$  1322 e 1323. Tale distribuzione isotopica tipica è dovuta alla presenza del carbonio. In figura 9 è rappresentata la distribuzione isotopica completa dello ione molecolare 1351 della Palitossina: dalla differenza tra i picchi di massa relativi alla distribuzione isotopica di uno ione è possibile risalire allo stato di carica di quel determinato ione ed in questo caso, essendo la differenza di  $m/z$  0.5, è possibile dedurre che il frammento 1351 sia bi-carico.



**Figura 9:** Distribuzione isotopica completa dello ione 1351

È stata verificata la presenza della tossina tricarica  $[M+2H-Na]^{3+}$ , con i relativi ioni:



**Figura 10:** Pattern di frammentazione della Palitossina Tricarica

Anche il pattern di frammentazione della tossina tricarica (Fig. 10) prodotto nello spettro dello ione  $[M+H]^+$  consisteva principalmente, come nel caso del bicarico, in diverse perdite di  $H_2O$ .

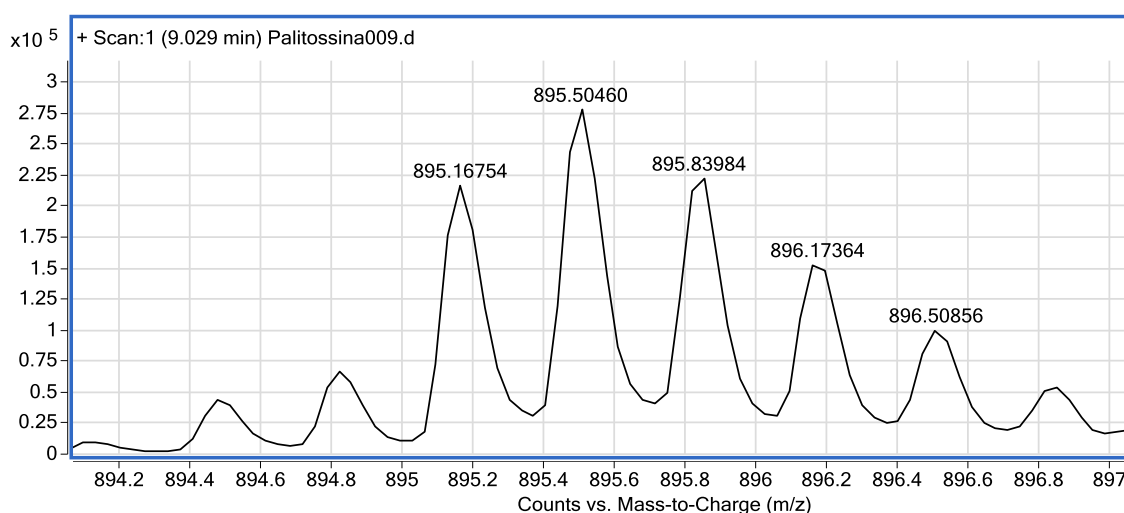
In particolare, venivano osservati i seguenti ioni:

$m/z$  889.5 corrispondente a  $[M+2H+Na-2H_2O]^{3+}$ ,

$m/z$  895.5 corrispondente a  $[M+2H+Na-H_2O]^{3+}$ ,

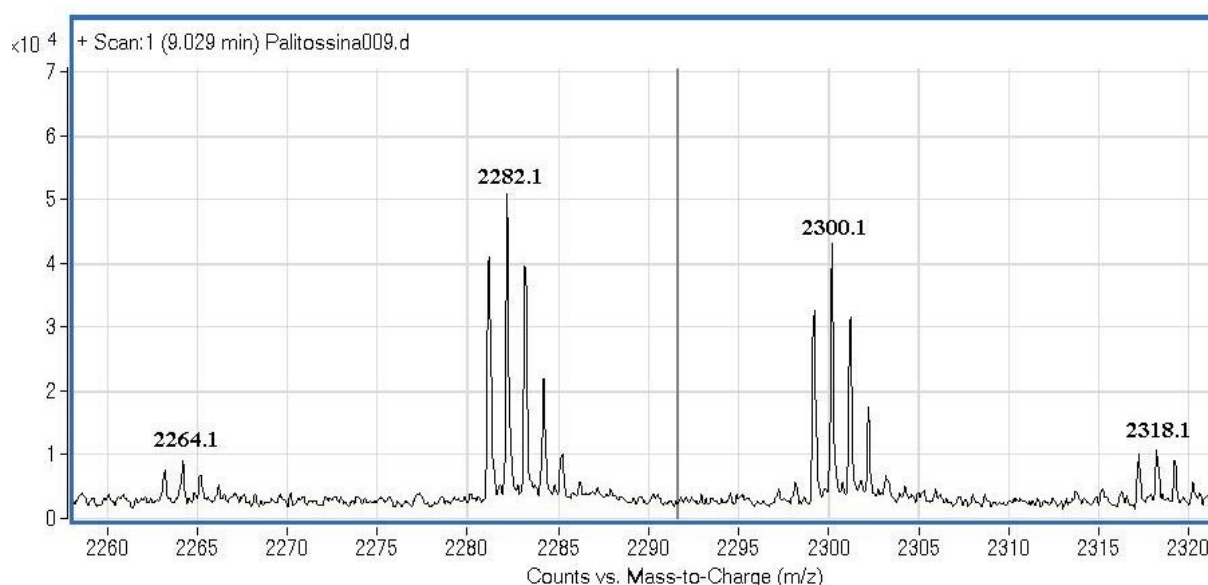
$m/z$  900.8 corrispondente a  $[M+2H+Na]^{3+}$

Dalla differenza tra i picchi di massa relativi alla distribuzione isotopica dello ione 895.5 è possibile risalire al suo triplo stato di carica, essendo la differenza di  $m/z$  0.33 (Fig. 11).



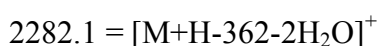
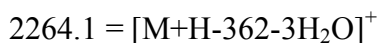
**Figura 11:** Distribuzione isotopica completa dello ione 895

In figura 5 è possibile notare dei picchi tra  $m/z$  2200 e 2400. Ingrandendo la figura da  $m/z$  2260 a 2320 otteniamo il pattern rappresentato in figura 12.



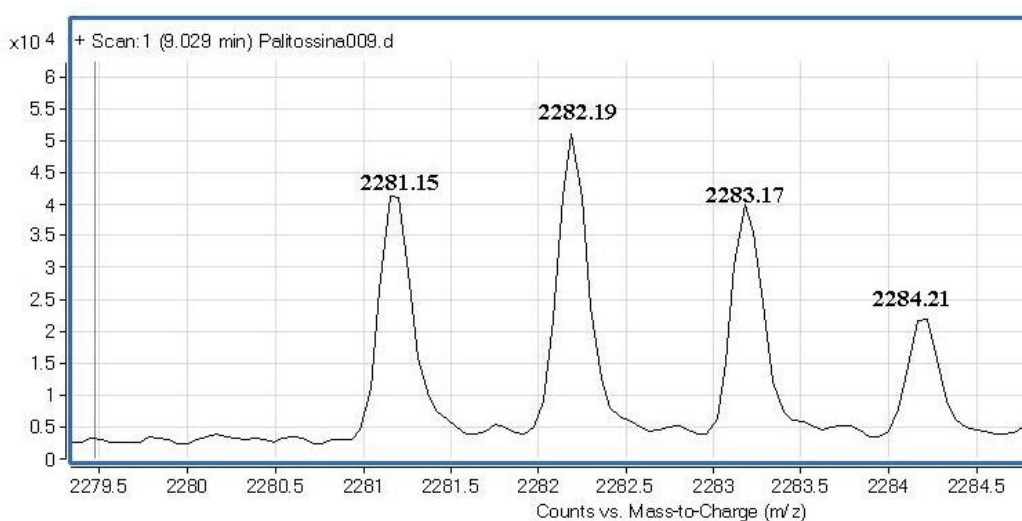
**Figura 12:** Spettro di massa tra  $m/z$  2260 e 2320

I frammenti che costituiscono il cluster della B moiety sono:



È notevole sottolineare l'importanza di tali frammenti che ci permettono di ottenere una ulteriore conferma della rottura del legame C8-C9.

In figura 13 è possibile vedere la distribuzione isotopica dello ione 2282.1, con  $m/z = 1$  che conferma il suo stato monocarico.

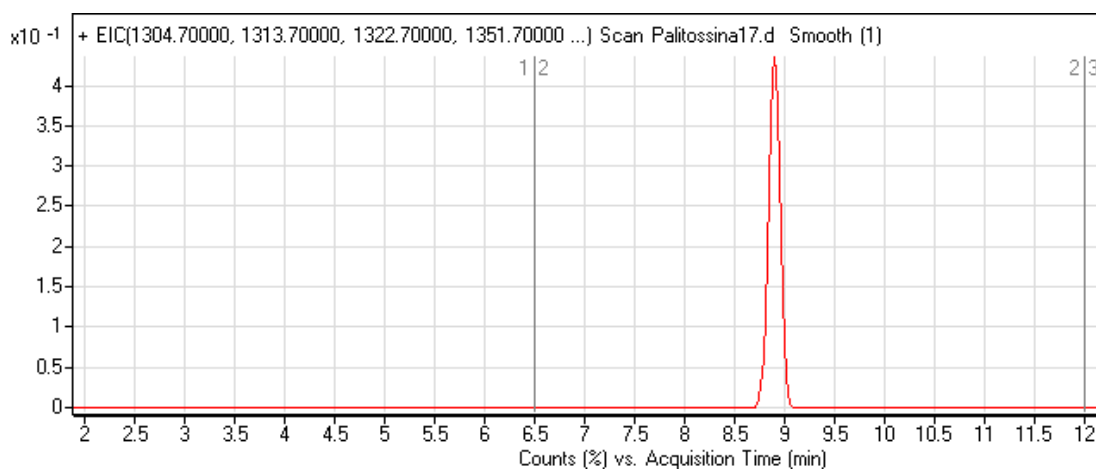


**Figura 13:** Distribuzione isotopica completa dello ione 2282

#### *Test di ripartizione della Palitossina in solventi*

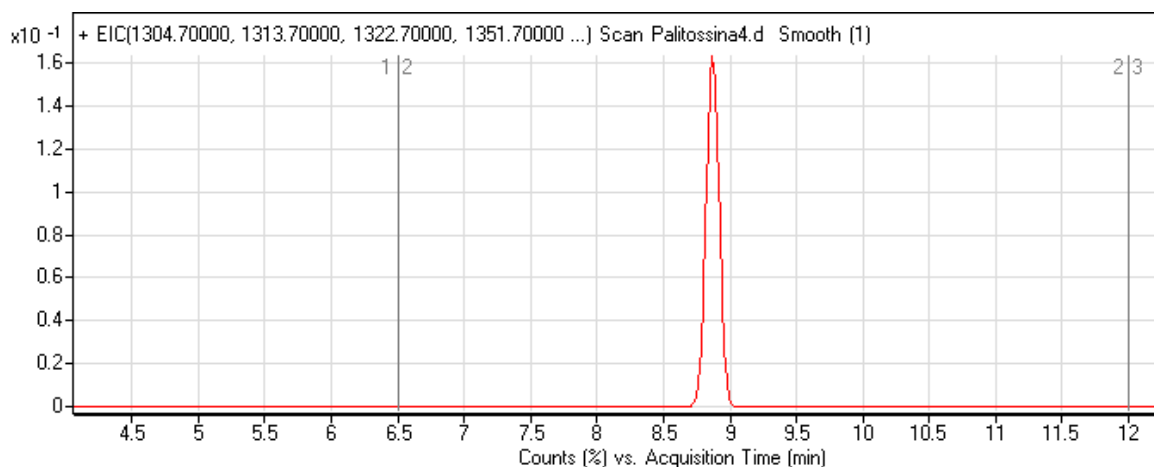
In seguito a ricerca bibliografica è stata accertata l'affinità della Palitossina verso diversi tipi di solventi, tra cui: Metanolo (MeOH), Dimetilsolfosside (DMSO) ed Acqua (H<sub>2</sub>O) (Merck Index).

Con l'intento di individuare una possibilità di purificazione mediante cromatografia di ripartizione liquido/liquido sono state effettuate diverse prove, qui di seguito descritte, utilizzando il MeOH al 50% con butanolo, esano e diclorometano ed il dimetilsolfosside con butanolo ed esano. Come riferimento è stata utilizzata una soluzione a 2 µg/ml appena preparata in MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) iniettando 10 µl allo spettrometro di massa (Fig. 14).



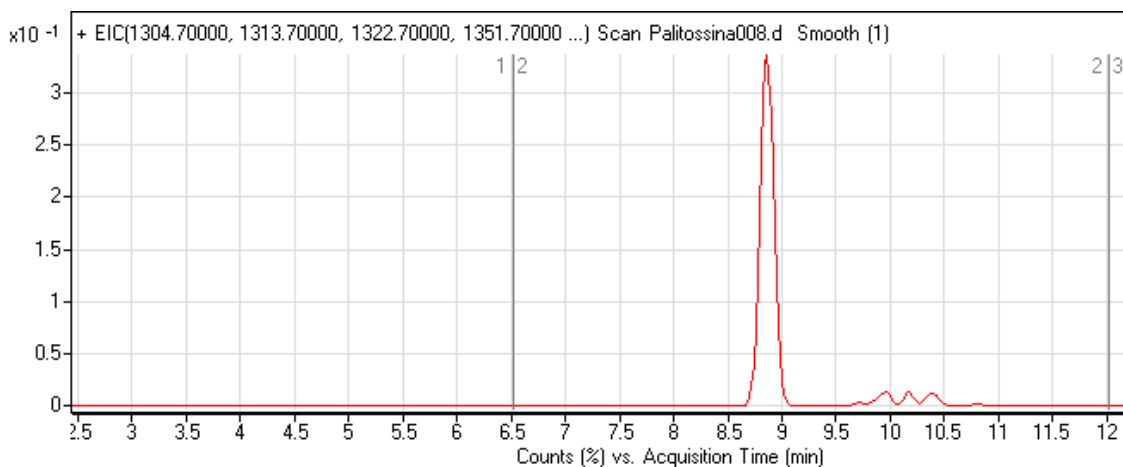
**Figura 14:** Soluzione di riferimento alla concentrazione di 2 µg/ml in MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1)

Dal test di ripartizione della soluzione di riferimento in MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) con butanolo possiamo notare che l'altezza del picco è notevolmente diminuita (da  $4 \times 10^{-1}$  a  $1.6 \times 10^{-1}$ ), indice di una perdita della tossina per trasferimento nella soluzione butanolica (Fig. 15)



**Figura 15:** Recupero della Palitossina in MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) dopo ripartizione con butanolo

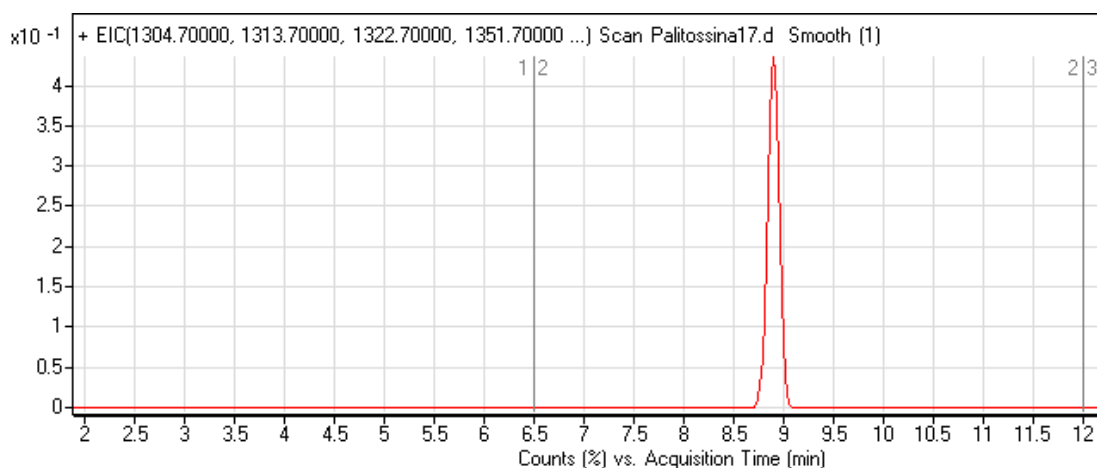
Mentre, dopo la ripartizione tra MeOH/H<sub>2</sub>O ed esano, il picco si mantiene quasi invariato (da  $4 \times 10^{-1}$  a  $3.5 \times 10^{-1}$ ) (Fig. 16)



**Figura 16:** Recupero della Palitossina in MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) dopo ripartizione con esano

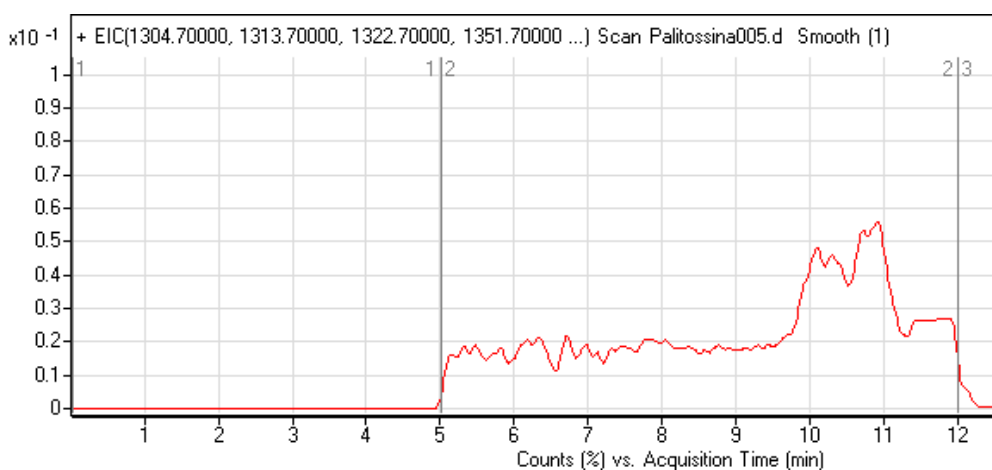
Dopo ripartizione con Diclorometano il contenuto della soluzione MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) rimaneva invariato (Fig. 17).





**Figura 17:** Analisi del contenuto del MeOH/H<sub>2</sub>O dopo ripartizione con Diclorometano

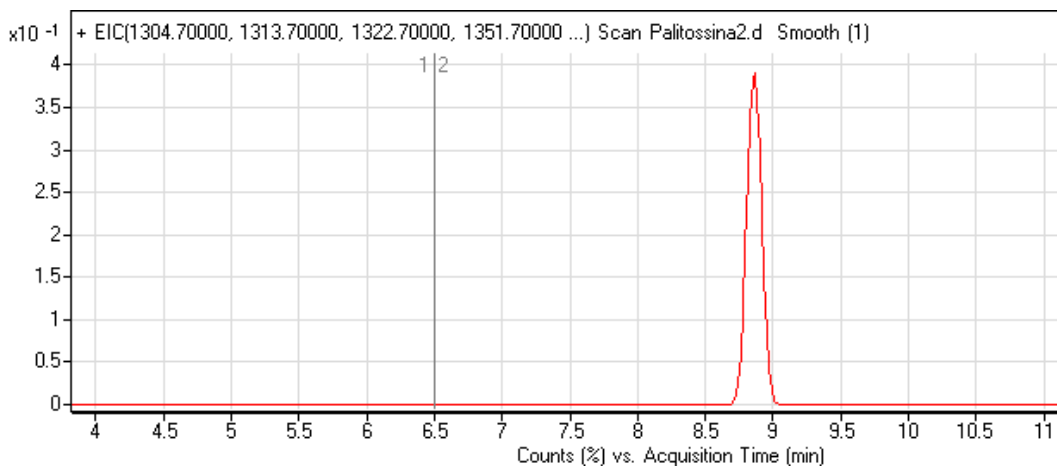
Il contenuto della soluzione diclorometanica è stato comunque analizzato dando come risultato la totale assenza di Palitossina (Fig. 18).



**Figura 18:** Analisi del contenuto del DCLM

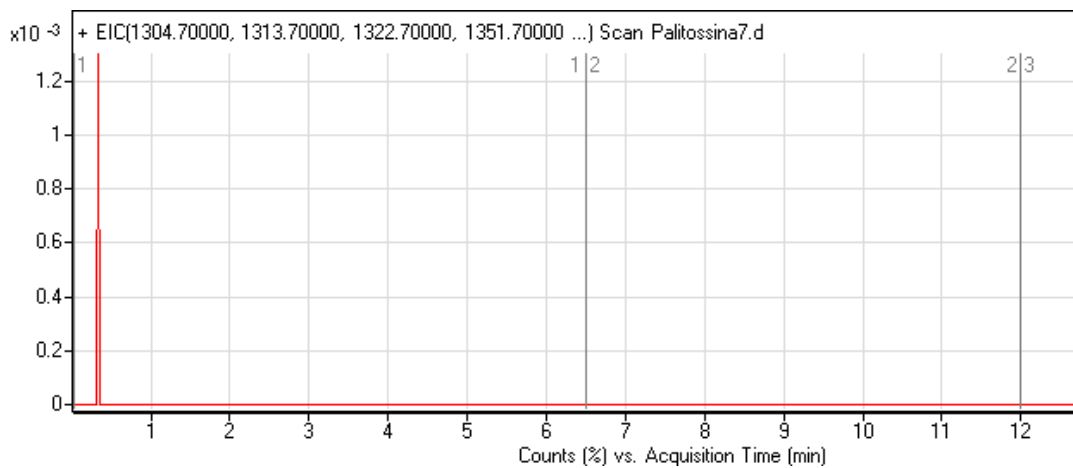
Abbiamo quindi proceduto con l'utilizzo del D.M. 16-05-02 per l'estrazione della Palitossina.

Allo stesso modo sono state effettuate le prove di ripartizione utilizzando come riferimento una soluzione 2 µg/ml in Dimetilsolfosside. Dall'analisi alla massa abbiamo ottenuto il seguente risultato (Fig 19):



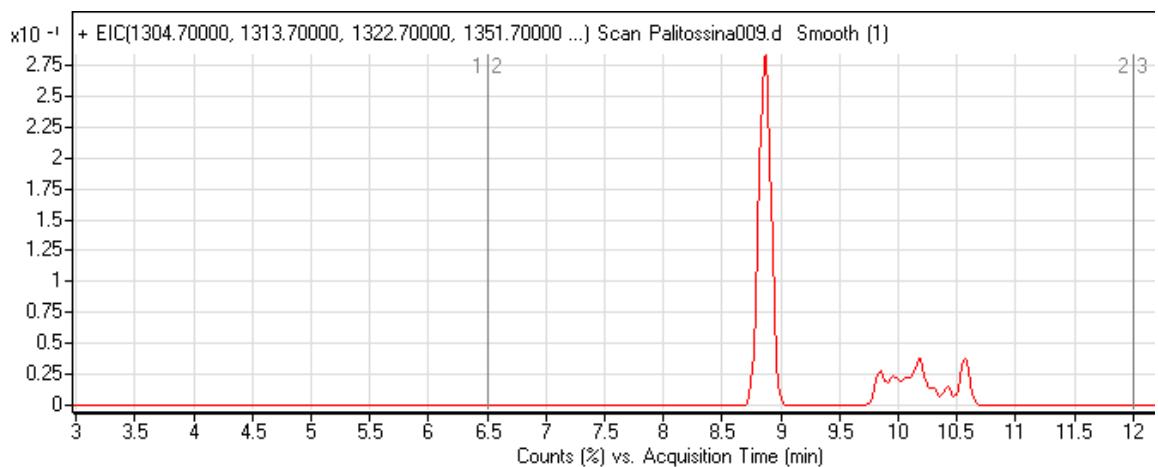
**Figura 19:** Soluzione di riferimento alla concentrazione di 2 ppm in DMSO

Nella prima prova, la ripartizione con butanolo, non abbiamo alcuna traccia della Palitossina nel DMSO (Fig. 20).



**Figura 20:** Recupero della Palitossina in DMSO dopo ripartizione con butanolo

Mentre, dopo ripartizione con esano, l'altezza del picco risulta assai inferiore (da  $4 \times 10^{-1}$  a  $2.75 \times 10^{-1}$ ) (Fig. 21).

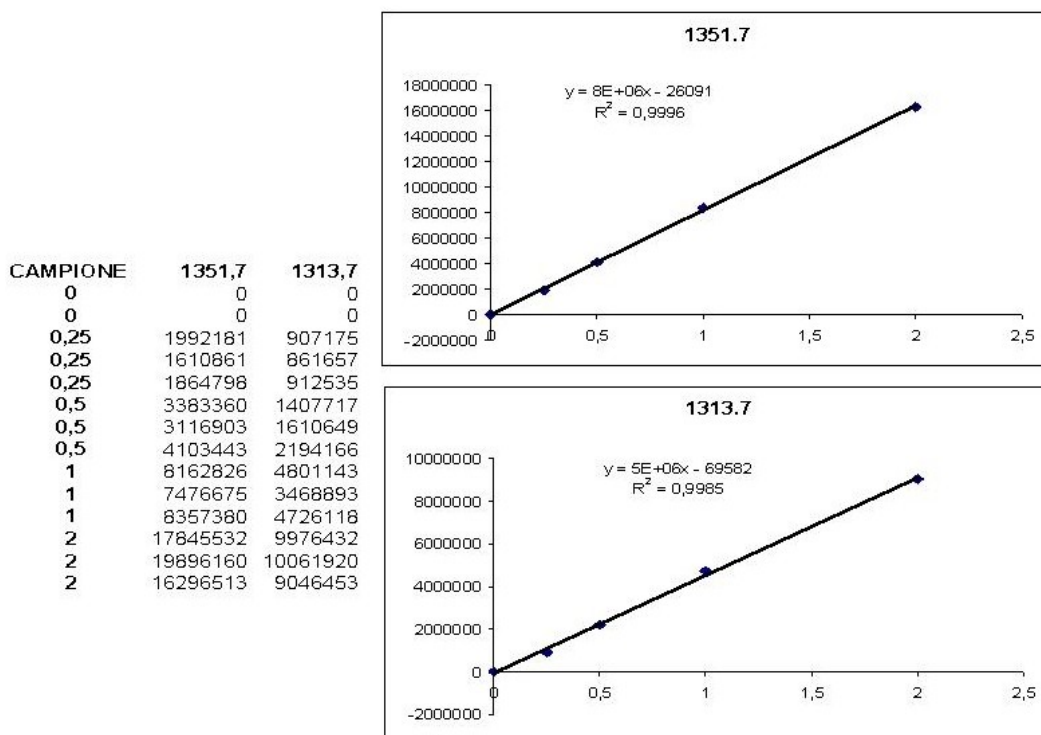


**Figura 21:** Recupero della Palitossina in DMSO dopo ripartizione con esano

In seguito a tali prove è stato possibile concludere che dei solventi utilizzati è da preferire la soluzione di MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1).

#### *Limiti di rivelazione*

Per la determinazione dei limiti di rivelazione abbiamo analizzato lo standard a concentrazione decrescente in triplicato selezionando gli ioni 1313.7 e 1351.7. Sono stati scelti questi due ioni in quanto rilevabili anche a basse concentrazioni (Fig. 22).

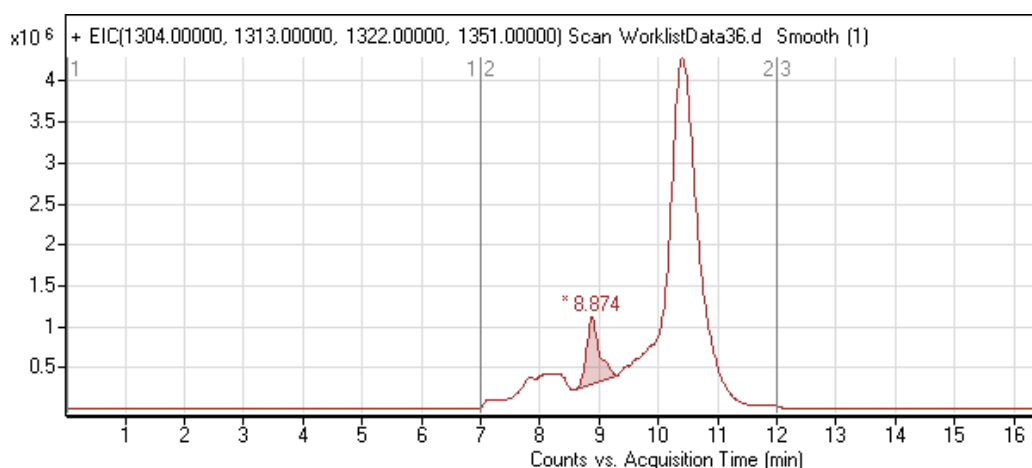


**Figura 22:** Rette di calibrazione ioni molecolari 1313.7 e 1351.7

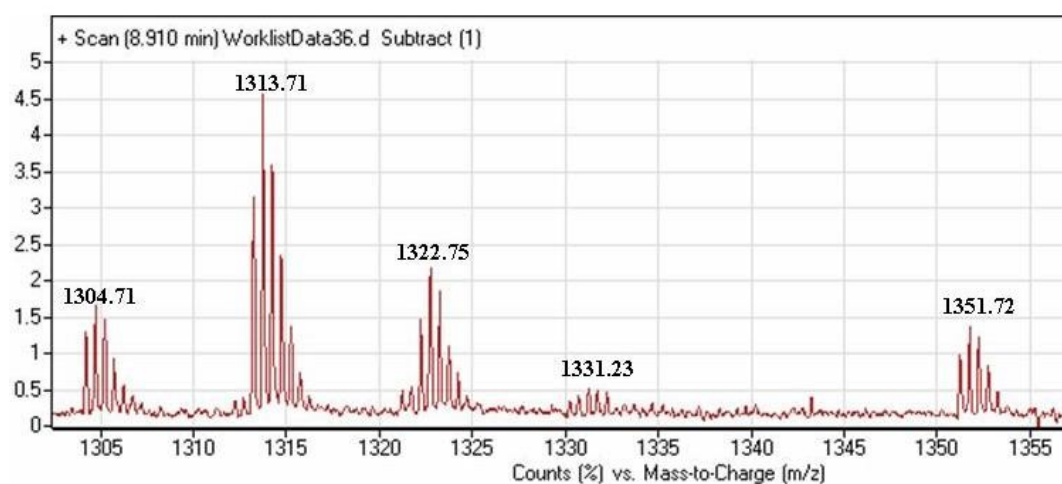
Le aree dei picchi sono state utilizzate per esprimere la risposta dell'analita. Il LOD è risultato 0.63 ng in colonna.

#### *Limite di rivelazione in matrice*

*MR 10 ppm:* Per la preparazione dell'MR 10 ppm in matrice sono stati prelevati 100 µl di Palitossina standard alla concentrazione di 100 ppm e sono stati aggiunti a 900 µl di estratto metanolico esente da tossine. In figura 23 è possibile vedere il cromatogramma risultante dall'iniezione di 10µl della soluzione così preparata, mentre in figura 24 è riportato lo spettro della tossina bicarica.



**Figura 23:** MR 10 ppm in matrice



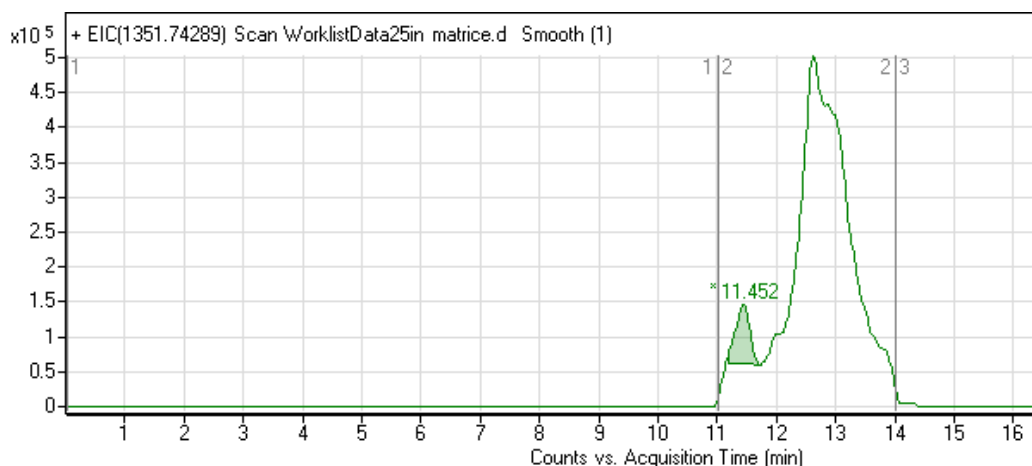
**Figura 24:** Spettro degli ioni dell' MR 10 ppm in matrice nel range 1300-1370 mass to charge.

Le condizioni cromatografiche sono le stesse utilizzate per lo standard non in matrice. È evidente un notevole calo della sensibilità. Per migliorare il livello di sensibilità in matrice sono state apportate delle modifiche sul gradiente, grazie alle quali è stata possibile l'identificazione della tossina fino ad una concentrazione di 2.5 µg/ml:

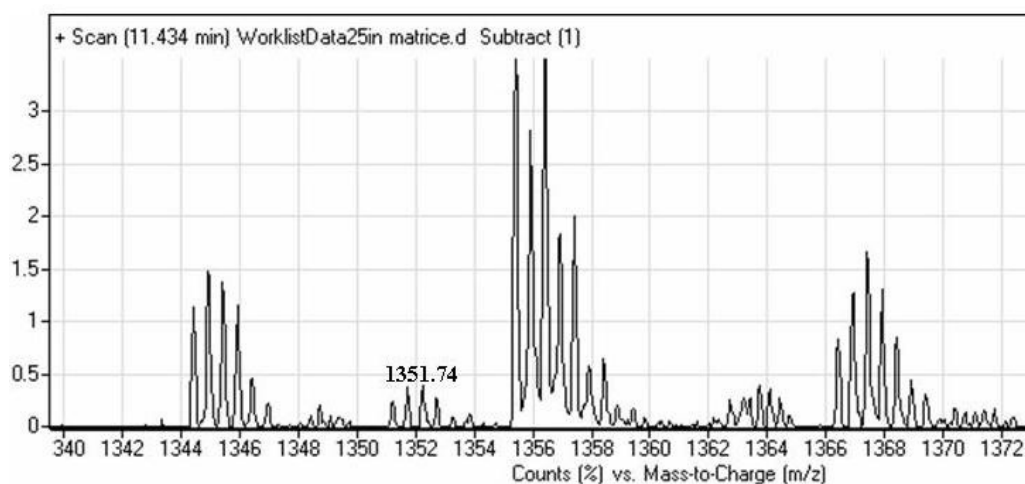
*MR 2.5 ppm:* prelevare 25 µl di Palitossina a 100 ppm ed aggiungerlo a 975 µl di estratto metanolico

*Eluizione a gradiente:* t = 0 min, 20% B; t = 6 min, 20% B; t = 8 min, 80% B

In figura 25 è mostrato il cromatogramma risultante dall'iniezione di 10µl della soluzione 2.5µg/ml in matrice, mentre in figura 26 è riportato lo spettro della tossina bicarica.



**Figura 25:** MR 2.5 ppm in matrice



**Figura 26:** Spettro degli ioni dell' MR 2,5 ppm in matrice

Come è possibile vedere dai dati presentati non siamo riusciti a rilevare tutti gli ioni della palitossina al di sotto della concentrazione a 10 ppm, ma riusciamo a seguire il frammento 1351.7 fino ad una concentrazione minima di 2.5ppm.

#### ❖ OTTIMIZZAZIONE DEL METODO

Nell'intento di ottenere una migliore sensibilità strumentale in matrice abbiamo modificato alcuni parametri di acquisizione fondamentali del nostro rivelatore TOF lavorando con lo standard della Palitossina:

- *Fragmentor Voltage* (da 250 V a 350 V);
- *Drying Gas* (da 11 L/min a 8 L/min);

- *Nebulizer (da 35 a 45);*
- *Capillary (da 3000 a 4000).*

Successivamente sono state testate diverse colonne cromatografiche, oltre alla suddetta Tosoh, per ottenere una migliore separazione del nostro analita dai componenti della matrice:

- 1) Phenomenex Gemini C(18) 150 x 3.00 mm, 3 $\mu$ m;
- 2) Phenomenex Gemini C(18) 150 x 3.00 mm, 5 $\mu$ m;
- 3) Phenomenex Luna PFP(2) 150 x 2.00 mm, 3 $\mu$ m;
- 4) Phenomenex Luna HILIC 150 x 2.00 mm, 3 $\mu$ m;
- 5) Phenomenex Synergy Polar 150 x 2.00 mm, 4 $\mu$ m;
- 6) Phenomenex Kinetex C(18) 100 x 2.10 mm, 2.6 $\mu$ m;
- 7) Phenomenex Kinetex PFP 100 x 2.10 mm, 2.6 $\mu$ m;
- 8) Phenomenex Kinetex PFP 150 x 2.10 mm, 2.6 $\mu$ m.

La colonna con cui abbiamo ottenuto i risultati migliori è la n° 3.

Le condizioni cromatografiche utilizzate con la nuova colonna sono le seguenti:

*Colonna:* Phenomenex Luna PFP(2) 150 x 2.00 mm, 3 $\mu$ m

*Fase Mobile:* A = 0.1% Acido Formico in Acqua; B = 0.1% Acido Formico in Acetonitrile/Acqua (95:5)

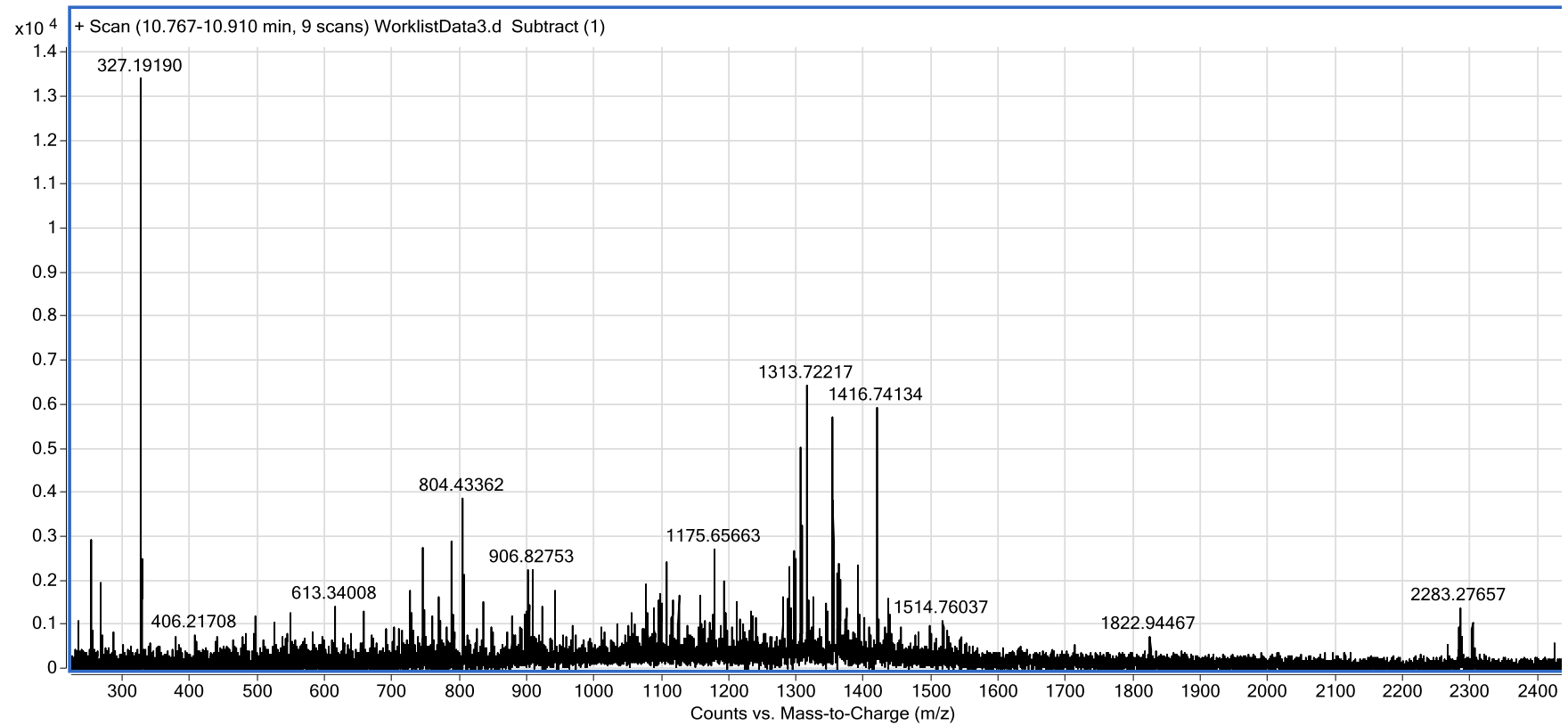
*Eluizione a gradiente:* t = 0 min, 20% B; t = 2 min, 20% B; t = 6 min, 80% B

*Flusso:* 0.2 ml/min

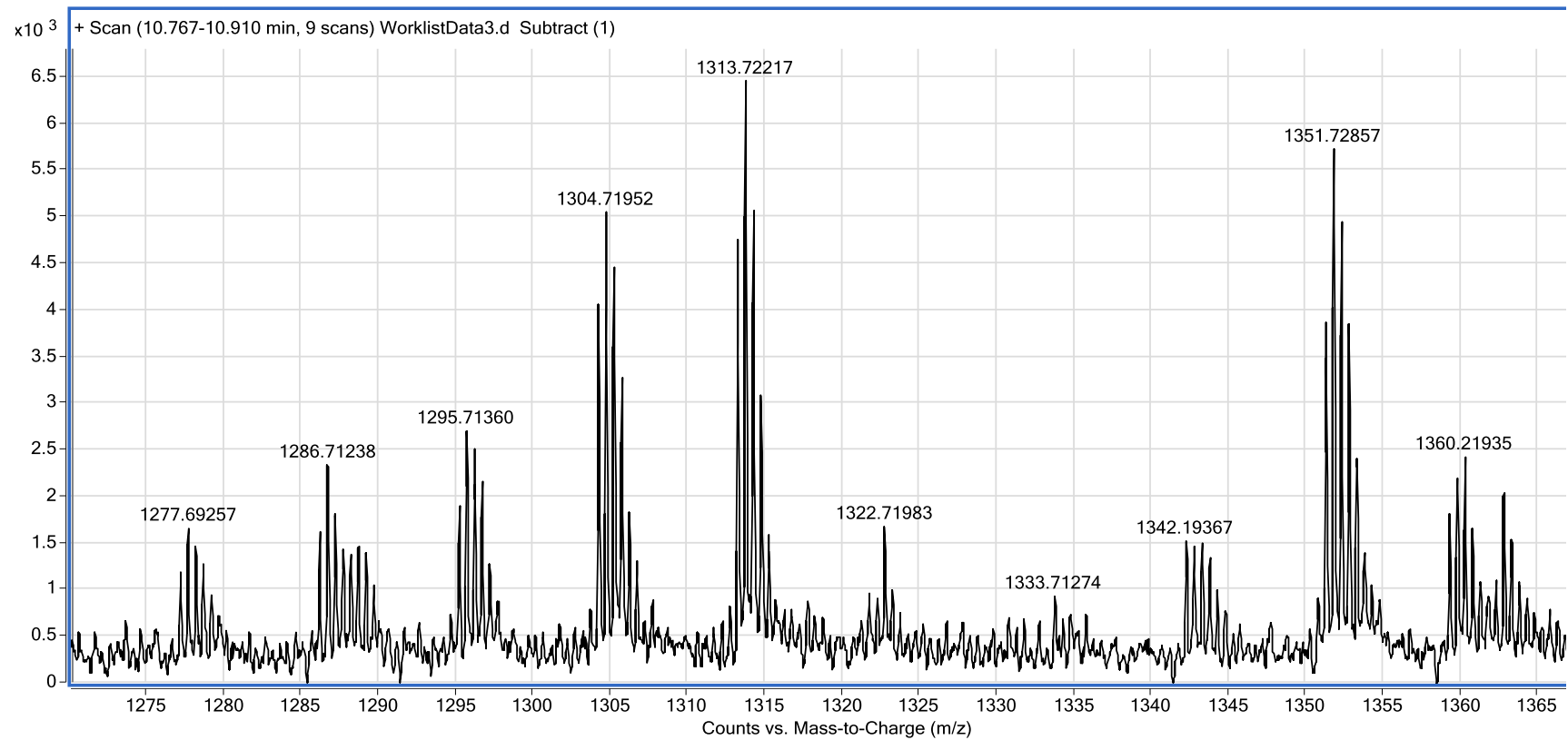
*Volume di iniezione:* 5  $\mu$ l

In tali condizioni la Palitossina eluisce tra circa 9 ed 11 minuti. Tale studio è stato effettuato in modalità a ioni positivi. La soluzione di riferimento della Palitossina, pervenutaci in fase solida in quantità di 100  $\mu$ g è stata disciolta in 10 ml di MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1), soluzione finale [10 ppm]. Dalla soluzione madre sono state preparate le successive diluizioni a quattro livelli di concentrazione 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 e 0.03125 ppm. Il LOD ottenuto è risultato pari a 0.15625 ng in colonna, dimostrando così un significativo miglioramento della sensibilità.

Nelle figure 27 e 28 sono mostrati gli spettri ottenuti dall'analisi del materiale di riferimento alla concentrazione di 0.0625 ppm ed in Tabella 1 sono riportati tutti gli ioni noti presenti in figura 27.



**Figura 27:** Spettro del materiale di riferimento alla concentrazione di 0.0625 ppm nel range 280-2430  $m/z$ .



**Figura 28:** Pattern bicarico dello spettro del materiale di riferimento alla concentrazione di 0.0625 ppm nel range 1270-1370  $m/z$ .



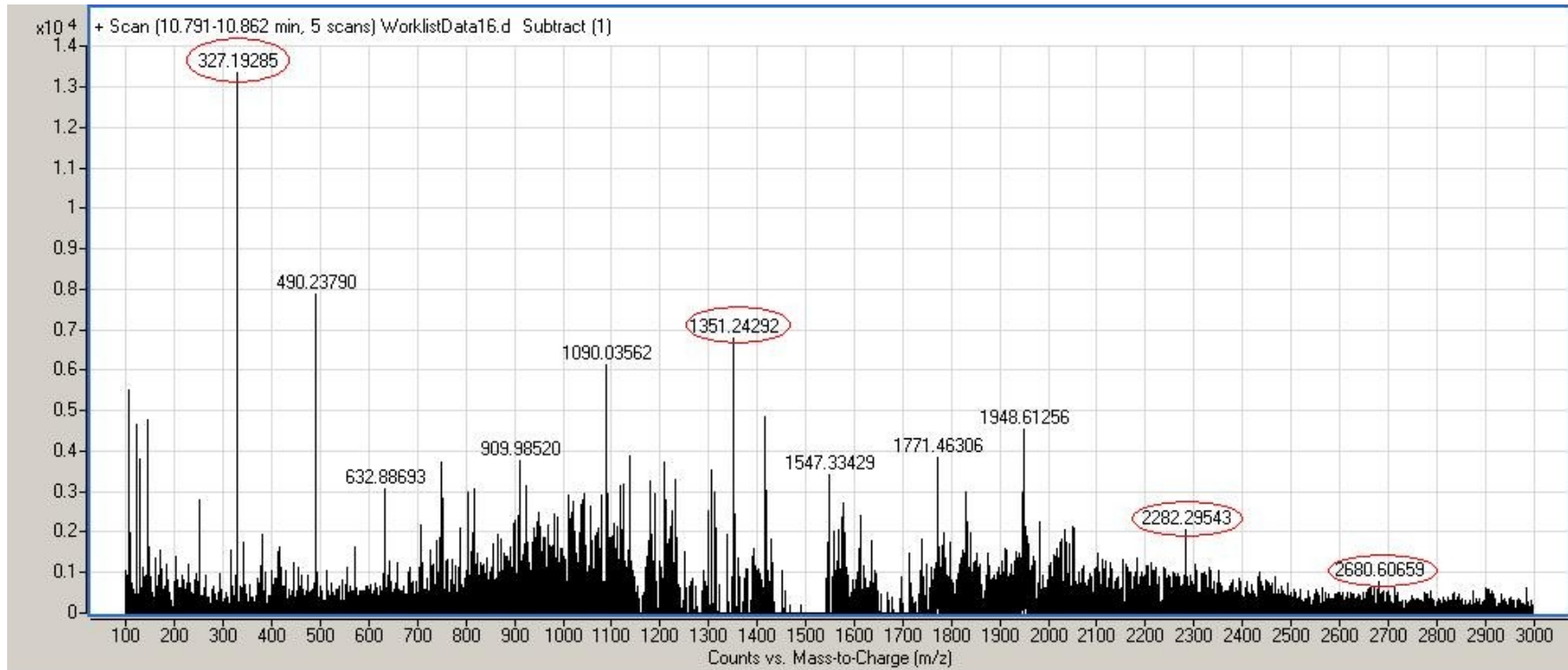
Tabella 1. Ioni molecolari noti della PITX.

	[B moiety+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	[B moiety+H-3H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	[B moiety+H-4H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	[A moiety+H] <sup>+</sup>	
<b>IONI MONOCARICHI</b>					
<b>Peso Molecolare</b>	2317.2794	2281.2643	2263.2551	327.1914	
<b>Formula</b>	C <sub>113</sub> H <sub>194</sub> NO <sub>47</sub>	C <sub>113</sub> H <sub>190</sub> NO <sub>45</sub>	C <sub>113</sub> H <sub>188</sub> NO <sub>44</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	
<b>Δ ppm</b>	0.05	-2.9	-2.11	-1.82	
	[M+H+K] <sup>2+</sup>	[M+H+Na] <sup>2+</sup>	[M+2H-2H <sub>2</sub> O] <sup>2+</sup>	[M+2H-3H <sub>2</sub> O] <sup>2+</sup>	[M+2H-4H <sub>2</sub> O] <sup>2+</sup>
<b>IONI BICARICHI</b>					
<b>Peso Molecolare</b>	1359.2246	1351.2390	1322.2415	1313.2374	1304.2250
<b>Formula</b>	C <sub>129</sub> H <sub>222</sub> KN <sub>3</sub> O <sub>54</sub>	C <sub>129</sub> H <sub>222</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>54</sub>	C <sub>129</sub> H <sub>219</sub> N <sub>3</sub> O <sub>52</sub>	C <sub>129</sub> H <sub>217</sub> N <sub>3</sub> O <sub>51</sub>	C <sub>129</sub> H <sub>217</sub> N <sub>3</sub> O <sub>50</sub>
<b>Δ ppm</b>	0.16	-0.01	3.36	4.28	1.49
	[M+2H-5H <sub>2</sub> O] <sup>2+</sup>	[M+2H-6H <sub>2</sub> O] <sup>2+</sup>	[M+2H-7H <sub>2</sub> O] <sup>2+</sup>		
<b>Peso Molecolare</b>	1295.2230	1286.2155	1277.2098		
<b>Formula</b>	C <sub>129</sub> H <sub>213</sub> N <sub>3</sub> O <sub>49</sub>	C <sub>129</sub> H <sub>211</sub> N <sub>3</sub> O <sub>48</sub>	C <sub>129</sub> H <sub>211</sub> N <sub>3</sub> O <sub>47</sub>		
<b>Δ ppm</b>	-0.24	0.16	1.94		
	[M+2H+K] <sup>3+</sup>	[M+2H+Na] <sup>3+</sup>			
<b>IONI TRICARICHI</b>					
<b>Peso Molecolare</b>	906.48318	901.15744			
<b>Formula</b>	C <sub>129</sub> H <sub>225</sub> KN <sub>3</sub> O <sub>54</sub>	C <sub>129</sub> H <sub>225</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>54</sub>			
<b>Δ ppm</b>	2.86	-4.69			

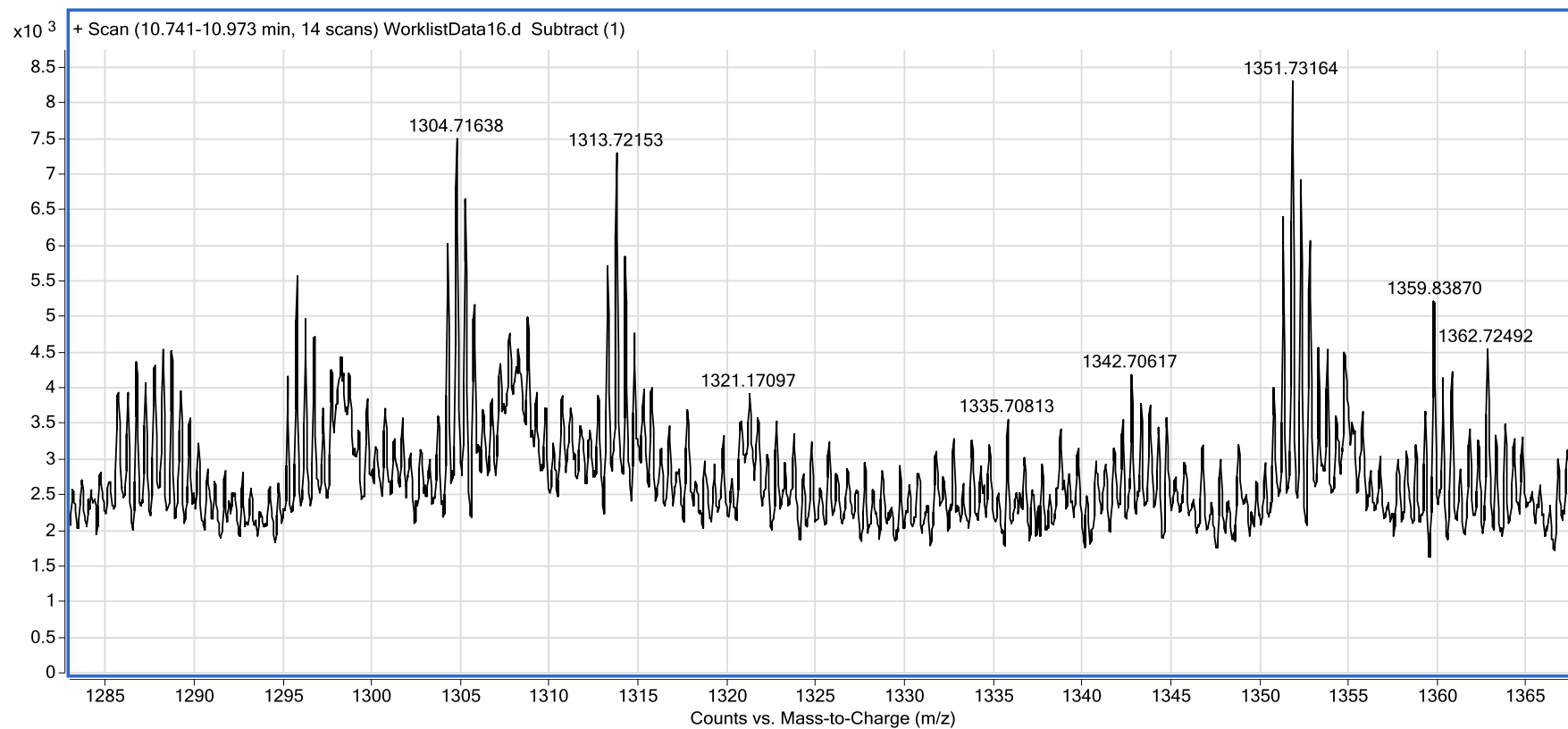
Δ ppm = Δ è la differenza tra la massa teorica e la massa osservata, espresso in parti per milione (ppm).

### *Limite di rivelazione in matrice*

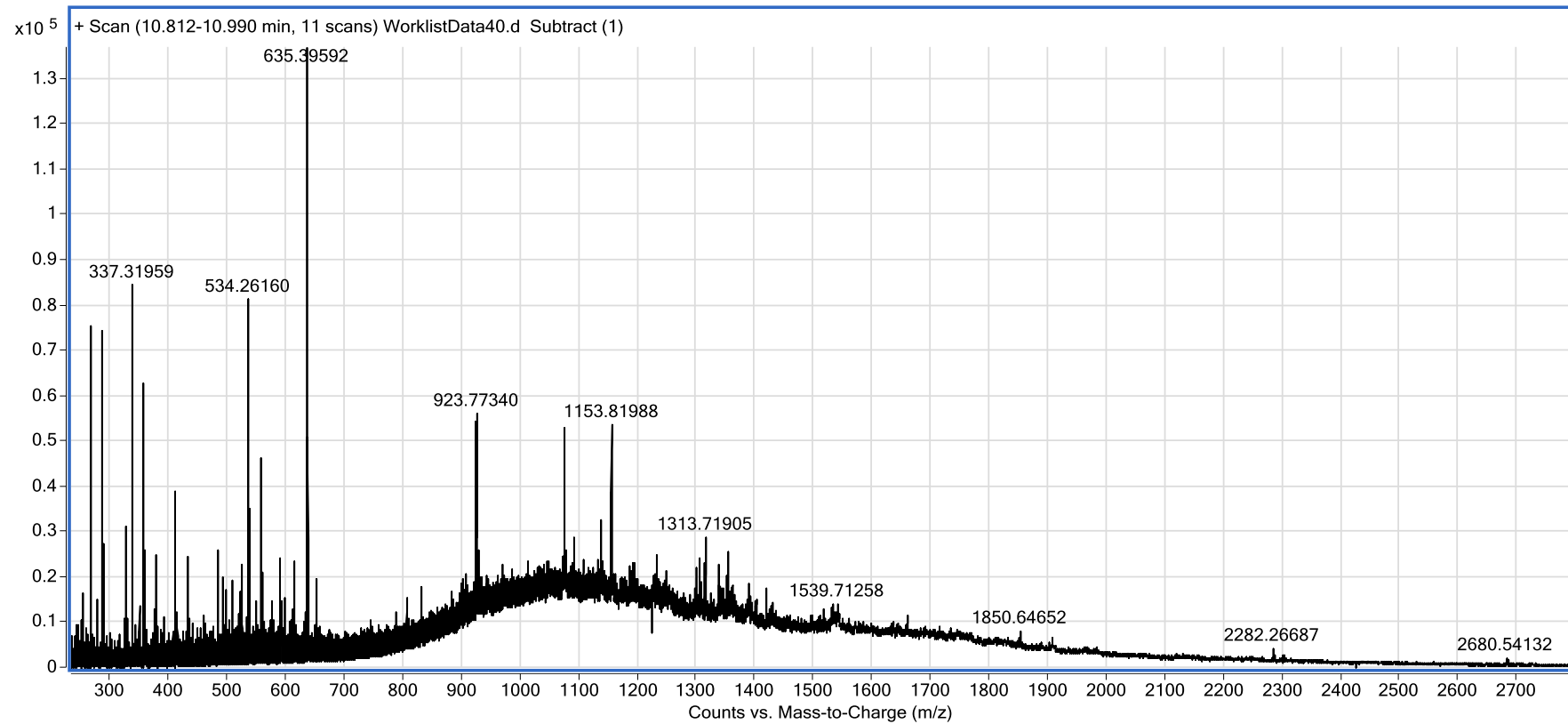
Sono state effettuate prove con due diverse concentrazioni di matrice a 0.1 e 0.5 g/ml. È stata testata la concentrazione a 0.5 g/ml poiché è la concentrazione dell'estratto metanolico al 60% del D.M. 16-05-02 e la concentrazione a 0.1 g/ml poiché diminuendo l'effetto matrice è possibile vedere meglio la tossina, infatti alla concentrazione di 0.1 g/ml è stato possibile rilevare la tossina fino alla concentrazione di 0.0625 ppm (Fig. 29, 30), mentre con una concentrazione di 0.5 g/ml già ad 1.25 ppm abbiamo un notevole aumento del disturbo del segnale (Fig. 31, 32).



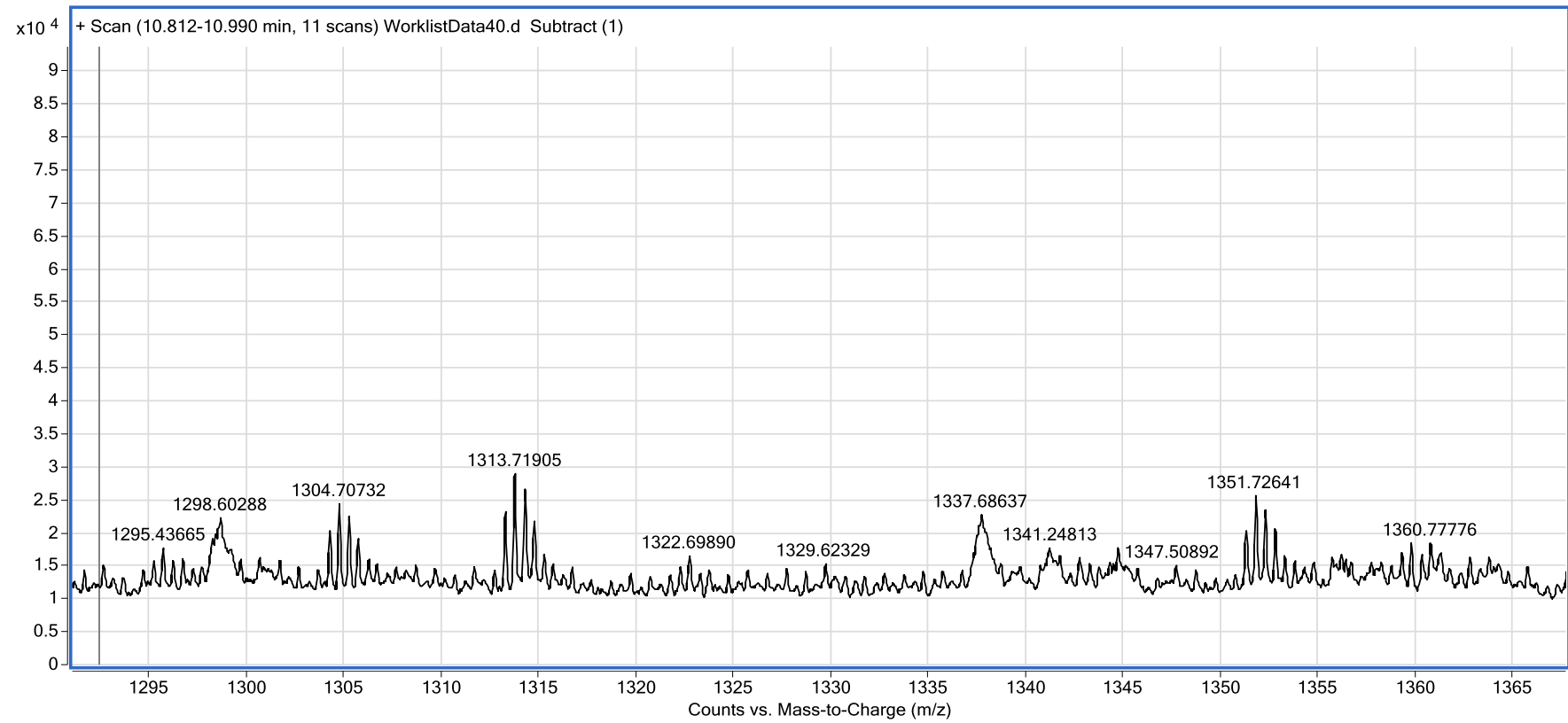
**Figura 29:** Spettro del materiale di riferimento alla concentrazione di 0.0625 ppm in matrice alla concentrazione di 0.1 g/ml nel range 100-3000  $m/z$ .



**Figura 30:** Pattern bicarico dello spettro del materiale di riferimento alla concentrazione di 0.0625 ppm in matrice alla concentrazione di 0.1 g/ml nel range 1280-1370  $m/z$ .



**Figura 31:** Spettro del materiale di riferimento alla concentrazione di 1.25 ppm in matrice alla concentrazione di 0.5 g/ml nel range 280-2750 *m/z*.



**Figura 32:** Spettro del materiale di riferimento alla concentrazione di 1.25 ppm in matrice alla concentrazione di 0.5 g/ml nel range 1285-1370  $m/z$ .

## 3.2 Determinazione in colture algali di Ovatossine mediante HPLC-TOF-MS.

### 3.2.1 Parte sperimentale e Risultati

I campioni di alghe, selezionate e cresciute in K/2 medium senza l'aggiunta di silicati (Keller et al., 1987) a 18°C con fotoperiodo 12:12 buio:luce e irraggiamento di 50  $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , nel laboratorio di Ecologia ed Evoluzione del Plankton della Stazione Zoologica A. Dorhn di Napoli sono pervenuti al nostro Istituto in flask da 1 lt. Il brodo è stato centrifugato a 2000 g per 5 minuti alla temperatura di 4 °C in falcon da 50 ml. Tutto il pellet concentrato sul fondo delle falcon è stato poi riunito in un'unica falcon da 50 ml e congelato a -18 °C fino al momento dell'uso.

La metodica di estrazione delle tossine dal pellet sviluppata nel corso di questo progetto di ricerca è stata già riportata nella sezione materiali e metodi.

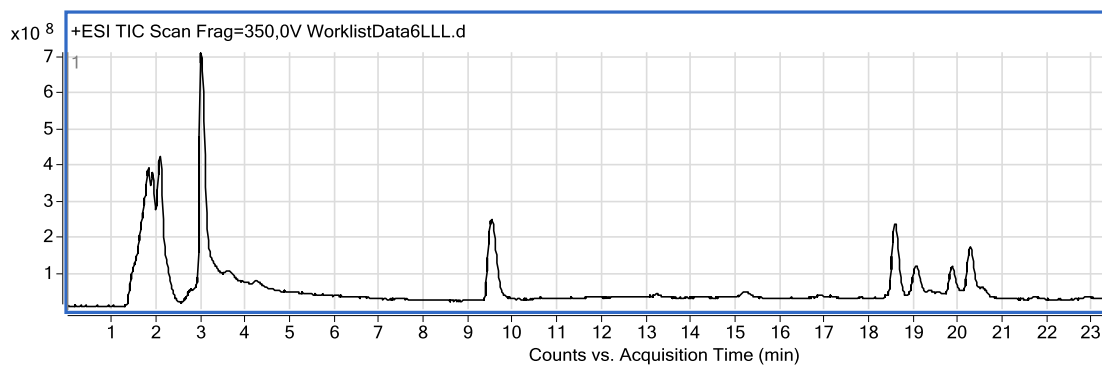
Per la messa a punto del metodo analitico per la determinazione dell'Ovatossina-a non è stato possibile reperire sul mercato materiale di riferimento della tossina. È stato dunque necessario utilizzare direttamente lo standard della palitossina come riferimento.

Per le tossine sono state predisposte e messe in atto idonee procedure di sicurezza per la loro manipolazione.

**Nel corso di queste analisi è stato messo a punto un gradiente “lungo”, per permettere la separazione delle diverse molecole: t = 0 min, 20% B; t = 40 min, 60% B.**

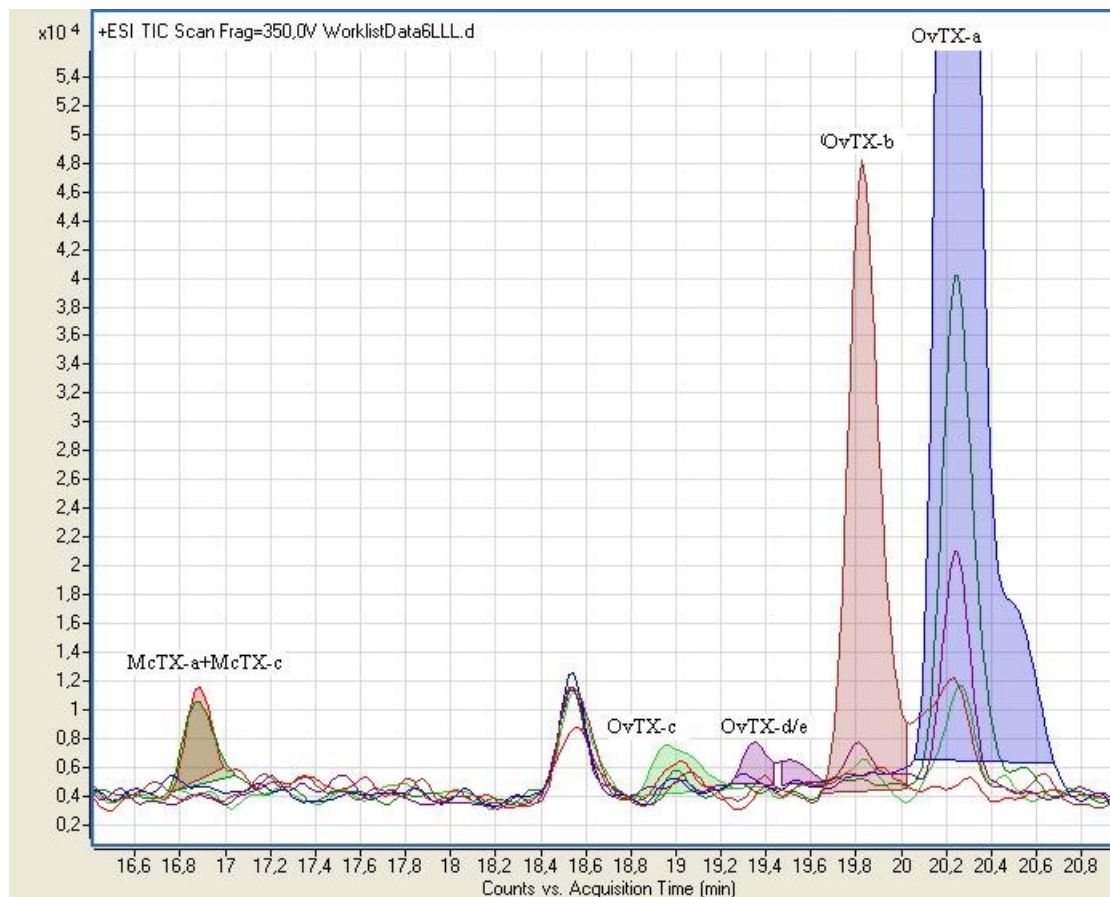
La possibilità di analizzare direttamente il contenuto di un estratto di *Ostreopsis ovata* ci ha permesso di disporre di campioni dove non solo vi era certezza della presenza della tossina ma anche della sua presenza in abbondante quantità.

La figura 33 riporta il cromatogramma (registrazione da 100 a 3000 Dalton) dell'estratto di cellule di *Ostreopsis ovata* dal quale è possibile evidenziare dei picchi significativi tra 18 e 21 minuti.



**Figura 33:** TIC (Total Ion Current) del campione di cellule di *Ostreopsis ovata*

Sfruttando le caratteristiche specifiche del rivelatore TOF abbiamo potuto, dal cromatogramma precedente, selezionare il solo contributo degli ioni 2648 per l'ovatossina-a, 2692 per l'ovatossina-b, 2708 per l'ovatossina-c, 2664 per l'ovatossina d/e, 2590 per la mascarenotossina-a e 2630 per la mascarenotossina-c. La figura 34 riporta tale cromatogramma.



**Figura 34:** EIC (Extracted Ion Chromatogram) del campione di cellule di *Ostreopsis ovata*

Al tempo 16.8 minuti eluiscono in contemporanea le due mascarenotossine.



A 19 minuti eluisce l'ovatossina-c, a 19.3 minuti eluisce l'ovatossina-d ed a 19.5 minuti eluisce l'ovatossina-e. I due picchi a 19.8 ed a 20.2 corrispondono, rispettivamente, all'ovatossina-b ed all'ovatossina-a.

Dall'analisi di ciascun picco cromatografico è stato possibile identificare gli ioni di ciascuna tossina.

- *Ovatossina-a*

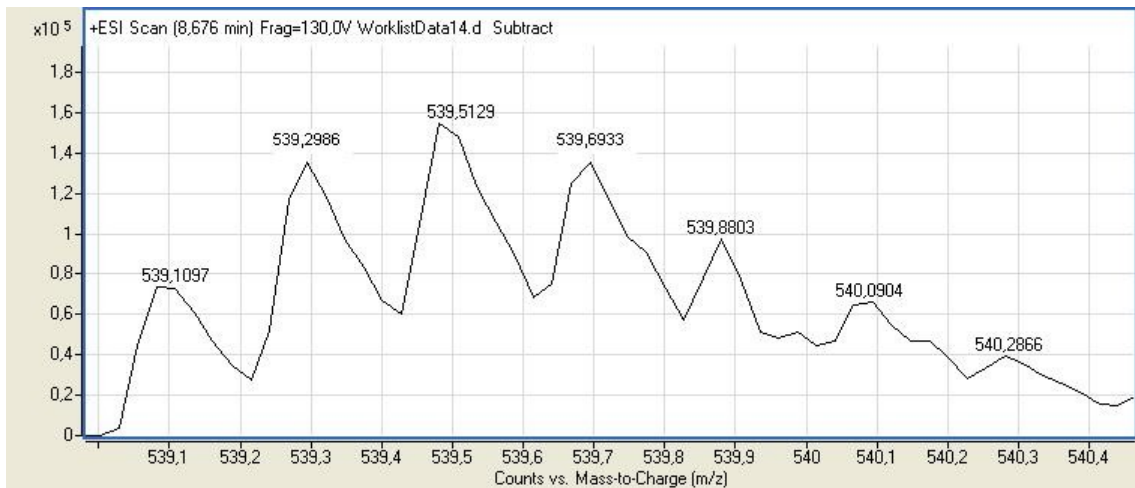
A questo punto abbiamo ritenuto opportuno verificare se gli ioni presenti potevano essere riconducibili tutti, o comunque molti di essi, all'ovatossina-a, come da dati di bibliografia (Ciminiello et al., 2008). Di seguito elenchiamo e valutiamo gli ioni molecolari dell'ovatossina-a, registrati nello spettro a 20.2, minuti per massa crescente (rapporto massa/carica,  $m/z$ ).

- *Ione  $m/z$  327 (A moiety)*

Lo ione molecolare 327.19, è caratteristico dello spettro della Palitossina. Si ottiene a seguito della rottura della molecola della Palitossina al livello del legame C8-C9 (Fig 2). Dalla rottura di questo legame si distacca un frammento neutro di 362.2 Dalton, che, a seguito alla perdita di 2 molecole di  $H_2O$ , origina il frammento  $m/z$  327 di formula bruta  $C_{16}H_{27}N_2O_5$ . Poiché la differenza tra Palitossina ed Ovatossina-a risiede nella mancanza di due atomi di ossigeno è più che plausibile che anche l'Ovatossina-a possa essere caratterizzata dalla presenza dello ione 327, caratteristica comunque riportata anche in letteratura per l'Ovatossina-a.

- *Ione  $m/z$  539*

La caratteristica di sensibilità dello spettrometro di massa utilizzato ci permette, distinguendo il contributo dei diversi isotopi del carbonio naturalmente presenti nella molecola, di registrare la distribuzione isotopica della molecola. La distribuzione isotopica dello ione 539 è rappresentata in figura 35 e la distanza di circa 0.2 unità (un quinto dell'unità tra carbonio 12 e carbonio 13) tra i vari isotopi indica che la molecola è pentacarica.

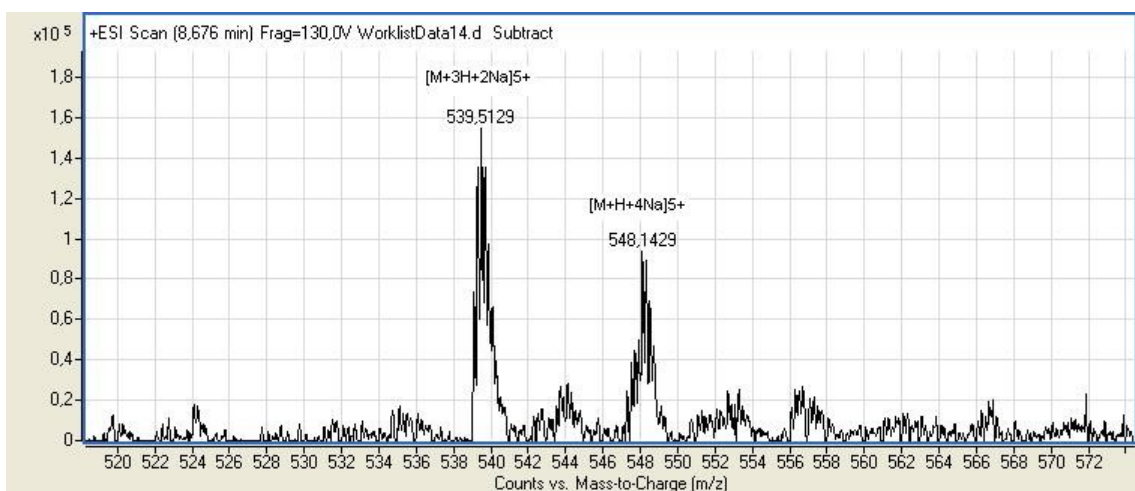


**Figura 35:** Distribuzione isotopica dello ione 539

Possiamo quindi calcolare il peso molecolare della molecola originale partendo dalla massa del picco monoisotopico (539.10) e moltiplicandolo per il numero delle cariche (5). Il peso della molecola pentacarica è quindi di 2695.5. Se a questo peso molecolare sottraiamo il peso molecolare

della Ovatossina-a (2646.47) otteniamo 49.03 Da, pari al peso molecolare degli atomi che apportano alla Ovatossina-a le cinque cariche positive trovate. È facile verificare che due atomi di sodio (MW 22.99) e tre di idrogeno (MW 1.008) eguagliano proprio tale massa. Questa interpretazione dello ione 539 ci permette di ritenere con buona probabilità che ci troviamo dinanzi l'Ovatossina-a pentacarica con tre atomi di idrogeno e due di sodio:  $[M+3H+2Na]^{5+}$ .

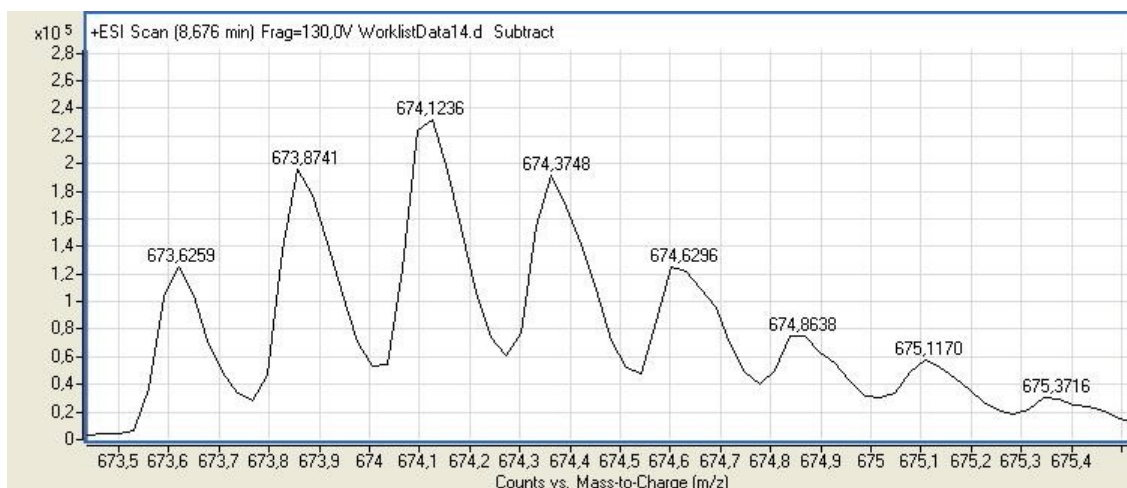
Effettuando lo stesso ragionamento e calcolo per lo ione 548 sempre pentacarico, possiamo identificarlo come:  $[M+H+4Na]^{5+}$  (Fig. 36).



**Figura 36:** Ioni pentacarichi

- *Ione m/z 674*

In figura 37 la distribuzione isotopica dello ione 674:



**Figura 37:** Distribuzione isotopica dello ione 674

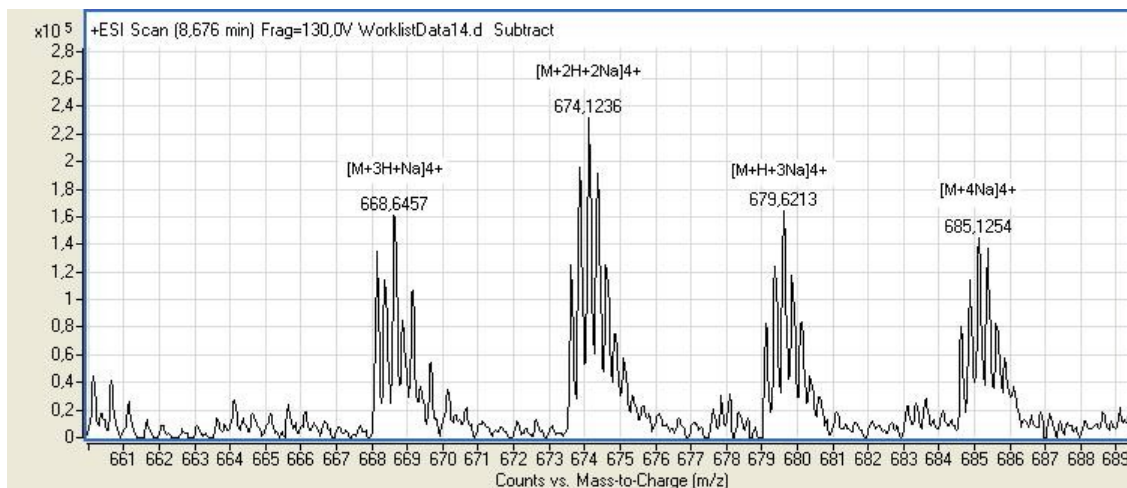
La distanza di circa 0.25 una tra i vari isotopi indica che la molecola è tetracarica. Segue che può essere considerato come l'ovatossina-a con due idrogeni e 2 atomi di sodio:  $674.12 = [M+2H+2Na]^{4+}$ .

Vi sono altri ioni tetracarichi che possono essere ricondotti all'Ovatossina-a (Fig. 38):

$$668.64 = [M+3H+Na]^{4+}$$

$$679.62 = [M+H+3Na]^{4+}$$

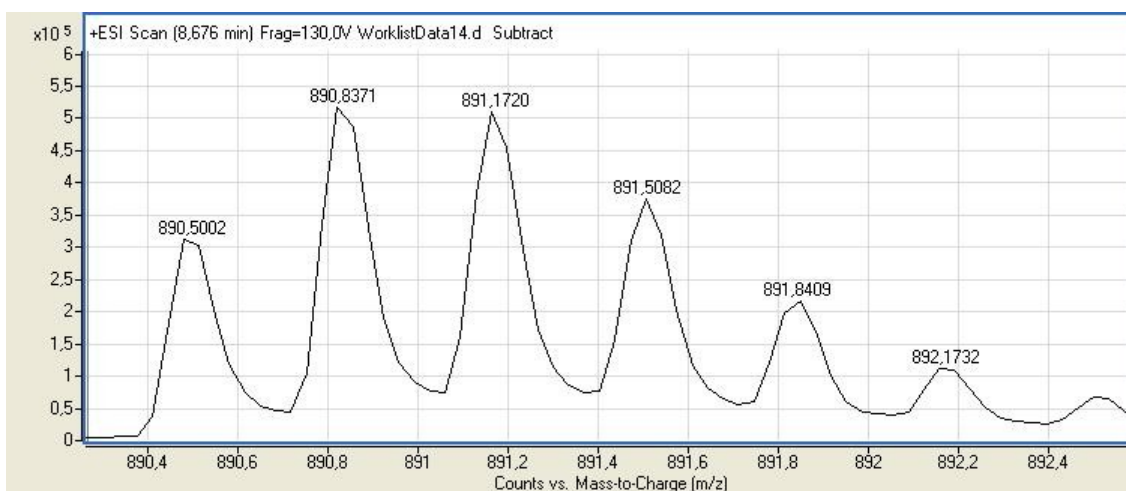
$$685.12 = [M+4Na]^{4+}$$



**Figura 38:** Ioni tetra carichi

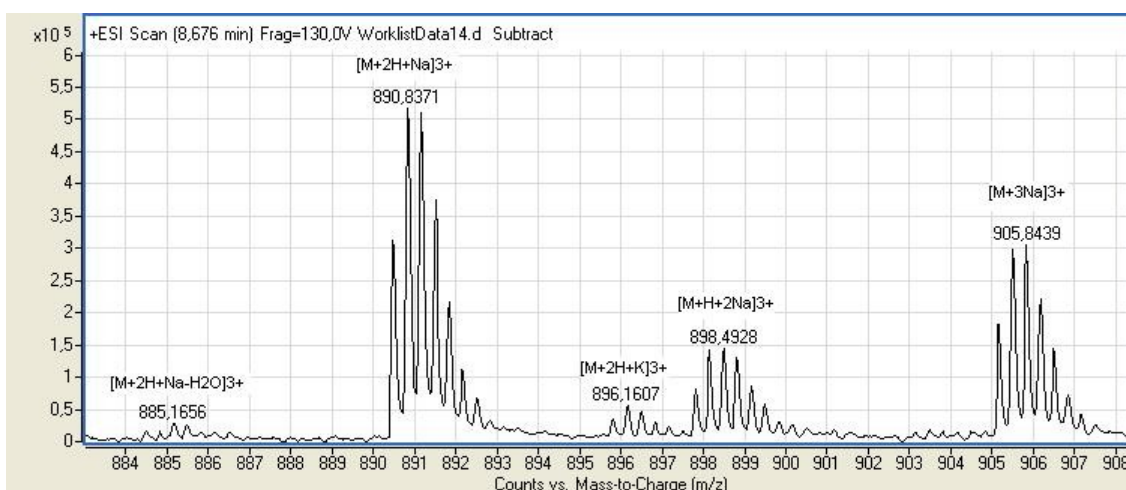
- *Ione m/z 890*

La distribuzione isotopica dello ione 890 è rappresentata in figura 39 e la distanza di circa 0.33 tra i vari isotopi indica che la molecola è tricarica.



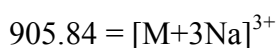
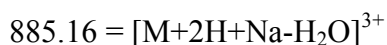
**Figura 39:** Distribuzione isotopica dello ione 890

Analogamente vi sono altri ioni con le stesse caratteristiche individuabili ingrandendo lo spettro di figura 39 nell'intorno dello ione 890 (Fig. 40).



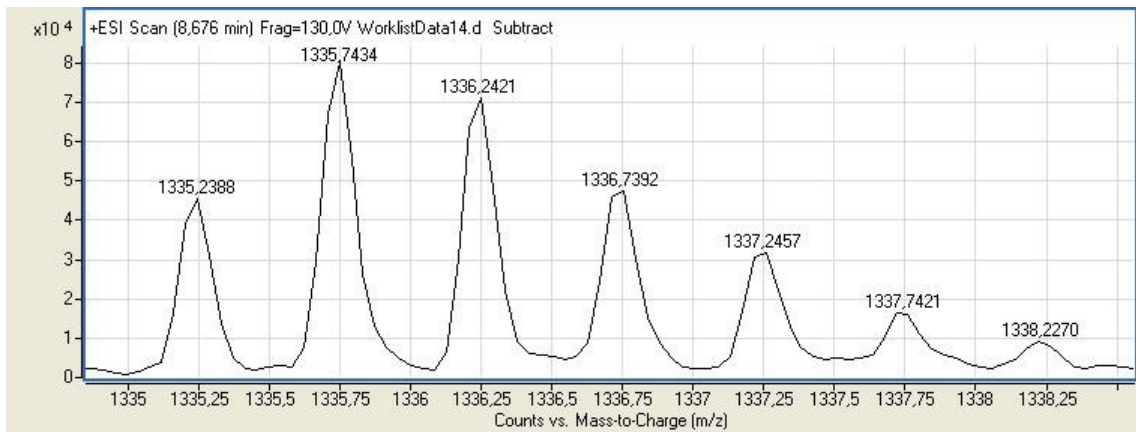
**Figura 40:** Ioni tricarichi

Anche questi possono essere tutti ricondotti all'Ovatossina-a:



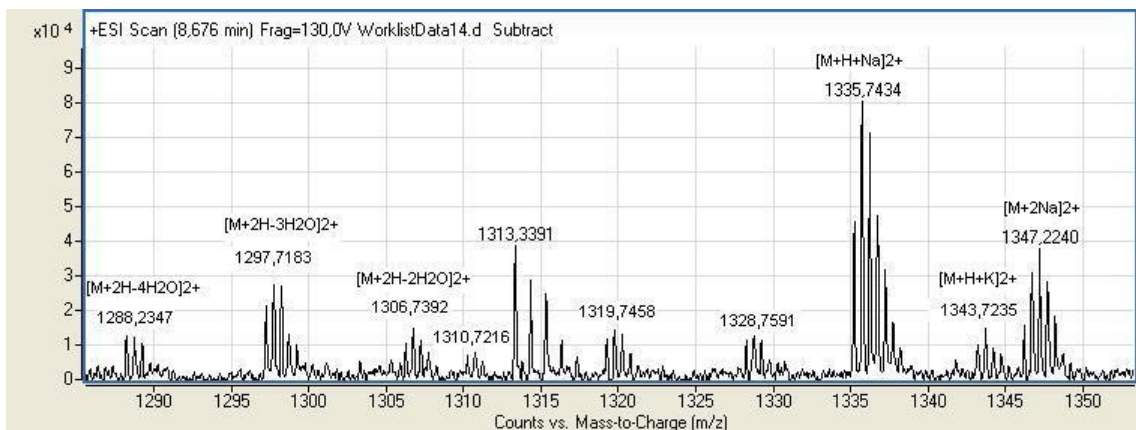
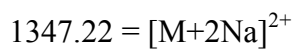
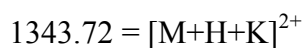
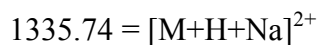
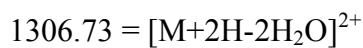
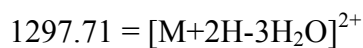
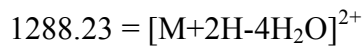
- *Ione m/z 1335*

La distribuzione isotopica dello ione 1335 è rappresentata in figura 41 e la distanza di circa 0.5 tra i vari isotopi indica che la molecola è bicarica.



**Figura 41:** Distribuzione isotopica dello ione 1335

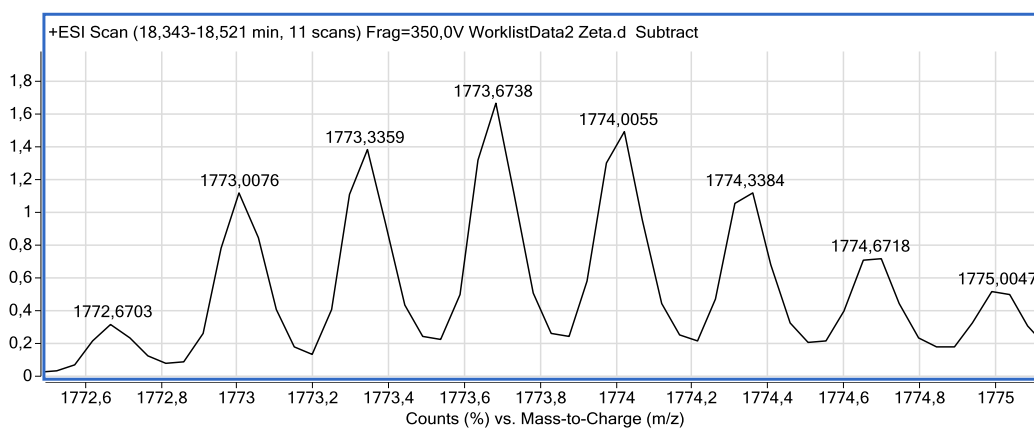
Analogamente al caso precedente ingrandendo lo spettro di figura 40 nell'intorno dello ione 1335 (Fig. 42) è possibile riconoscere altri ioni derivanti dall'Ovatossina-a:



**Figura 42:** Ioni bicarichi

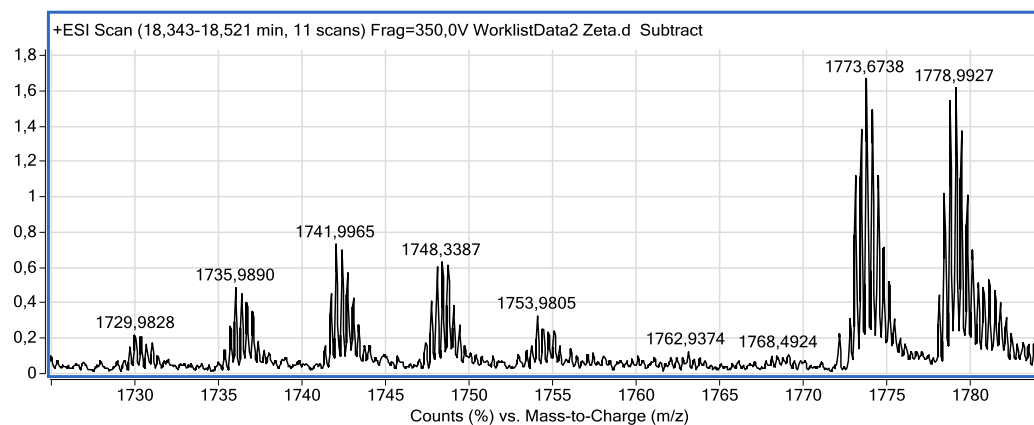
- *Ione m/z 1773*

La distribuzione isotopica dello ione 1773 è rappresentata in figura 43 e la distanza di circa 0.33 tra i vari isotopi indica che la molecola è tricarica e dovrebbe corrispondere al dimero della Ovatossina-a.



**Figura 43:** Distribuzione isotopica dello ione 1773

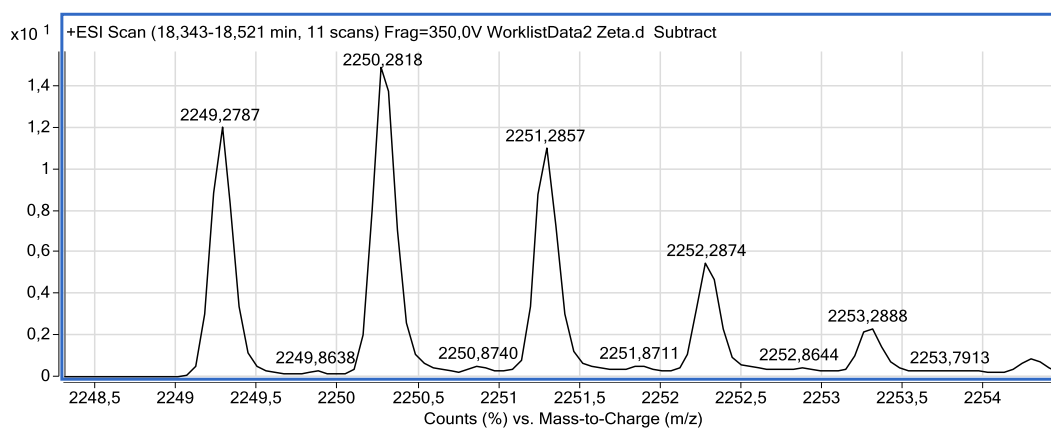
Analogamente al caso precedente ingrandendo lo spettro di Fig. 42 nell'intorno dello ione 1773 (Fig. 44) è possibile riconoscere altri ioni derivanti dal dimero dell'ovatossina-a:



**Figura 44:** Dimero tricarico

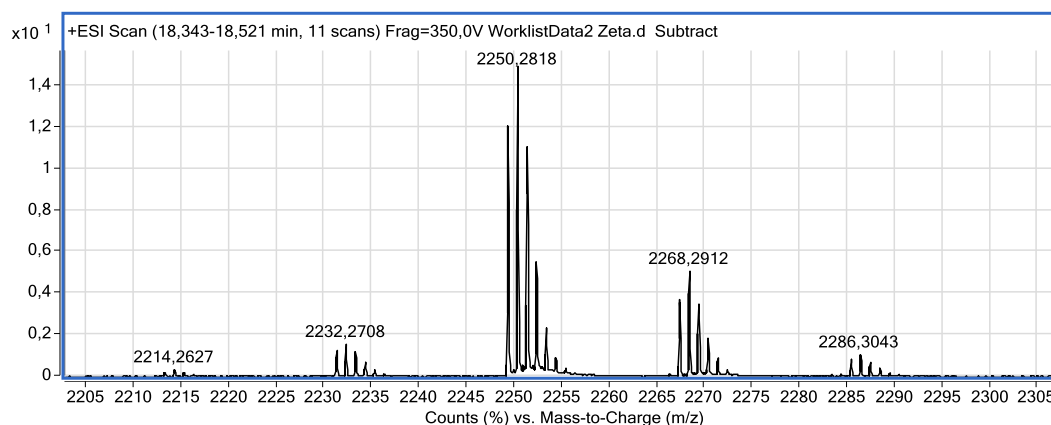
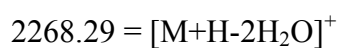
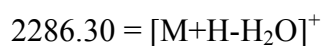
- *Ione m/z 2250*

La distribuzione isotopica dello ione 2250 è rappresentata in figura 45 e la distanza di circa 1 tra i vari isotopi indica che la molecola è monocarica e dovrebbe corrispondere alla B moiety della Ovatossina-a.



**Figura 45:** Distribuzione isotopica dello ione 2250

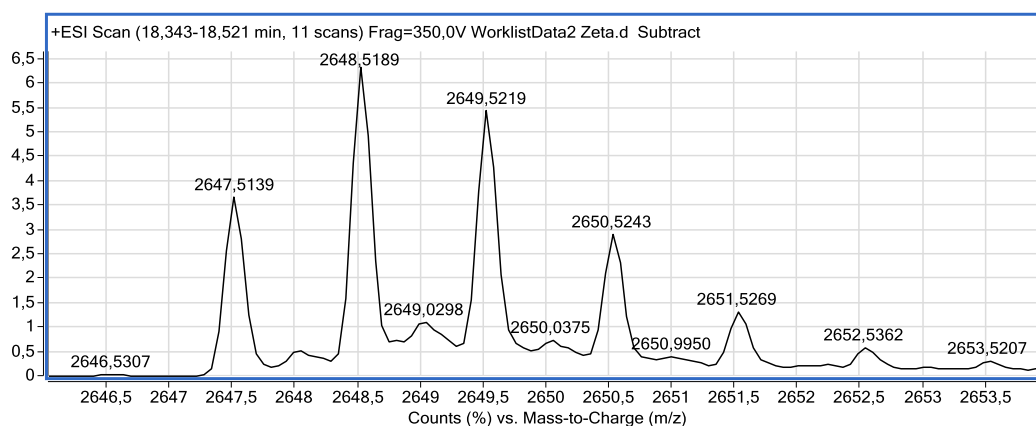
Nell'intorno dello ione 2250 (Fig.46) è possibile riconoscere altri ioni costituenti il cluster della B moiety dell'Ovatossina-a:



**Figura 46:** Cluster della B moiety

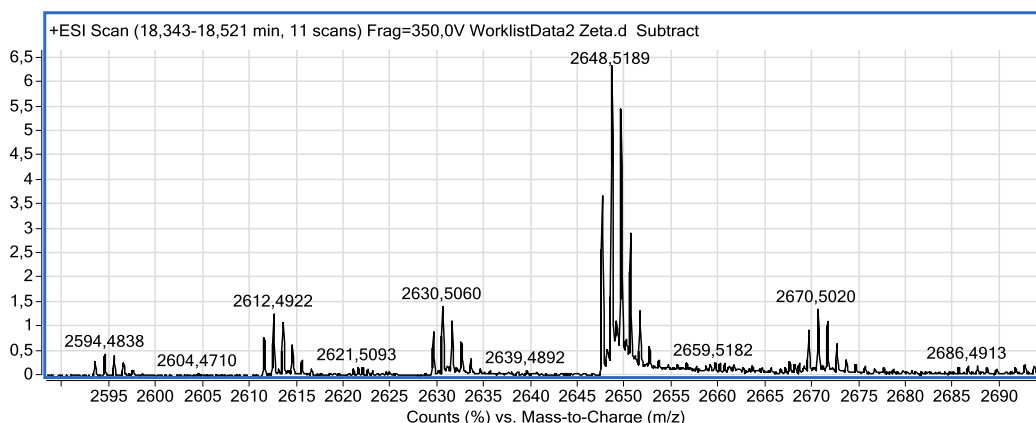
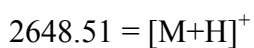
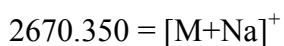
- *Ione m/z 2648*

La distribuzione isotopica dello ione 2648 è rappresentata in figura 47 e la distanza di circa 1 tra i vari isotopi indica che la molecola è monocarica e dovrebbe corrispondere allo ione molecolare della Ovatossina-a.



**Figura 47:** Distribuzione isotopica dello ione 2648

Nell'intorno dello ione 2648 (Fig. 48) è possibile riconoscere altri ioni costituenti il cluster dello ione molecolare dell'Ovatossina-a:



**Figura 48:** Cluster dello ione molecolare

Lo spettro che descrive quindi il pattern ionico tipico della Ovatossina-a è stato riscontrato in tutti i campioni di *Ostreopsis cf. ovata* analizzati.

Siamo quindi passati ad analizzare il pattern ionico delle altre molecole, in ordine di tempo di eluizione:

Mascarenotossina-a/-c;

Ovatossina-c;

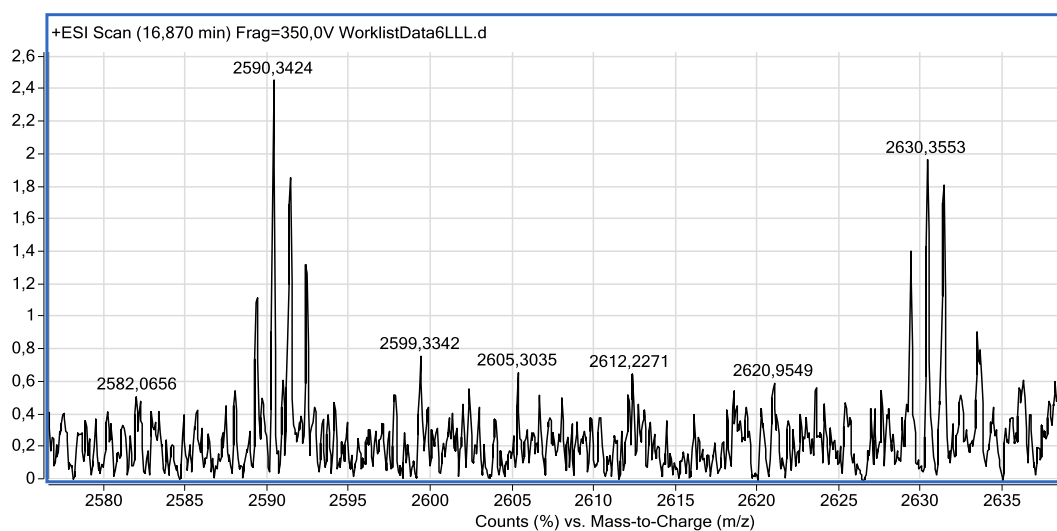
Ovatossina-d/-e;

Ovatossina-b.



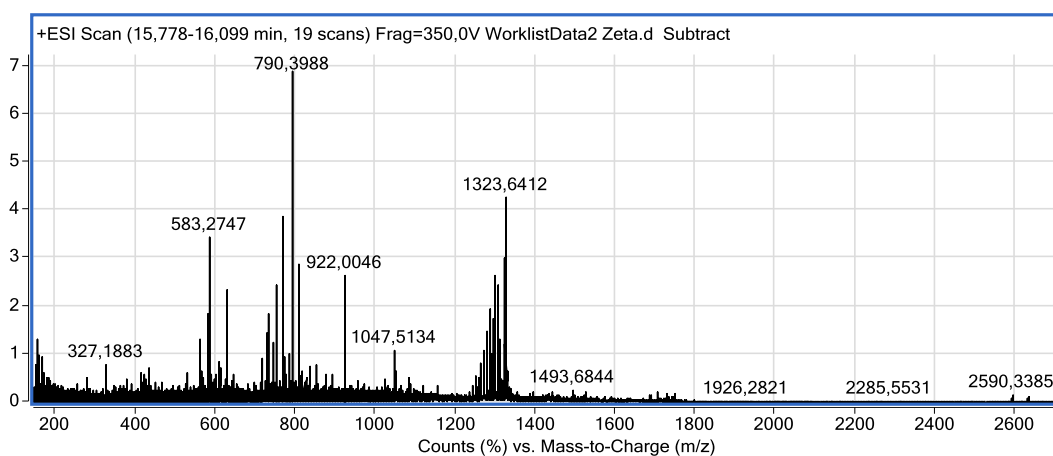
- **Mascarenotossina-a/-c**

La mascarenotossina-a (MW 2588) è una molecola già descritta in precedenza come palitossino-simile da Severine Lenoir (Lenoir et al., 2004) prodotta dall'alga bentonica *Ostreopsis mascarenensis*. Insieme alla Mascarenotossina-a era presente un'altra molecola, la Mascarenotossina-b (MW 2606), che non siamo riusciti ad identificare nell'estratto metanolico di *Ostreopsis cf. ovata* ma, in compenso, abbiamo evidenziato la presenza di una molecola ad  $m/z$  2629  $[M+H]^+$  che abbiamo chiamato Mascarenotossina-c (Fig. 49).



**Figura 49:** Mascarenotossina-a/-c  $[M+H]^+$

Le Mascarenotossina-a e -c presentano un pattern ionico molto simile a quello della Ovatossina-a, con la formazione di ioni bicarichi e del frammento A ad  $m/z$  327 (Fig. 50).

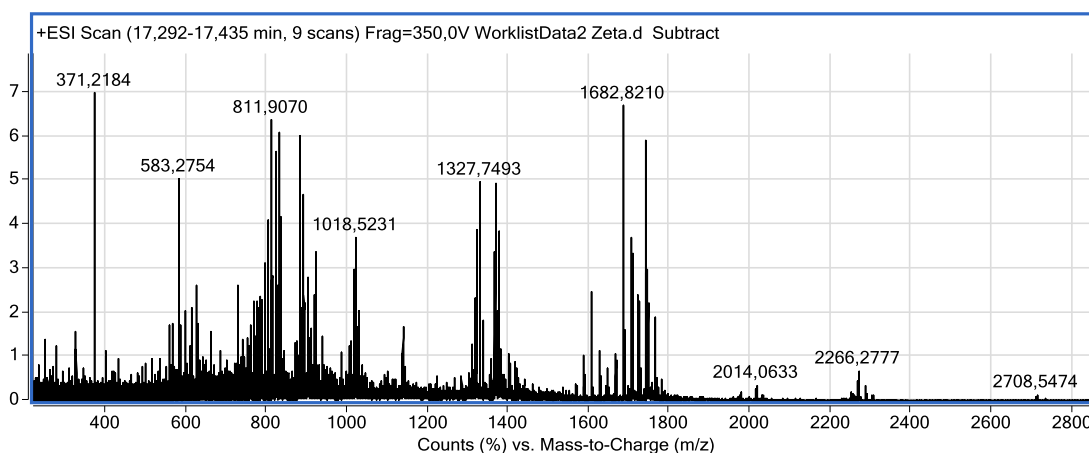


**Figura 50:** Mascarenotossina-a/-c, spettro completo

Non è stato possibile identificare la formula bruta di queste nuove molecole a causa del loro basso quantitativo.

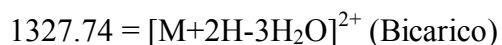
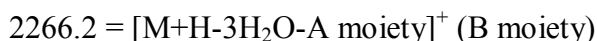
- **Ovatossina-c**

L'Ovatossina-c eluisce a circa 19 minuti. Dallo spettro completo (Fig. 51) si evince che il frammento A è costituito da uno ione di massa 371 di formula bruta  $C_{18}H_{31}N_2O_5$ . La conferma di questa nuova frammentazione della molecola è data dalla presenza della B moiety ad  $m/z$  2266  $[M+H-3H_2O-A moiety]^+$  invece che ad  $m/z$  2250  $[M+H-3H_2O-A moiety]^+$  come per la Ovatossina-a.



**Figura 51:** Ovatossina-c: spettro completo

Nello spettro in figura 50 co-eluiscono altre molecole di identità ignota. Gli ioni della Ovatossina-c sono i seguenti:

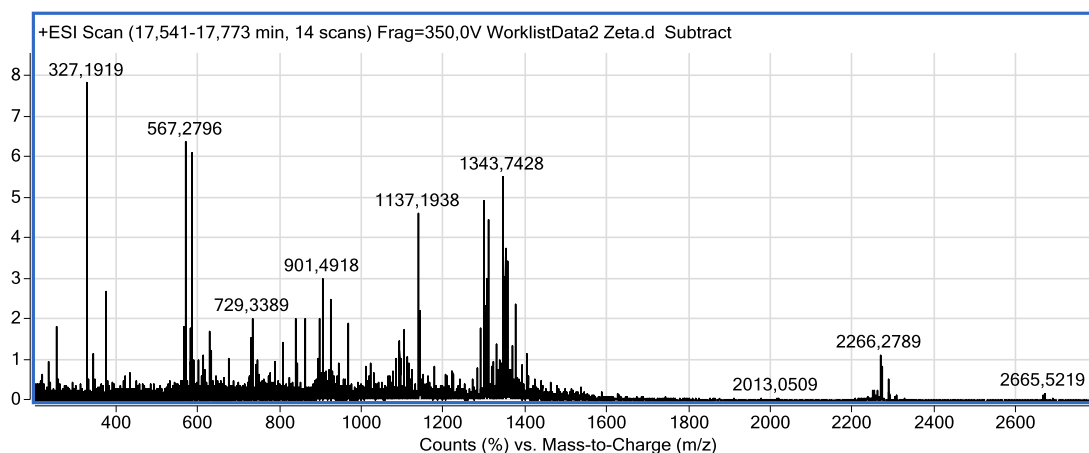


La formula bruta di tale molecola indica la presenza di un gruppo  $C_2H_4O$  in più rispetto alla Ovatossina-a ( $C_{131}H_{227}N_3O_{55}$ ). Il gruppo  $C_2H_4$  è inserito nella A moiety mentre l'atomo di ossigeno è nella B moiety.

- **Ovatossina-d/-e**

L'Ovatossina-d eluisce a circa 19.3 minuti. Questa molecola era già stata identificata come Deossipalitossina da Uemura et al. nel 1985 in un estratto di *Palythoa tuberosa*. In figura 52 è possibile individuare i seguenti ioni:

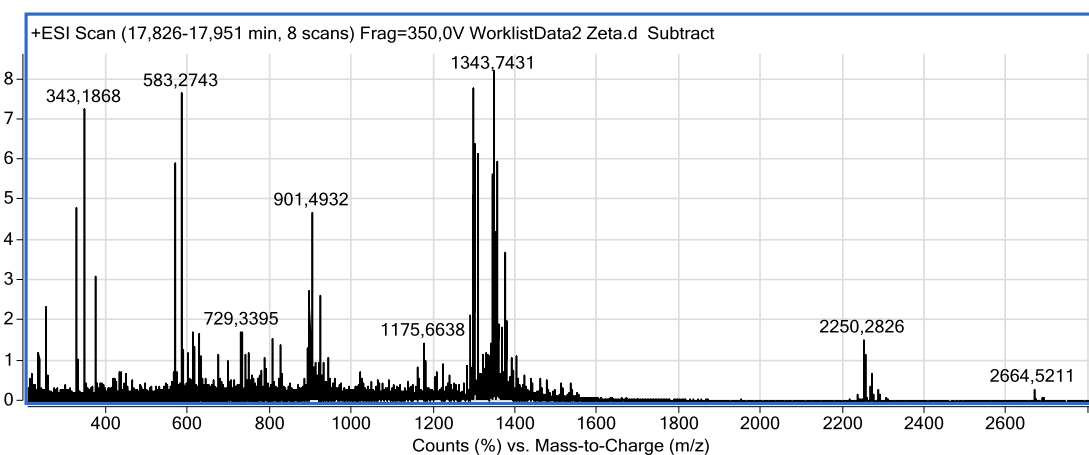
- 2664.5 =  $[M+H]^+$  (Monocarico)  
 2266.2 =  $[M+H-3H_2O-A \text{ moiety}]^+$  (B moiety)  
 1343.74 =  $[M+H+Na]^{2+}$  (Bicarico)  
 327.19 =  $[M+H-H_2O-B \text{ moiety}]^+$  (A moiety)



**Figura 52:** Ovatossina-d: spettro completo

La formula bruta di tale molecola indica la presenza di un atomo di ossigeno in più rispetto alla Ovatossina-a ( $C_{129}H_{223}N_3O_{53}$ ), inserito nella B moiety, simile a quella della Ovatossina-c.

L'Ovatossina-e eluisce a circa 19.5 minuti (Fig. 53). Questa molecola non era mai stata identificata prima d'ora e sembrerebbe un isomero della Ovatossina-d. Questa molecola ha, però, una diversa frammentazione che porta alla formazione di una B moiety uguale a quella della Ovatossina-a ed una A moiety ad  $m/z$  343  $C_{16}H_{27}N_2O_6$ .



**Figura 53:** Ovatossina-e: spettro completo

In figura 52 è possibile individuare i seguenti ioni:

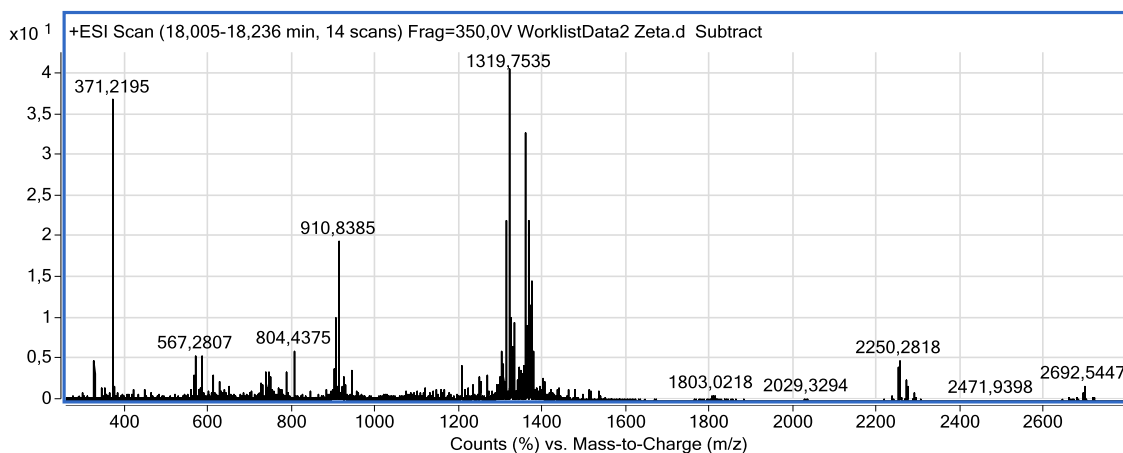
- 2664.5 =  $[M+H]^+$  (Monocarico)  
 2250.2 =  $[M+H-3H_2O-A \text{ moiety}]^+$  (B moiety)  
 1343.74 =  $[M+H+Na]^{2+}$  (Bicarico)

$$343.18 = [M+H-H_2O-B \text{ moiety}]^+ \text{ (A moiety)}$$

A differenza della Ovatossina-d, l'ossigeno in più nella Ovatossina-e è inserito nella A moiety.

- **Ovatossina-b**

L'Ovatossina-b eluisce a circa 18 minuti. Dallo spettro completo (Fig. 54) si evince che il frammento A è costituito da uno ione di massa 371 di formula bruta  $C_{18}H_{31}N_2O_5$ . La conferma di questa nuova frammentazione della molecola è data dalla presenza della B moiety ad  $m/z$  2250  $[M+H-3H_2O-A \text{ moiety}]^+$  come per la Ovatossina-a.



**Figura 54:** Ovatossina-b: spettro completo

Gli ioni della Ovatossina-b sono i seguenti:

$$2692.5 = [M+H]^+ \text{ (Monocarico)}$$

$$2250.2 = [M+H-3H_2O-A \text{ moiety}]^+ \text{ (B moiety)}$$

$$1803.2 = [2M+2H+Na]^{3+} \text{ (Dimero)}$$

$$1319.74 = [M+2H-3H_2O]^{2+} \text{ (Bicarico)}$$

$$371.21 = [M+H-H_2O-B \text{ moiety}]^+ \text{ (A moiety)}$$

La formula bruta di tale molecola indica la presenza di un gruppo  $C_2H_4$  in più rispetto alla Ovatossina-a ( $C_{131}H_{227}N_3O_{54}$ ). Il gruppo  $C_2H_4$  è inserito nella A moiety.

### **3.3 Determinazione HPLC-TOF-MS di Palitossine ed Ovatossine in mitili del Golfo di Napoli.**

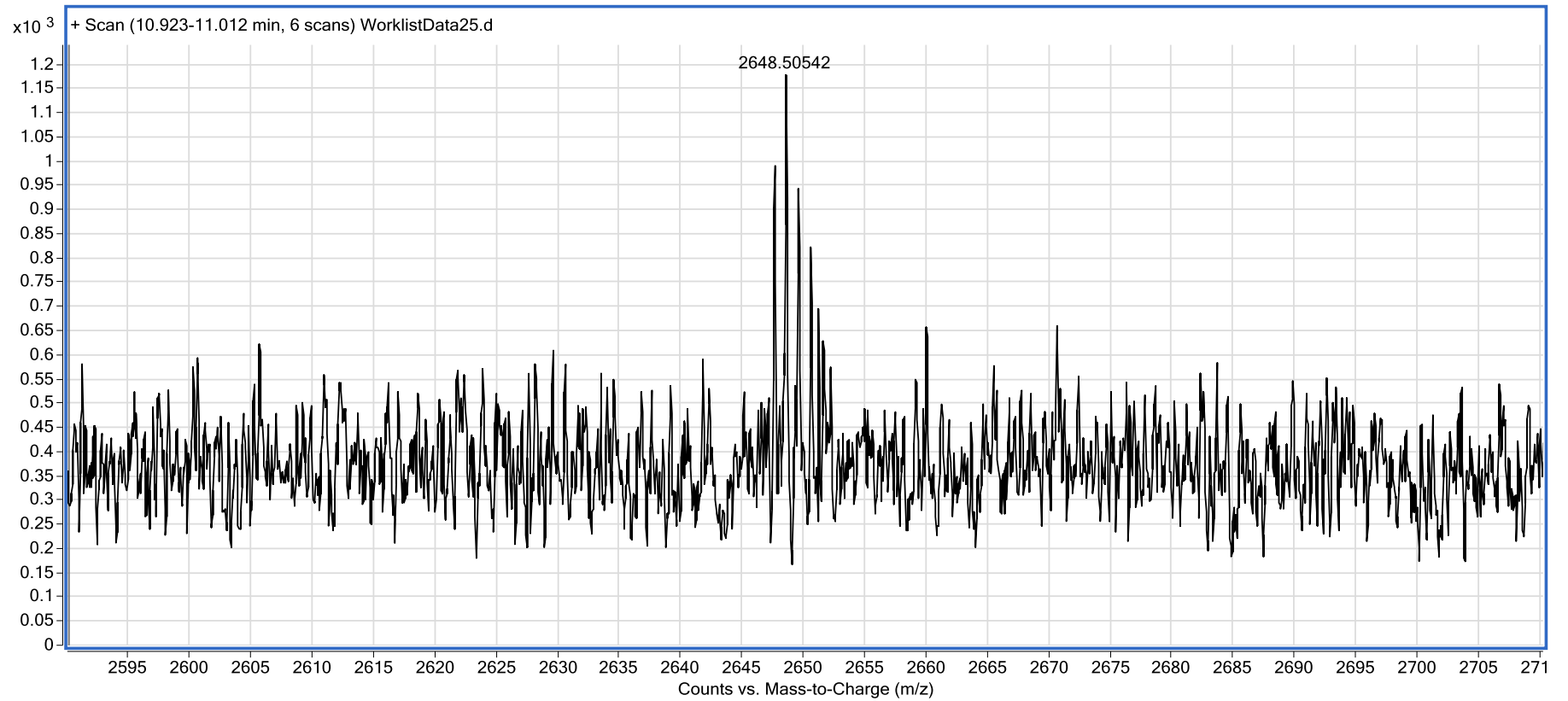
#### 3.3.1 Parte sperimentale e Risultati

L'approccio analitico utilizzato per la determinazione dell'Ovatossina-a nei campioni di alghe è stato applicato anche a quei campioni risultati positivi al mouse test. Su questi campioni di cozze e ricci si è riusciti a determinare sia la presenza di Ovatossina-a sia dell'Ovatossina-b.

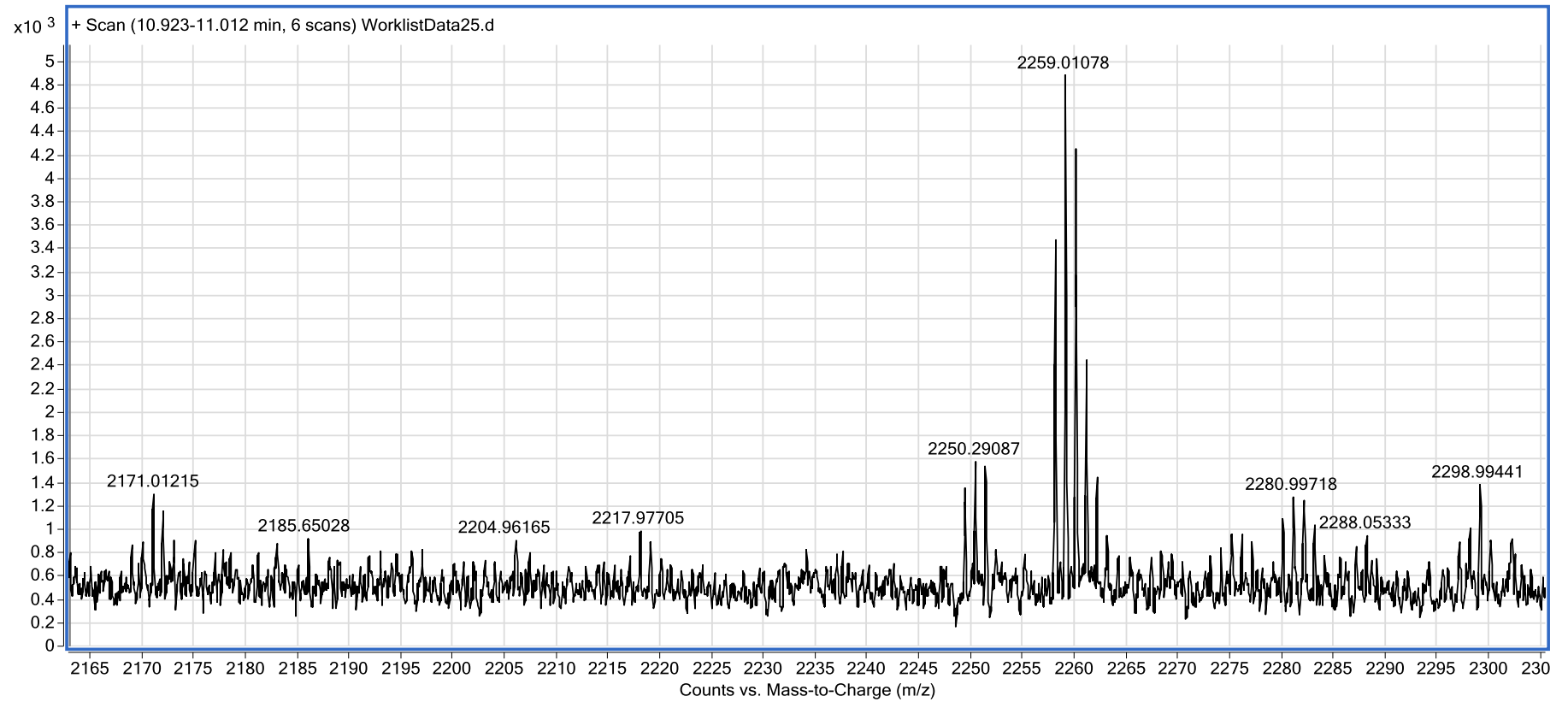
Il campione, nonostante la purificazione mediante SPE, si presenta ancora molto sporco, è quindi consigliabile utilizzare sempre una precolonna adeguata per salvaguardare il corretto funzionamento delle colonne cromatografiche in uso.

Durante le prime prove di messa a punto del metodo sono stati analizzati i campioni di mitili e ricci di mare prelevati dall'ARPAC nel corso del "Piano di Monitoraggio *Ostreopsis ovata* lungo le coste campane" risultati fortemente positivi al mouse-test, così da avere una quantità di tossina sicuramente determinabile.

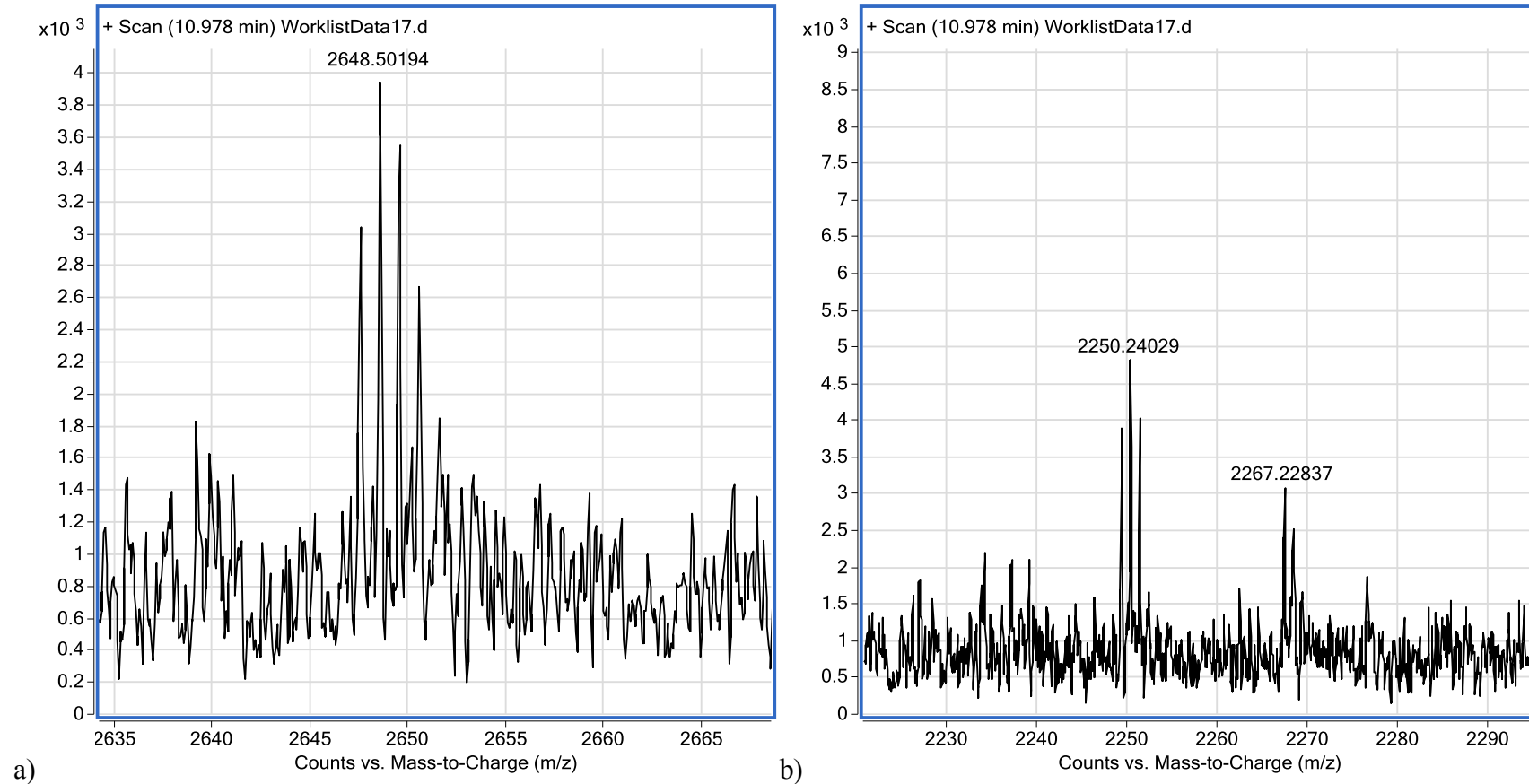
I risultati dell'analisi mostrano una propensione per la formazione dello ione molecolare, come è possibile vedere in figura 55 e 57a, mentre gli ioni bicarichi e monocarichi sembrano meno favoriti (Fig. 56, 57b e 58):



**Figura 55:** Spettro del campione di mitili prelevato nel sito di Rocce Verdi il 2 Agosto 2010 ad  $m/z$  2595-2705 in cui è ben visibile lo ione molecolare della Ovatossina-a  $(M+H)^+ = 2647.49759$ . Il contenuto di tossina è stato stimato 216 ng/g.

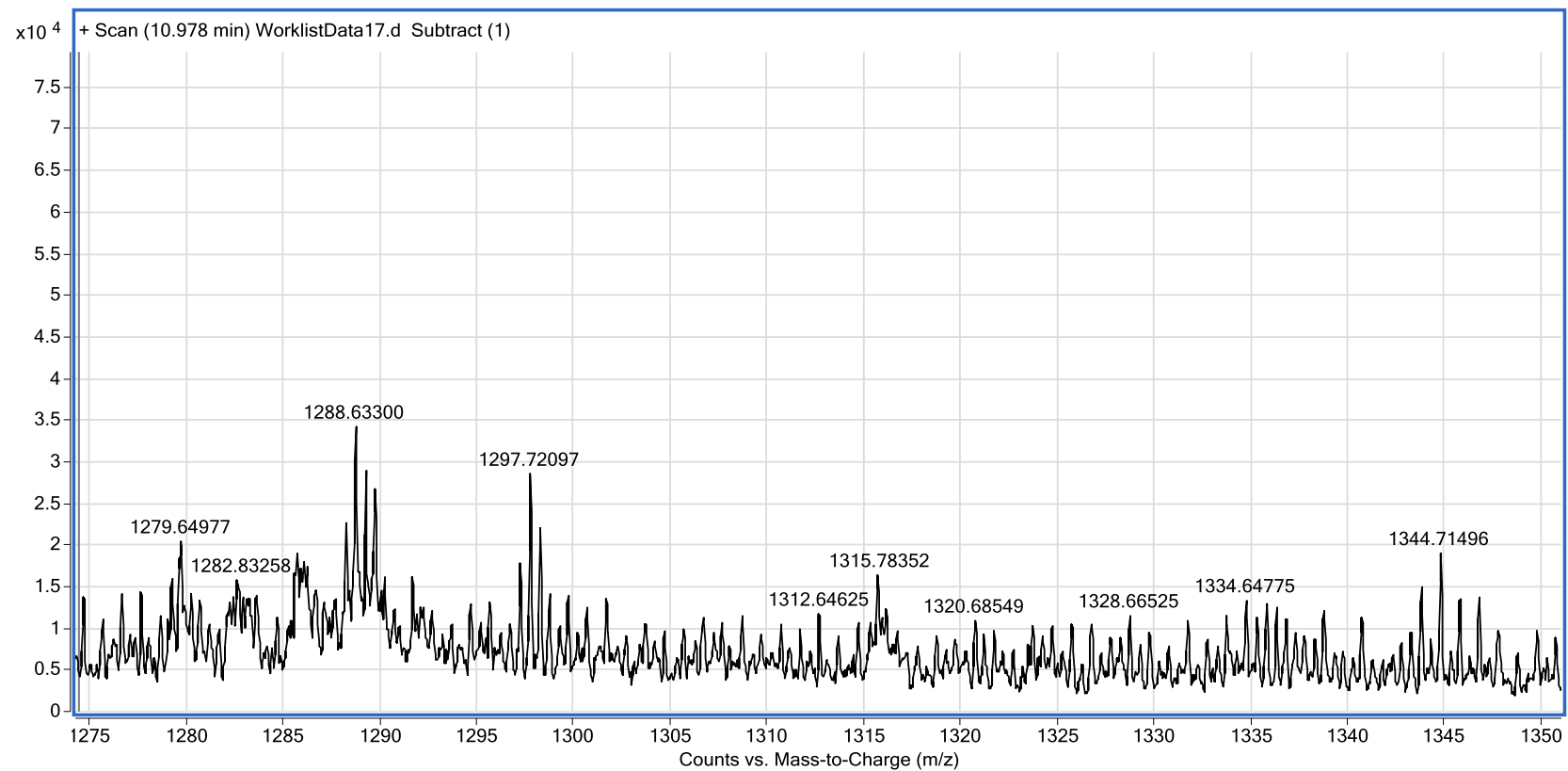


**Figura 56:** Spettro del campione di mitili prelevato nel sito di Rocce Verdi il 2 Agosto 2010 ad  $m/z$  2165-2300 in cui è visibile lo ione 2250 (B moiety) della Ovatossina-a (B moiety+H-3H<sub>2</sub>O)<sup>+</sup> = 2249.271159



**Figura 57:** Spettro del campione di ricci di mare prelevato nel sito di Porto Infreschi il 2 Agosto 2010 ad  $m/z$  2635-2665 in cui è visibile lo ione molecolare della Ovatossina-a  $(M+H)^+ = 2647.49759$  (a) e ad  $m/z$  2230-2290 in sono visibili gli ioni 2250 e 2267 (B moiety) della Ovatossina-a  $(B\ moiety+H-2H_2O)^+ = 2267.281724$  e  $(B\ moiety+H-3H_2O)^+ = 2249.271159$  (b). Il contenuto di tossina è stato stimato 216 ng/g.





**Figura 58:** Spettro del campione di ricci di mare prelevato nel sito di Porto Infreschi il 2 Agosto 2010 ad  $m/z$  1275-1350 in cui sono ben visibili gli ioni bicarichi della Ovatoxina-a  $(M+2H-3H_2O)^{2+} = 1297.23686$  ed  $(M+2H-4H_2O)^{2+} = 1288.231578$

Questi primi dati ottenuti ci hanno permesso di determinare la presenza di tossina in campioni che contenevano una concentrazione  $\geq 200$ ppb. Purtroppo questi limiti di quantificazione erano ancora troppo elevati, per cui si è proceduto al miglioramento della sensibilità del metodo.

### ❖ FASE II: studio in modalità a ioni negativi

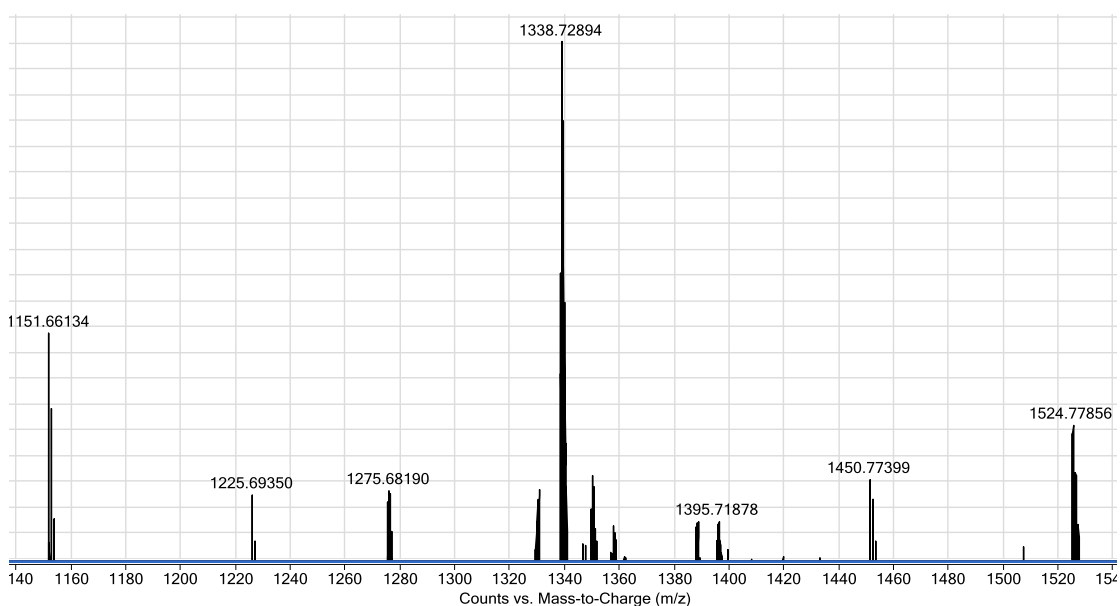
Per migliorare la sensibilità strumentale abbiamo effettuato lo switch della modalità di acquisizione da “ioni positivi” a “ioni negativi”. Con questa diversa modalità di acquisizione si ha un drastico aumento dell'intensità di segnale, senza contare il fatto che si ottiene il quasi totale abbattimento dei segnali dati dalle conseguenti perdite delle molecole di acqua dallo ione molecolare. Si ottiene così uno spettro con segnali più intensi e con meno interferenti.

Abbiamo dunque effettuato i primi esperimenti con lo standard della Palitossina senza variare altri parametri. I primi esperimenti hanno dato dei risultati poco chiari dovuti ad una eccessiva ionizzazione da parte degli acidi delle fasi mobili per cui gli esperimenti sono stati ripetuti successivamente utilizzando le seguenti fasi mobili:

*A = 0.1% Acido Formico in Acqua;*

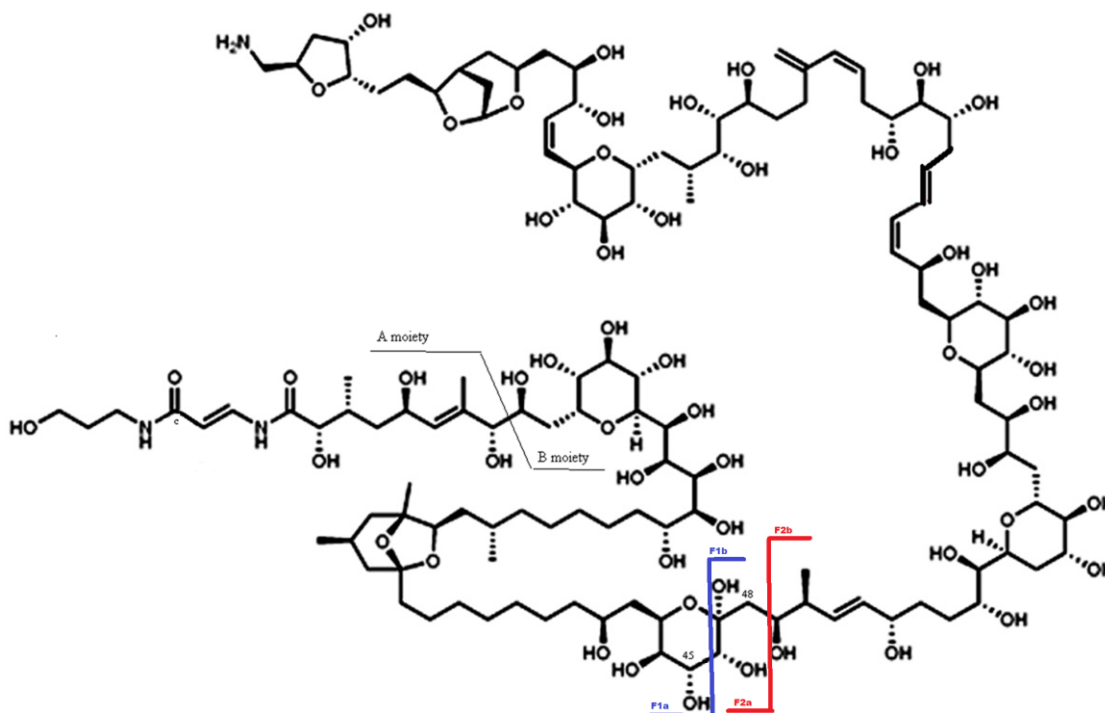
*B = Acido Formico in Acetonitrile/Acqua (95:5)*

Il pattern ionico così ottenuto mostrava nello spettro degli ioni sino ad oggi sconosciuti (Fig. 59)



**Figura 59:** Spettro del materiale di riferimento alla concentrazione di 1.25 ppm ad  $m/z$  1120-1560 in cui sono visibili gli ioni caratteristici della palitossina analizzata in modalità a ioni negativi descritti in dettaglio in tabella 2

Analizzando la figura che rappresenta la formula di struttura della Palitossina, è stato possibile dedurre che questi nuovi ioni sino ad oggi sconosciuti derivino da due distinte frammentazioni della molecola che portano alla formazione di 4 ioni da noi identificati come “Frammenti F1a-F1b” (1151-1524) e “Frammenti F2a-F2b” (1225-1450), rappresentati in figura 60 e descritti in dettaglio in tabella 2.



**Figura 60:** Frammentazione caratteristica della palitossina analizzata in modalità a ioni negativi. In blu i due frammenti F1 ed in rosso i due frammenti F2.

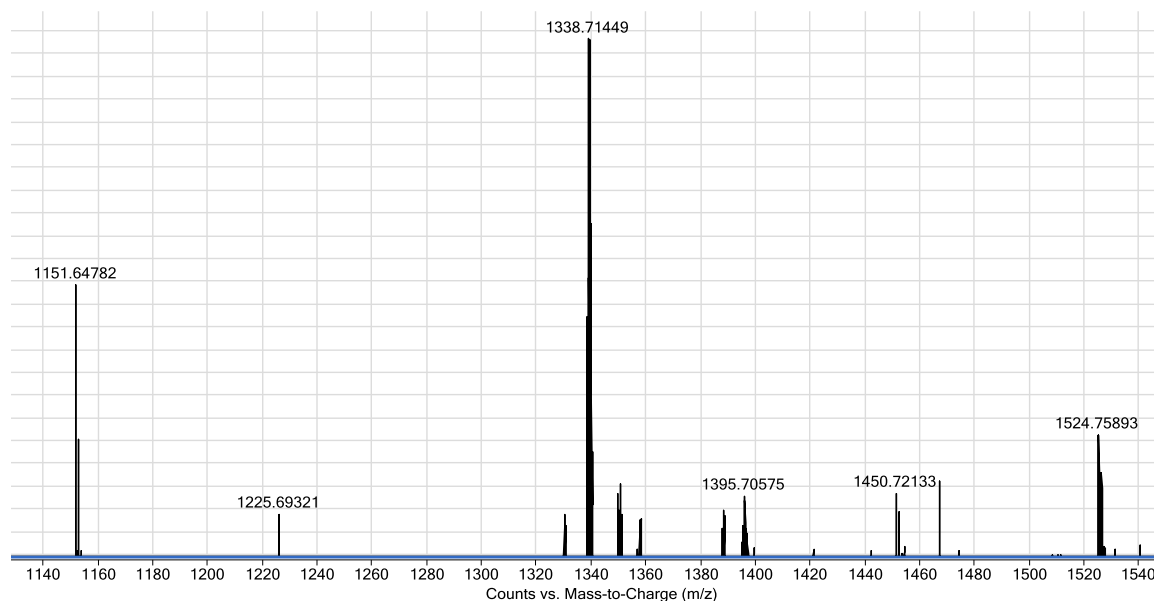
Tabella 2: Ioni caratteristici della Palitossina analizzata in modalità a ioni negativi

Frammento	Ione	$[M-H]^-$	Formula	$\Delta$ ppm
$[M-2H]^{2-}$	1338	1338.23214	$C_{129}H_{221}N_3O_{54}$	-1.82
$[F2b-H]^-$	1450	1450.7585	$C_{70}H_{116}NO_{30}$	0.15
$[F2a-H]^-$	1225	1225.7055	$C_{59}H_{105}N_2O_{24}$	0.59
$[F1b-H]^-$	1524	1524.7962	$C_{73}H_{122}NO_{32}$	-0.44
$[F1a-H]^-$	1151	1151.6690	$C_{56}H_{99}N_2O_{22}$	0.40
$[F1a-H-CH_2O]^-$	1121	1121.6571	$C_{55}H_{97}N_2O_{21}$	1.55
$[F1a-H-2CH_2O]^-$	1091	1091.6463	$C_{54}H_{95}N_2O_{20}$	1.82

Non è stato identificato nessuno ione che corrispondesse alla A moiety o alla B moiety. Molto probabilmente la ionizzazione di questi ioni, se pur si dovessero formare, non è favorita in modalità a ioni negativi.

L'aumento della sensibilità del metodo ci ha permesso di ottenere uno spettro completo anche a basse concentrazioni, come è possibile vedere nella figura 61 in cui

è rappresentato lo spettro del materiale di riferimento alla concentrazione di 0.0625 ppm.



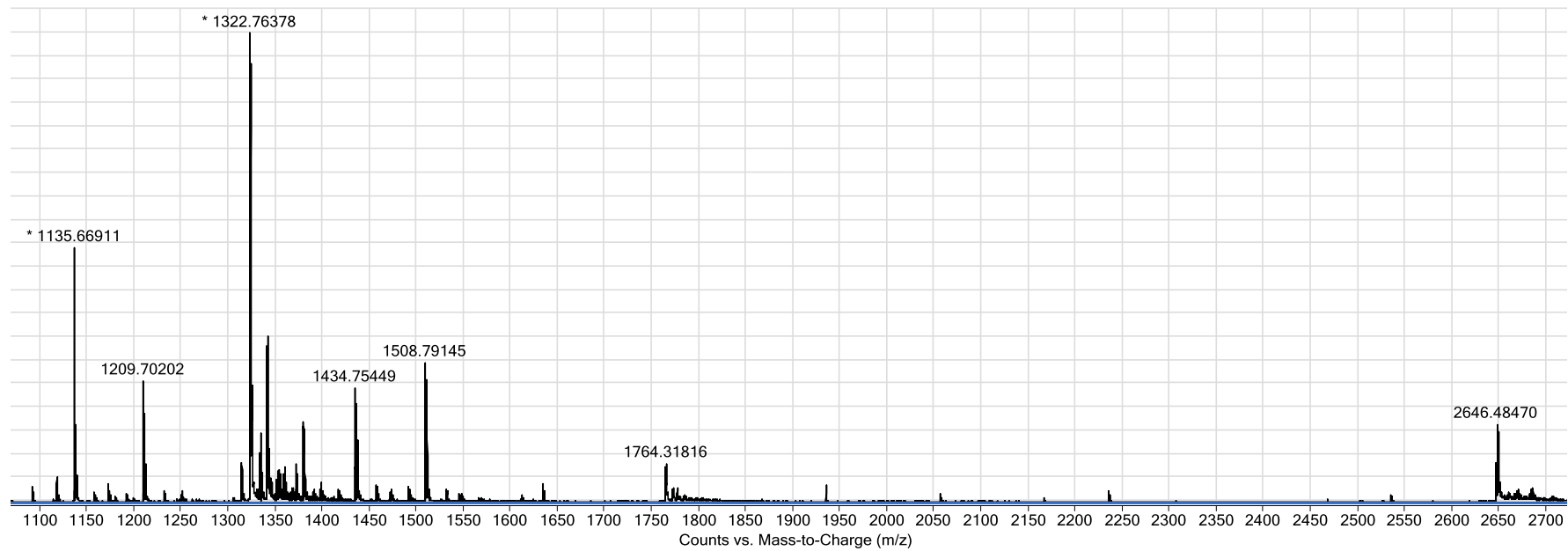
**Figura 61:** Spettro del materiale di riferimento alla concentrazione di 0.0625 ppm ad  $m/z$  1120-1560 in cui sono ancora ben visibili tutti gli ioni caratteristici della palitossina.

Abbiamo dunque rivolto la nostra attenzione all'analisi in negativo dei campioni di alghe, ottenendo per l'ovatossina-a un pattern ionico molto simile a quello della palitossina ed interessanti informazioni sulle differenze strutturali tra le due molecole. È noto infatti che palitossina ed ovatossina-a si differenziano per soli due atomi di ossigeno e grazie a questi primi dati di frammentazione è possibile ipotizzare che l'ovatossina-a abbia un atomo di ossigeno in meno rispetto alla palitossina sia nella porzione Fa che nella porzione Fb (Fig. 62). Nella tabella 3 sono riportati gli ioni caratteristici con le formule proposte.

Tabella 3: Ioni caratteristici della Ovatossina-a analizzata in modalità a ioni negativi

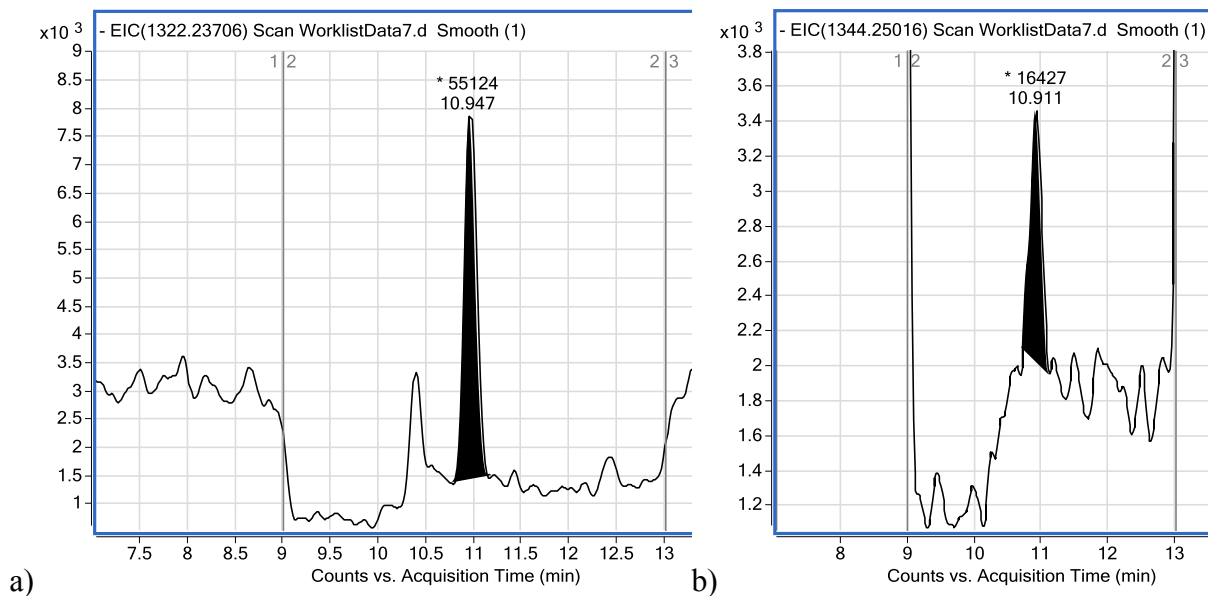
Frammento	Ione	$[M-H]^-$	Formula	$\Delta$ ppm
$[M-H]^-$	2645	2645.4968	$C_{129}H_{222}N_3O_{52}$	5.60
$[M-2H]^{2-}$	1322	1322.2457	$C_{129}H_{221}N_3O_{52}$	-0.89
$[F2b-H]^-$	1434	1434.7635	$C_{70}H_{116}NO_{29}$	0.91
$[F2a-H]^-$	1209	1209.7094	$C_{59}H_{105}N_2O_{23}$	1.59
$[F1b-H]^-$	1508	1508.8002	$C_{73}H_{122}NO_{31}$	0.91
$[F1a-H]^-$	1135	1135.6750	$C_{56}H_{99}N_2O_{21}$	-0.13

Scan (19.677 min) WorklistData7.d Subtract (1)

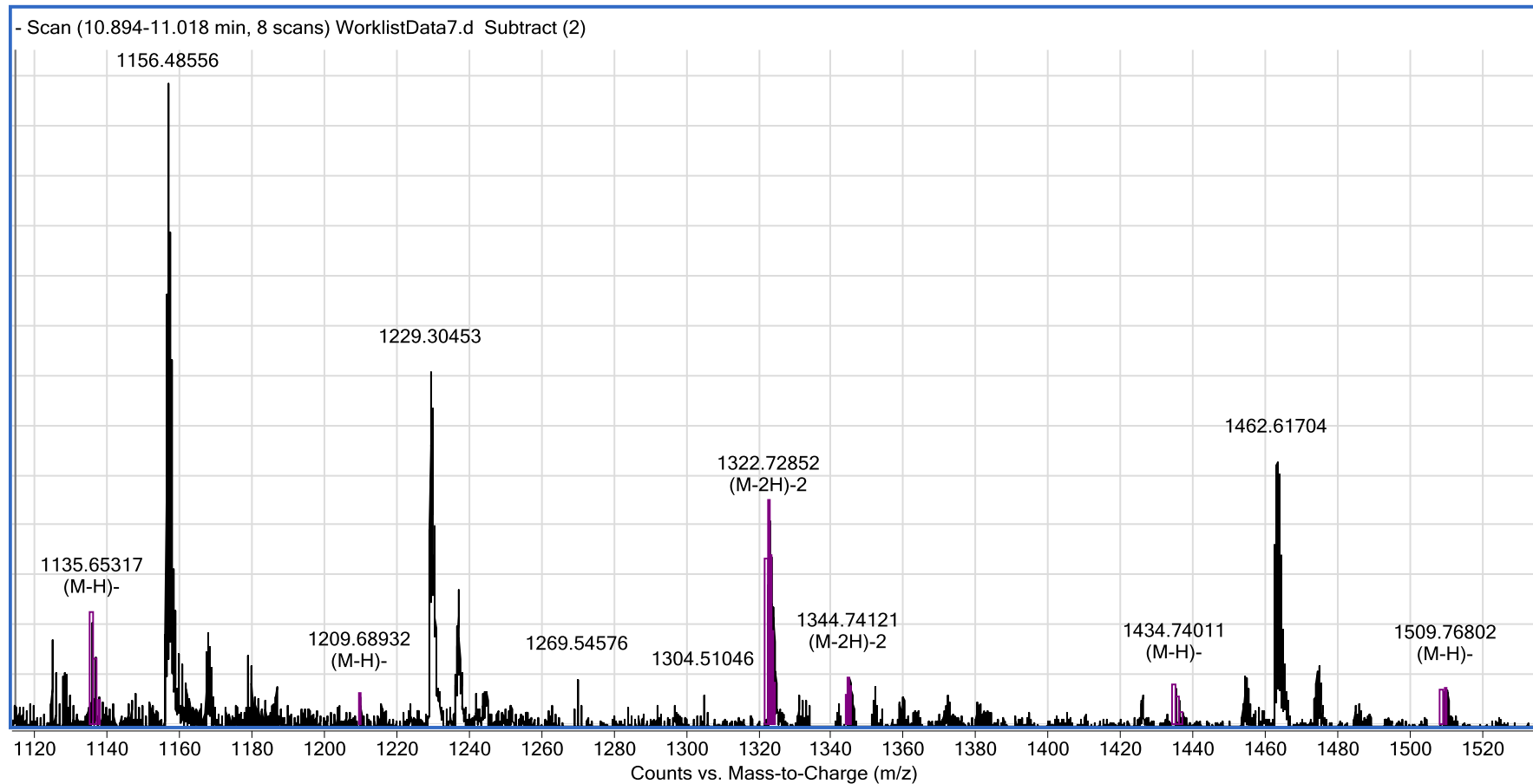


**Figura 62:** Spettro completo della ovatosina-a nel campione di alghe D483 analizzato in modalità a ioni negativi.

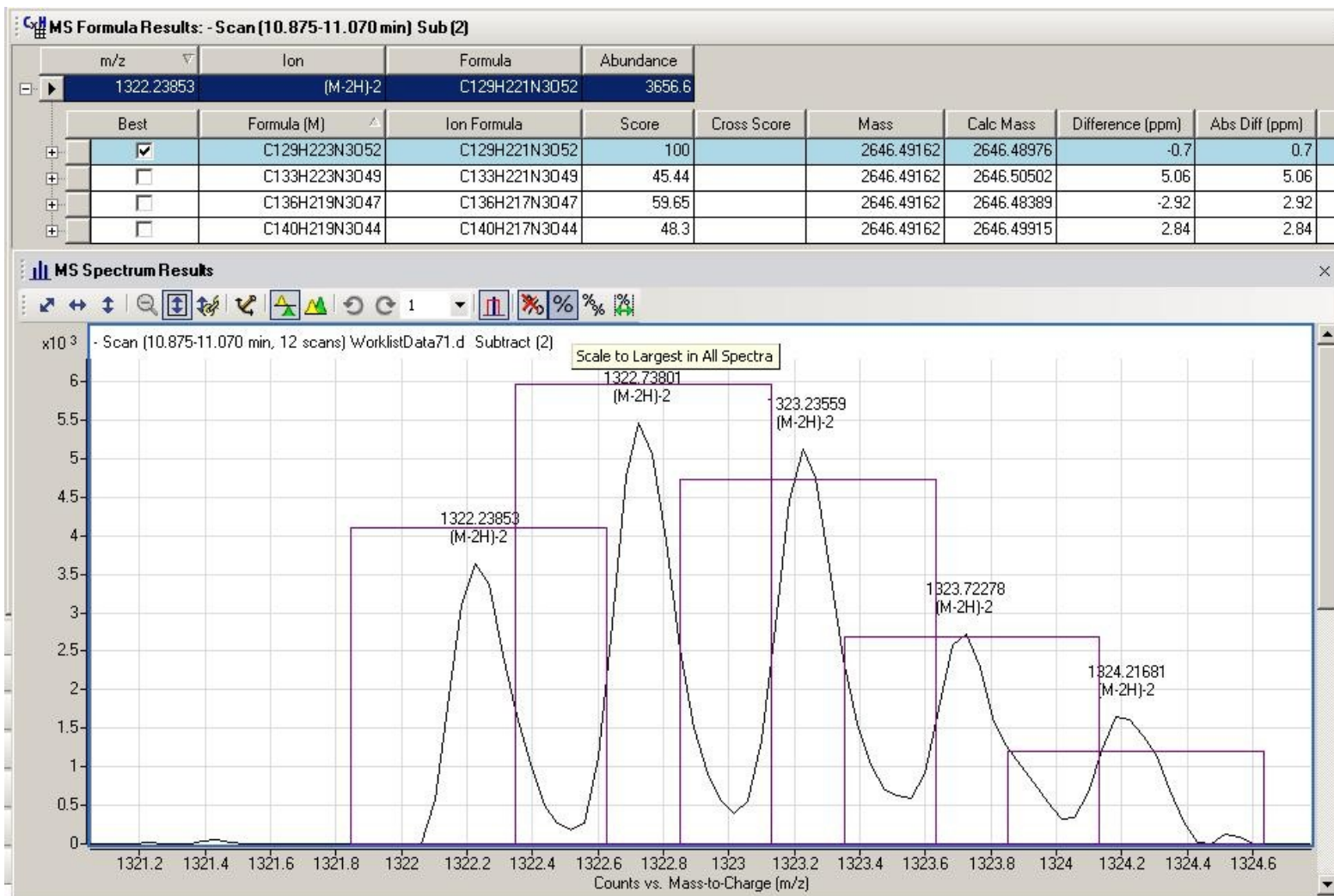
Questa diversa modalità di analisi ci ha permesso di migliorare la sensibilità analitica di circa il 50% permettendoci di determinare la presenza della Ovatossina-a nei campioni di mitili e ricci di mare in concentrazioni inferiori ai 100ppb ed anche delle altre tossine prodotte dall'alga *Ostreopsis ovata* che sino ad oggi non eravamo riusciti a determinare (Fig. 63-65).



**Figura 63:** EIC (Extracted Ion Chromatogram) del campione di mitili prelevato nel sito di Nisida il 18 Luglio 2011 ad  $m/z$  1322.23706 ione  $(M-2H)^{-2}$  della Ovatossina-a (a) e ad  $m/z$  1344.25016  $(M-2H)^{-2}$  della Ovatossina-b (b) alla concentrazione stimata di Ovatossine totali pari a 76ppb.



**Figura 64:** Spettro del campione di mitili prelevato nel sito di Nisida il 18 Luglio 2011 ad  $m/z$  1120-1520 in cui sono visibili gli ioni caratteristici della Ovatossina-b a 1322.23706 (M-2H)<sup>2-</sup>; 1135.65317 Frammento [F1b-H]<sup>1-</sup>; 1209 Frammento [F1a-H]<sup>1-</sup>; 1434 Frammento [F2a-H]<sup>1-</sup>; 1508 Frammento [F2b-H]<sup>1-</sup>, e lo ione ad  $m/z$  1344.25016 (M-2H)<sup>2-</sup> della Ovatossina-b.



**Figura 65:** Distribuzione isotopica dello ione 1322 e determinazione della formula bruta con un errore inferiore ad 1 ppm.



Possiamo considerare questo, in modalità a ioni negativi, l'approccio senz'altro più sensibile per la determinazione delle palytossine nei campioni di mitili e ricci di mare.

## Riferimenti

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Grillo, C., Melchiorre, N., 2008. "Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak." *J. Am. Soc. Mass Spectr.* **19**, 111–120.

Decreto Ministeriale 16/05/2002, "Tenori massimi e metodiche di analisi delle biotossine algali nei molluschi bivalvi vivi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini." *Gazzetta Ufficiale*, **165** del 16 Luglio 2002

Merck Index: Encyclopedia of Chemicals, Drugs & Biologicals

Lenoir, S., Ten-Hage, L., Quod, J.P., Bernard, C., Hennion, M.C., 2004. "First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dinophyceae) benthic bloom in southwestern Indian Ocean." *J. Phycol.* **40**, 1042–1051.

Uemura, D., Hirata, Y., Iwashita, T., Naoki, H., 1985. "Studies on palytoxin." *Tetrahedron* **41**: 1007-1017.

## Conclusioni

Gli obiettivi che questo lavoro di tesi ha raggiunto sono i seguenti:

- Sono state sviluppate metodiche in spettrometria di massa per la rivelazione della Palitossina utilizzando uno spettrometro di massa con rivelatore a tempo di volo (LC/MS-TOF)
- Tali metodiche sono state utilizzate per la rivelazione della Ovatossina-a in prodotti ittici (molluschi lamellibranchi ed echinodermi).
- È stato identificato un nuovo approccio sperimentale in LC-MS/TOF in modalità a ioni negativi che ci ha permesso di migliorare notevolmente la sensibilità strumentale ed ha fornito ulteriori informazioni strutturali sulla molecola della palitossina, come delle altre molecole palytoxin-like.
- Sono state scoperte, nel corso di questa ricerca, nuove molecole nelle colture algali di *Ostreopsis ovata*, dimostrando che il sistema LC-MS/TOF è molto utile per lo studio di molecole non-note (gli unknown).
- È stata confermata la possibilità di un rischio sanitario da presenza di tossine nei tipici “frutti di mare” che crescono spontanei nei tratti di costa rocciosa della Campania e possono essere tipicamente raccolti dai bagnanti nel periodo estivo.



International Conference  
on Harmful Algae

### NEW PALYTOXIN-LIKE MOLECULES IN MEDITERRANEAN *OSTREOPSIS OVATA* (DINOFLAGELLATES) BY LC/TOF/MS

Rachele Rossi<sup>1</sup>, Olga Arace<sup>1</sup>, Teresa Bruno<sup>1</sup>, Daniela Capozzo<sup>1</sup>, Vincenzo Castellano<sup>1</sup>, Eleonora Scalco<sup>2</sup>, Luigi Serpe<sup>1</sup>,  
Adriana Zingone<sup>2</sup>, Vittorio Soprano<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Via Salute 2, 80055 Portici, Italy. E-mail: rachele.rossi@izsmportici.it

<sup>2</sup> Stazione Zoologica Anton Dornh, via Villa Comunale, 80121, Naples, Italy

*Ostreopsis ovata* is a benthic dinoflagellate that colonises macroalgae and seagrasses or attaches directly to the substrate. In recent years, massive blooms of this species have become a threat along the Mediterranean coasts, where the toxins produced by the species (ovatoxin-a and putative-palytoxin) can affect human health through aerosol, render seafood toxic and affect benthic resources. A rapid, high resolution liquid chromatography coupled with ElectroSpray Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (LC/TOF/MS) method was developed for the determination of the toxin pattern in cultured cells of *O. ovata* from the Mediterranean Sea. The samples were separated on a Phenomenex Luna 3 $\mu$  HILIC 200A (150 x 2.00 mm) and analysed by LC/TOF/MS with electrospray ionization (ESI) interface in positive ion mode. The method was successfully applied for the determination of four new palytoxins (ovatoxin-b; ovatoxin-c, ovatoxin-d and mascarenotoxin-C) and mascarenotoxin-A in *O. ovata*. These new molecules pose questions as to their actual contribution to the toxicity of this species, highlighting a possible underestimation of toxicity in analyses on marine organisms contaminated by *O. ovata* that have been conducted so far. Indeed, the total concentration of the new analogues in the analyzed samples is comparable to that of ovatoxin-a, which doubles the amount of palytoxin-like substances in *O. ovata*. Therefore, the analysis of shellfish contaminated by *O. ovata* toxins should take into account the presence of ovatoxin-b, ovatoxin-c, ovatoxin-d and mascarenotoxin-A and mascarenotoxin-C in addition to the previously known toxins.

# Novel Sensor

## New palytoxin-like molecules in Mediterranean *Ostreopsis ovata* (Dinoflagellates) cultured cells by LC/TOF/MS.

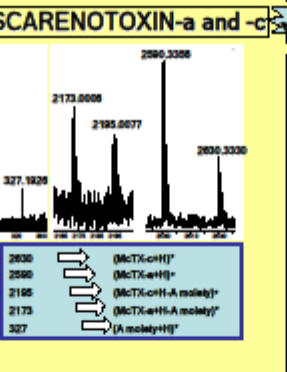
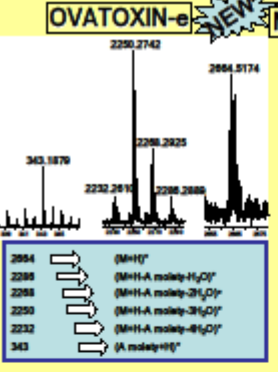
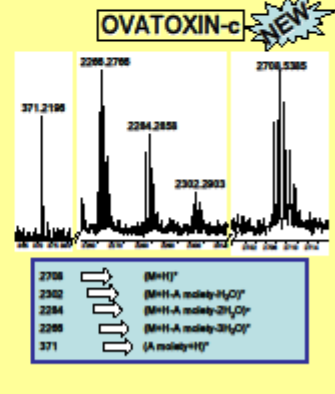
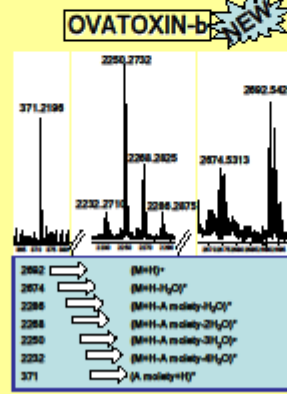
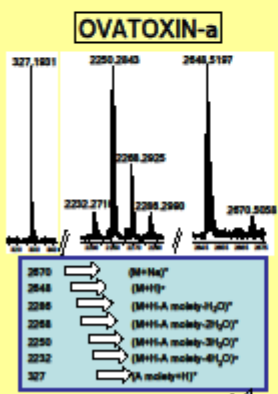
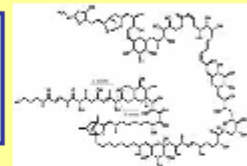
**Michela ROSSI<sup>1</sup>, Olga ARACE<sup>2</sup>, Teresa BRUNO<sup>2</sup>, Daniela CAPOZZO<sup>2</sup>, Vincenzo CASTELLANO<sup>2</sup>, Eleonora SCALCO<sup>2</sup>, Luigi BERPE<sup>2</sup>, Adriana ZINGONE<sup>2</sup>, Vittorio SOPRANO<sup>2</sup>**  
<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Via Salaria 2 - 80055 Portici (NA) (Italy) [michela.rossi@izsmportici.it](mailto:michela.rossi@izsmportici.it) phone +39 0817805214 fax +39 0817805238  
<sup>2</sup> Stazione Zoologica Anton Dohrn Napoli, Via Villa Comunale - 80121 Napoli (Italy)



**Ostreopsis OVATA**  
*Ostreopsis ovata* and other congenic species are typical components of the "cyanobacteria community". Blooms of these species can have an important impact on the ecosystem with toxic, anoxic and benthic invertebrate kills. In addition, skin irritations, fever, respiratory afflictions and conjunctivitis have caused the hospitalization of several hundred people. These symptoms have been explained with the presence of a palytoxin-like substance produced by *O. ovata* in both the water and aerosol.



**PALYTOXINS**  
 Toxins have been isolated from several coccidiales of the *Polydora* species and of the *Ostreopsis* species. The molecular formula of palytoxin is  $C_{127}H_{202}N_{16}O_{74}$ , molecular weight (MW) of 2576.



**KNOWN PALYTOXINS:**

Compound	Source organism	MW	Reference
Palytoxin	<i>Polydora adunculus</i>	2576	Moore et al., 1971
Homo-Palytoxin	<i>Polydora adunculus</i>	2692	Uemura et al., 1985
Bihomo-Palytoxin	<i>Polydora adunculus</i>	2708	Uemura et al., 1985
neo-Palytoxin	<i>Polydora adunculus</i>	2681	Uemura et al., 1985
deoxy-Palytoxin	<i>Polydora adunculus</i>	2682	Uemura et al., 1985
CA-I	<i>Chondria armata</i>	Unknown	Yasumoto and Murata, 1990
CA-II	<i>Chondria armata</i>	Unknown	Yasumoto and Murata, 1990
Mascarenotoxin-a	<i>Ostreopsis mascarenensis</i>	2590	Lencir et al., 2004
Mascarenotoxin-a	<i>Ostreopsis ovata</i>	2588	Rossi et al., 2010
Mascarenotoxin-b	<i>Ostreopsis mascarenensis</i>	2590	Lencir et al., 2004
Mascarenotoxin-c	<i>Ostreopsis ovata</i>	2628	Rossi et al., 2010
Ovatoxin-D	<i>Ostreopsis almerensis</i>	2634	Ullana et al., 2001
Ovatoxin-a	<i>Ostreopsis ovata</i>	2648	Cimbrillo et al., 2009
42-Hydroxy-palytoxin	<i>Polydora adunculus</i>	2684	Cimbrillo et al., 2009
Palytoxin-b	<i>Polydora adunculus</i>	2720	Rossi et al., 2010
Ovatoxin-b	<i>Ostreopsis ovata</i>	2690	Cimbrillo et al., 2010
Ovatoxin-c	<i>Ostreopsis ovata</i>	2706	Cimbrillo et al., 2010
Ovatoxin-d	<i>Ostreopsis ovata</i>	2692	Cimbrillo et al., 2010
Ovatoxin-e	<i>Ostreopsis ovata</i>	2692	Cimbrillo et al., 2010

**CULTURED D483**  
 The strain D483 of *Ostreopsis ovata* was obtained in the Gulf of Naples (40°47' 32"N, 14°11' 18"E) in September 2008. Strain D483 was identified in light and electron microscopy and its identity was confirmed with molecular analysis (A. Pavia, University of Udine, pers. comm.). Cultures were kept at 18°C with a photoperiod of 12:12 dark:light conditions and an irradiance of 50  $\mu$ mol photons  $m^{-2} s^{-1}$ .

**PALYTOXIN EXTRACTION**  
 Cells were lysed by sonication for 15 min, after which 1 ml of MeOH/W (1:1) was added to the pellet and vortexed for 3 min. Cells were centrifuged at 4000 rpm for 5 min. The clear supernatant was transferred into a glass test tube without disturbing the pellet. All the steps above were repeated 3 times. Then the supernatant was evaporated and the residue was resuspended with 500  $\mu$ l of MeOH/W (1:1).

**NOMENCLATURE**  
 The new ovatoxins OvTX-b, OvTX-c, and OvTX-d reported in Rossi et al., 2010 have been renamed here to OvTX-a, OvTX-b, and OvTX-c, to match the nomenclature proposed by Cimbrillo et al., 2010.

**LC-MS/TOF EXPERIMENTAL CONDITIONS**  
 Column: PHENOMENEX LUNA 3 $\mu$  HILIC (150x2mm)  
 Solvent A = 0.1% NH<sub>4</sub>OH in Water  
 Solvent B = 0.1% NH<sub>4</sub>OH in ACN/Water (95:5)  
 Elution: t = 0 min, 20% A; t = 8 min, 20% A; t = 8.5 min, 0% A; t = 8.5 min, 0% A; t = 9 min, 20% A; t = 15 min, 20% A  
 Flow: 0.3 ml/min  
 Injection volume: 5  $\mu$ l

**CONCLUSIONS**  
 The method developed allowed the identification of five novel palytoxin-like molecules from the Mediterranean *Ostreopsis ovata*.  
 The total concentration of the new analogues in the analyzed samples is comparable to that of ovatoxins, which doubles the amount of palytoxin-like substances in *Ostreopsis ovata*.  
 The analysis of shells contaminated by *Ostreopsis ovata* toxins should take into account the presence of ovatoxin-b, ovatoxin-c, ovatoxin-d, ovatoxin-a, mascarenotoxin-a and mascarenotoxin-c in addition to the previously known toxins.

**REFERENCES**  
 Adams, R.E., Adams, P.J., 1971. Palytoxin of sea anemone relatives. *Chemotaxonomy*, **1**(2): 491-506.  
 Adams, R., Adams, P., Jostein, T., Sand, H., 1984. Studies on palytoxin. *Tetrahedron*, **41**, 1067-1110.  
 Yasumoto, T., Uemura, M., 1986. Palytoxin and related compounds. In: *Marine Biotoxins*, 2nd ed., Springer, 4-26.  
 Lencir, B., Tscharner, L., Toppo, A., Giani, J.F., Bermet, G., Bermet, H.G., 2004. The isolation of Palytoxin analogues from an *Ostreopsis* macroalga (Dinophyceae) from the Mediterranean Sea. *J. Phycol.*, **40**, 382-384.  
 Adams, T., Adams, R., Jostein, T., Sand, H., Giani, J.F., Tscharner, L., Tscharner, L., 2001. Systematic classification of palytoxin analogues isolated from the dinoflagellate *Ostreopsis almerensis*. *Marine Biotechnology*, **13**, 263-268.  
 Cimbrillo, P., Infantes-Llanusa, C., Infantes-Llanusa, C., Pavesio, F., Pavesio, F., Tscharner, L., Tscharner, L., 2009. Identification of palytoxin polyketide in Mediterranean *Ostreopsis ovata* and *Ostreopsis almerensis* (Dinophyceae) and its role in the toxicity of the genus. *Marine Biotechnology*, **11**, 149-158.  
 Cimbrillo, P., Infantes-Llanusa, C., Infantes-Llanusa, C., Pavesio, F., Pavesio, F., Tscharner, L., Tscharner, L., 2010. Complete palytoxin profile of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) from the Mediterranean Sea. *Marine Biotechnology*, **12**, 119-126.  
 Rossi, M., Castellano, V., Arace, O., Bruno, T., Soprano, V., 2010. New palytoxin-like molecules in Mediterranean *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) and its role in the toxicity of the genus. *Marine Biotechnology*, **12**, 119-126.

## ***Ostreopsis ovata* along the Campania coasts. Results from a 4-year-long regional monitoring programme**

Fattorusso E.<sup>1</sup>, Ciminiello P.<sup>1</sup>, Dell'Aversano C.<sup>1</sup>, Dello Iacovo E.<sup>1</sup>, Forino M.<sup>1</sup>, Grauso L.<sup>1</sup>, Tartaglione L.<sup>1</sup>, Zingone A.<sup>2</sup>, Urciuolo G.<sup>2</sup>, Di Cioccio D.<sup>2</sup>, Saggiomo V.<sup>2</sup>, Buia M.C.<sup>2</sup>, Ammendola A.<sup>2</sup>, Soprano V.<sup>3</sup>, Rossi R.<sup>3</sup>, Capozzo D.<sup>3</sup>, Bruno T.<sup>3</sup>, Castellano V.<sup>3</sup>, Arace O.<sup>3</sup>, Serpe L.<sup>3</sup>, De Maio L.<sup>4</sup>, Capone S.<sup>4</sup>, Pignalosa C.<sup>4</sup>, Gramegna C.<sup>4</sup>, Cocozziello B.<sup>5</sup>, Lubrano Lavadera S.<sup>5</sup>, De Filippo S.<sup>5</sup>, Montanino A.<sup>5</sup>, Ventimiglia S.C.<sup>5</sup>, Cella A.<sup>5</sup>

1-Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via D. Montesano 49, 80131 Napoli, Italy. E-mail: [fattoru@unina.it](mailto:fattoru@unina.it)

2-Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli, Italy

3-Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Via della Salute 2, 80055 Portici(NA), Italy

4- ARPAC - U.O. Tutela Ambiente Marino e Oceanografia, Direzione tecnica, via vicinale s. Maria del Pianto, Napoli, Italy

5- ARPAC - Laboratorio specializzato "Progetto Mare" - Dipartimento di Napoli, Via Don Bosco 4/F, Napoli, Italy.

We present the preliminary results of monitoring program of *Ostreopsis ovata* and its toxins along the Campania coasts, committed and funded by the Regione Campania following the guidelines of the Italian Ministry of Health. This program has been carried out from 2007 to date.

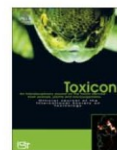
The main aims of the project were i) to develop a surveillance programme to monitor the environmental conditions that favor microalga proliferation at levels able to harm bathers and/or seafood consumers health; ii) to study *O. ovata* bloom dynamics over a space and time scale; iii) to determine both qualitatively and quantitatively toxins produced by *O. ovata* and iv) to ascertain whether they contaminated seafood products.

A number of sites (32) in the Bay of Napoli, Salerno and Policastro as well as along Ischia, Capri and Procida coasts were sampled each year from June to late October. *O. ovata* cells density was assessed both in seawater and on seaweeds. Wild marine organisms (mussels, sea-urchins, etc.) were collected from sites where *O. ovata* was most abundant; they were tested by mouse bioassay and subsequently analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry for the presence of palytoxin-like compounds. Geo- and hydro-morphological data as well as biological, physical and chemical parameters of the sampling sites were recorded and related to the algal bloom development. The results of this study show that *O. ovata* is widespread along the rocky shores of the whole Campania coasts. Cell abundances were often higher than  $10^6$  cells  $g^{-1}$  FW of macroalga and of  $10^4$  cells  $L^{-1}$  in sea-water and peaks occurred in July and September. Total palytoxins in seafood often exceeded the levels indicated as harmful for human health (up to 625  $\mu g/kg$ ), and their values were relatively high also several weeks after *O. ovata* peaks.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxicon](http://www.elsevier.com/locate/toxicon)

## New palytoxin-like molecules in Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* (dinoflagellates) and in *Palythoa tuberculosa* detected by liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry

Rachele Rossi<sup>a</sup>, Vincenzo Castellano<sup>a</sup>, Eleonora Scalco<sup>b</sup>, Luigi Serpe<sup>a</sup>, Adriana Zingone<sup>b</sup>, Vittorio Soprano<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Via Salute 2, 80055 Portici, Italy

<sup>b</sup>Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli, Italy

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 May 2010

Received in revised form 3 August 2010

Accepted 4 August 2010

Available online 24 August 2010

#### Keywords:

Palytoxin

Ovatoin

Mascarenotoxin

LC/TOF/MS

*Ostreopsis cf. ovata*

### ABSTRACT

A rapid, high resolution liquid chromatography coupled with ElectroSpray Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (ESI/TOF/MS) method was developed for the determination of the toxin pattern in cultured cells of *Ostreopsis cf. ovata* from the Mediterranean Sea. The samples were separated on a Phenomenex Luna 3 $\mu$  HILIC 200A (150  $\times$  2.00 mm) and analyzed by LC/TOF/MS with electrospray ionization (ESI) interface in positive ion mode. The method developed here provides the capability for a fully automated analysis, which requires relatively easy sample preparation and gives clean and simple chromatograms. The method was successfully applied to the determination of ovatoxin-a, mascarenotoxin-a and four new palytoxins in *O. cf. ovata*. Another new palytoxin was detected in the standard material from *Palythoa tuberculosa* provided by Wako Chemicals.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Ostreopsis ovata* is a dinoflagellate that colonises macroalgae, seagrasses and benthic animals or grows directly on the substrate. In recent years, massive blooms of this species have become a threat along the Mediterranean coasts, where the toxins produced by the species can affect human health through aerosol (Mangalajo et al., 2008), render seafood toxic (Aligizaki et al., 2008) and affect benthic animals (Sansoni et al., 2003; Simoni et al., 2003). The Atlantic/Mediterranean populations of *O. ovata* actually differ from the Indo-Pacific populations in both molecular

and morphological characteristics (Penna et al., 2005, 2010), but no formal change has been proposed as to the taxonomic status of the species as yet. For this reason, the use of the name *Ostreopsis cf. ovata* is preferable at this stage.

Species of the genus *Ostreopsis* are known to produce toxic substances including palytoxin (PITX), one of the most potent non-protein marine toxins (Fig. 1), which was firstly isolated from the marine zoanthids *Palythoa* spp. (Moore and Scheuer, 1971). Recently, a putative PITX and a new PITX-like compound named ovatoxin-a (OvTX-a) have been identified in *Ostreopsis cf. ovata* from the Mediterranean Sea (Ciminiello et al., 2008). Numerous other PITX-like substances have been described from various marine organisms (Deeds and Schwartz, 2010; Panagiota, 2007).

These toxins can enter the food web through feeding interactions and accumulate in higher trophic levels. Based on the limited toxicological database of the PITX-group

\* Corresponding author. Tel.: +39 0817865 214; fax: +39 0817865 239.

E-mail addresses: [rachele.rossi@izsmportici.it](mailto:rachele.rossi@izsmportici.it) (R. Rossi), [vincenzo.castellano@cert.izsmportici.it](mailto:vincenzo.castellano@cert.izsmportici.it) (V. Castellano), [eleonora.scalco@szn.it](mailto:eleonora.scalco@szn.it) (E. Scalco), [luigi.serpe@cert.izsmportici.it](mailto:luigi.serpe@cert.izsmportici.it) (L. Serpe), [zingone@szn.it](mailto:zingone@szn.it) (A. Zingone), [v.soprano@izsmportici.it](mailto:v.soprano@izsmportici.it) (V. Soprano).

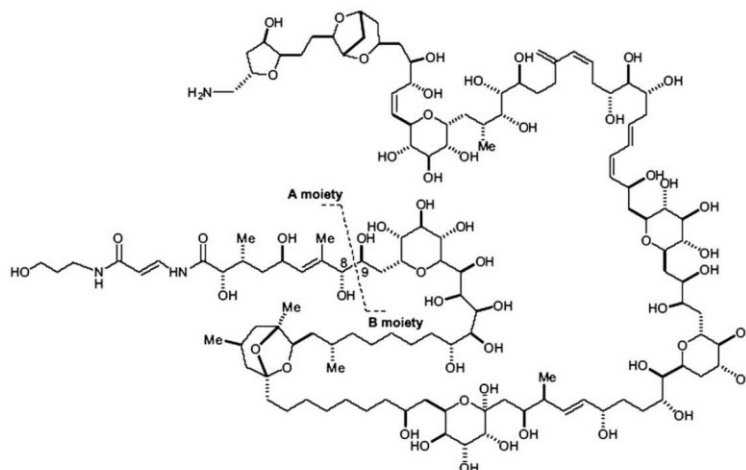


Fig. 1. Palytoxin structure.

toxins, a regulatory level of 30  $\mu\text{g}$  of the sum of palytoxins and ostreocin-D per kg of body tissues has been proposed for the harvesting and consumption of shellfish resources by EFSA (European Food Safety Authority, 2009).

High performance liquid chromatography (HPLC) with precolumn derivatization and fluorescence detection (Riobó et al., 2006) or coupled with mass spectrometry (LC-MS) (Ciminiello et al., 2006) are among the methods used for the determination of PITX in cells and shellfish tissues. In this study, we set up and tested a new method in LC/TOF/MS for the determination of the PITXs in *O. cf. ovata* cultures. The method proved to be sensitive and provided a high resolution allowing for the detection of five new palytoxin-like compounds.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Isolation and cultivation methods

The strain D483 of *O. cf. ovata* was obtained from a sample collected at the station Gaiola in the Gulf of Naples ( $40^{\circ}47'33''\text{N}$ ,  $14^{\circ}11'18''\text{E}$ ) in September 2008. Macroalgae of the species *Asparagopsis taxiformis* (Rhodophyta) were sampled by scuba diving. In the laboratory, the macroalgae were shaken in a plastic jar with seawater from the same site and the liquid sample containing free microalgal cells was collected. Cultures of *O. cf. ovata* were established from a single cell isolated with a pipette under the light microscope. Cultures were maintained in K/2 medium without the addition of silicates (Keller et al., 1987) at  $18^{\circ}\text{C}$  with a photoperiod of 12:12 dark:light conditions and an irradiance of  $50 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . An aliquot of ca 5 ml of culture was transferred to fresh medium approximately every two weeks.

For morphological identification, cells of strain D483 were observed in light microscopy with a Zeiss microscope Axiovert. Cells were also observed in scanning electron microscopy.

For toxin analysis, three plastic flasks (a, b, and c) containing 1 l of K/2 medium were incubated with  $1000\text{--}2000 \text{ cells ml}^{-1}$  and allowed to grow in the same conditions as above. At different growth phases, the flasks were shaken and aliquots of 10 ml were sampled to estimate cell concentrations. The aliquots were treated with Na-EDTA solution at a final concentration of 0.01 M to dissolve mucous aggregates. 1 ml was placed in a Sedgewick-Rafter Counting Cell Slide and counted in duplicates in the light microscope (ZEISS AXIOPHOT). After 23 days the cultures were centrifuged at 4000 rpm for 10 min and the pellet was stored in a freezer until toxins extraction.

### 2.2. Chemicals

Analytical standard of PITX was purchased from Wako Chemicals GmbH (Neuss, Germany). Acetonitrile, methanol and water were HPLC grade. Formic acid was obtained from Rudi Pont.

### 2.3. Sample extraction

For palytoxin analysis, the pellet was sonicated for 15 min, resuspended in 1 ml of MeOH/W (1:1) and vortexed for 3 min. Cells were lysed by sonication again for 15 min and centrifuged at 4000 rpm for 5 min. The clear supernatant was transferred into a glass test tube without disturbing the pellet. The pellet was resuspended in 1 ml of MeOH/W (1:1) and vortexed for 3 min. All the steps above were repeated 3 times. Then the supernatant was evaporated and the residue was resuspended in 500  $\mu\text{l}$  of

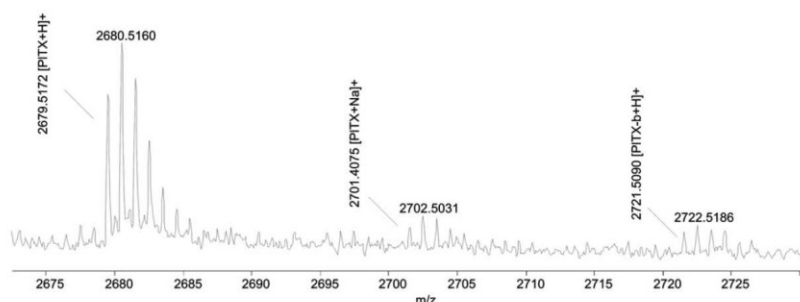


Fig. 2. Mono-charged ion clusters in the HRMS spectrum of palytoxin and the new palytoxin-like compound palytoxin-b.

MeOH/W (1:1). The sample extract was filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  pore diameter membrane (Millipore), centrifuged at 11,000 rpm for 5 min and finally 5  $\mu\text{l}$  were analyzed by LC/TOF/MS.

#### 2.4. Equipment

The LC consisted of an Agilent 1100 instrument equipped with a binary pump and an auto sampler. Phenomenex Luna HILIC 3  $\mu\text{m}$  150  $\times$  2.00 mm was used for chromatographic separation. Elution was accomplished with water (eluent A) and 95% acetonitrile/water (eluent B), both containing 0.1% formic acid. The flow rate was 0.3  $\text{ml min}^{-1}$ .

Gradient conditions were as follows: from the beginning to 2 steady to 10% A; linear rise over 3 min rising to 50% B; from 5 to 10 steady at 50% B; then a linear fall from 50% B to 10% A (initial conditions). Sample solutions (50, 20, 10 ppm) were prepared in MeOH/W (1:1) and 5  $\mu\text{l}$  were injected.

#### 2.5. Conditions for mass spectrometry analysis

The LC/TOF/MS analysis worked in positive mode, with mass range set at  $m/z$  100–3000 u at a resolving power of 10,000. The conditions of ESI source were as follows: drying gas ( $\text{N}_2$ ) flow rate, 11  $\text{ml min}^{-1}$ ; drying gas temperature, 300  $^\circ\text{C}$ ; nebulizer, 45 psig; capillary voltage, 4000 V; fragmentor 250 V; skimmer voltage, 60 V. All the acquisition and analysis of data were controlled by Agilent LC/TOF/MS Software (Agilent, USA–Germany). Tuning mix (G1969-85001) was used for lock mass calibration in our assays.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. *O. cf. ovata* cultures

In light microscopy, typical cells of the strain D483 were drop-shaped, with a dorso-ventral diameter (DV) of

20–64  $\mu\text{m}$ , matching the Mediterranean populations of *O. ovata* in shape and size (Penna et al., 2005; Aligizaki and Nikolaidis, 2006). Two different size classes were identified in the cultured material, having a DV of 40–64  $\mu\text{m}$  and 20–40, respectively. The latter cells were ca 10% of the total cell number. In addition, cells of more rounded and/or irregular shape were formed towards the end of the growth phase (E. Scalco, unpublished data). The identification of strain D483 was confirmed with molecular analyses that showed that it belongs to the Atlantic/Mediterranean populations of this species (A. Penna, University of Urbino, pers. comm.). For the analysis of palytoxins, the cultures were collected during their stationary phase, when cell concentration was 7080, 4268, 3498  $\text{cells ml}^{-1}$  in the flasks a, b and c, respectively.

#### 3.2. Palytoxins in the reference material

The Wako reference standard used herein contained a mixture of PITX and a palytoxin-like molecule never reported so far, that we named palytoxin-b (PITX-b). The limit of quantitation (LOQ) of the reference material was 0.06  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for PITX. The mono-charged ions at  $m/z$  2679.5172 for PITX and at  $m/z$  2721.5090 for PITX-b (Fig. 2) were used for the assignment of chemical formulas, allowing the inference of a molecular formula  $\text{C}_{131}\text{H}_{225}\text{N}_3\text{O}_{55}$  for the PITX-b (Table 1).

The cleavage between carbons eight and nine usually observed in palytoxins produced the loss of the A moiety (Fig. 1), which was recovered as a single fragment ion  $[\text{M} + \text{H}]^+$   $m/z$  327.1888 corresponding to a  $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_5$  part formula, in both PITX and PITX-b (Supporting Information 1s). The comparison between the clusters of mono-charged ions at  $m/z$  2281.2837  $[\text{M} + \text{H} - 362 - 2\text{H}_2\text{O}]^+$ ,  $m/z$  2299.2938  $[\text{M} + \text{H} - 362 - \text{H}_2\text{O}]^+$  and  $m/z$  2317.2916  $[\text{M} + \text{H} - 362]^+$  for PITX and at  $m/z$  2323.2980  $[\text{M} + \text{H} - 362 - 2\text{H}_2\text{O}]^+$ ,  $m/z$  2341.3044  $[\text{M} + \text{H} - 362 - \text{H}_2\text{O}]^+$  and  $m/z$  2359.3193

Table 1  
Molecular weight, supposed chemical formula and abundance of the toxins identified in the palytoxin reference material.

Compound	Calculated MW $[\text{M} + \text{H}]^+$	Effective MW $[\text{M} + \text{H}]^+$	Chemical formula	Percentage (%)
Palytoxin	2679.4874	2679.5172	$\text{C}_{129}\text{H}_{223}\text{N}_3\text{O}_{54}$	95.8
Palytoxin-b	2721.4979	2721.5090	$\text{C}_{131}\text{H}_{225}\text{N}_3\text{O}_{55}$	4.2



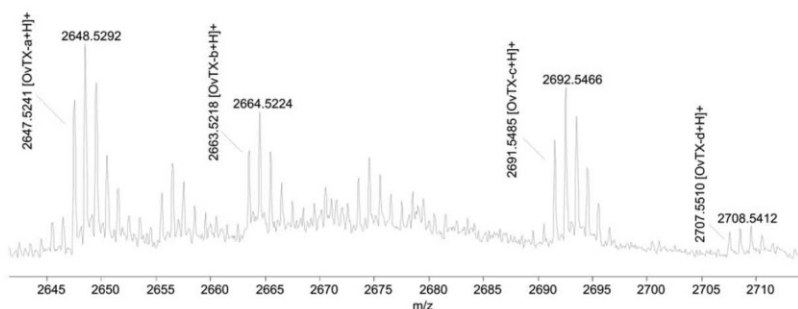


Fig. 3. Mono-charged ion clusters in the HRMS spectrum of ovatoxin-a and the three new palytoxin-like compounds, ovatoxin-b, ovatoxin-c and ovatoxin-d.

$[M + H - 362]^+$  for P1TX-b, suggests that the two molecules differ in the B moiety of the molecule.

### 3.3. Toxin pattern in *O. cf. ovata* cultured cells

The three cultures of the strain D483 showed all the presence of a compound that perfectly matched the molecule OvTX-a described by Ciminiello et al. (2008) in MW and formula. The mono-charged ion cluster in the HRMS spectrum of OvTX-a presented a mono-isotopic ion peak  $[M + H]^+$  at  $m/z$  2647.5241, which allowed to confirm the formula  $C_{129}H_{223}N_3O_{52}$  for this molecule (Fig. 3).

In addition to OvTX-a, the presence of a putative P1TX compound having the same MW and formula as the standard material was reported in samples collected along the Genoa coast during a toxic outbreak caused by *O. cf. ovata* in 2005 (Ciminiello et al., 2008), and in cultures of the same species from the Adriatic and Tyrrhenian Sea (Guerrini et al., 2010). We did not detect any signals corresponding to P1TX in our samples, but a closer comparison was not possible due to the lack of the MS spectrum for the putative P1TX compound in the above mentioned studies (Ciminiello et al., 2008; Guerrini et al., 2010). By contrast, in all samples we detected the presence of a palytoxin-like molecules corresponding to mascarenotoxin-a (McTX-a). This compound was described along with mascarenotoxin-b (McTX-b) from a natural sample collected near Rodriguez Island, Mauritius, 2000 km east of Madagascar coasts, during an almost monospecific bloom of *Ostreopsis mascarenensis* (Lenoir et al., 2004). *O. mascarenensis* is the largest species of the genus (155–178  $\mu$ m DV and 112–134 W), and has been found only in the South western Indian Oceans and in the Caribbean area so far (Faust et al., 1996).

In addition to these two already known toxins, our analyses on strain D483 of *O. cf. ovata* revealed the presence of four new molecules that we named ovatoxin-b (OvTX-b), ovatoxin-c (OvTX-c) and ovatoxin-d (OvTX-d), ordered along increasing molecular weight, and mascarenotoxin-c (McTX-c). To establish the exact mass of these new analogues of OvTX-a and McTX-a and to assign them a molecular formula, experiments were run to optimize mass spectrometry conditions maximising mono-charged ion intensity. The mono-charged ion cluster  $[M + H]^+$  at  $m/z$  2663.5255 for OvTX-b,  $[M + H]^+$  at  $m/z$  2691.5472 for OvTX-c and  $[M + H]^+$  at  $m/z$  2707.5634 for OvTX-d (Fig. 3) indicate that OvTX-b presents one oxygen atom more than OvTX-a ( $C_{129}H_{223}N_3O_{53}$ ), OvTX-c presents two oxygen and one carbon atoms more than OvTX-a ( $C_{130}H_{223}N_3O_{54}$ ) and OvTX-d presents three oxygen and one carbon atoms more than OvTX-a ( $C_{130}H_{223}N_3O_{55}$ ) (Table 2).

The mono-charged ion cluster in the HRMS spectrum of McTX-a and McTX-c presented a mono-isotopic ion peak  $[M + H]^+$  at  $m/z$  2589.3441 for McTX-a and  $[M + H]^+$  at  $m/z$  2629.2854 for McTX-c (Fig. 4). McTX-a presents two oxygen, two hydrogen and two carbon atoms less than OvTX-a ( $C_{127}H_{221}N_3O_{50}$ ) and McTX-c presents one oxygen and two carbon atoms more than McTX-a ( $C_{129}H_{221}N_3O_{51}$ ) (Table 2). The first characterization of mascarenotoxins (Lenoir et al., 2004), performed using a nano-ESI-Q-TOF, revealed an MS profile dominated by two major peaks, corresponding to the bi- and tri-charged ions at  $m/z$  1295.5 and  $m/z$  836.9 for McTX-a and  $m/z$  1304.3 and  $m/z$  836.2 for McTX-b. Lenoir et al. (2004) indicated an approximate mass of 2500–2535 Da for the two molecules. In fact the MS profile shown in that paper indicates that the pseudo-molecular ion  $[M + H]^+$  of McTX-a has an MW of 2589,

Table 2

Molecular weight, supposed chemical formulas and abundance of the toxins identified in *O. ovata* strain D483.

Compound	Calculated MW $[M + H]^+$	Effective MW $[M + H]^+$	Chemical formula	Percentage (%)	Concentration (pg/cell)
Ovatoxin-a	2647.4975	2647.5241	$C_{129}H_{223}N_3O_{52}$	48.4–62.8	3.67–9.41
Ovatoxin-b	2663.4925	2663.5255	$C_{129}H_{223}N_3O_{53}$	14.6–25.9	1.69–3.43
Ovatoxin-c	2691.4874	2691.5472	$C_{130}H_{223}N_3O_{54}$	19.5–25.0	2.51–4.12
Ovatoxin-d	2707.4823	2707.5634	$C_{130}H_{223}N_3O_{55}$	0.8–5.7	0.08–0.74
Mascarenotoxin-a	2589.4921	2589.3441	$C_{127}H_{221}N_3O_{50}$	0.4–2.0	ND–0.47
Mascarenotoxin-c	2629.4870	2629.2854	$C_{129}H_{221}N_3O_{51}$	ND–0.5	ND–0.32

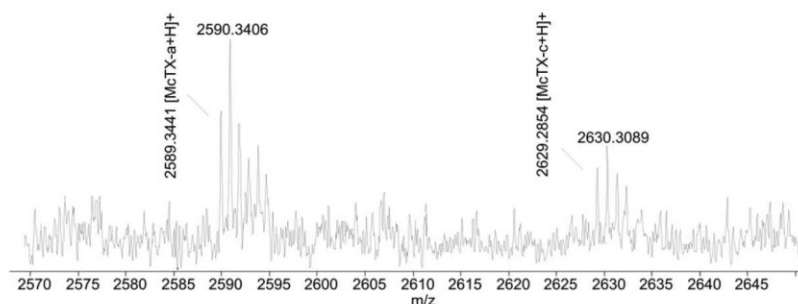


Fig. 4. Mono-charged ion clusters in the HRMS spectrum of mascarenotoxin-a and mascarenotoxin-c.

which matches the mono-charged ion of the molecule found in our *O. cf. ovata* cultures ( $m/z$  2589.3441). By contrast, the other mascarenotoxin detected in *O. cf. ovata* does not match McTX-b, whose MW calculated based on the MS peak is 2606.

The concentration of the different toxins in *O. cf. ovata* cells was estimated by direct comparison with the palytoxin standard, based on the high similarity among the different palytoxin molecules. This method is commonly used for the quantification of new palytoxins in lack of a standard (Lenoir et al., 2004; Riobó et al., 2006; Ciminiello et al., 2008, 2009). The amount of each PITX analogue varied considerably in the three different cultures, probably due to differences in their physiological status at the moment of the analysis (Table 2). However, OvTX-a was always the most abundant, followed by OvTX-b and -c with comparable abundance and OvTX-d, McTX-a and McTX-c in much lower quantity.

The specific fragment  $m/z$  327 (A moiety, Fig. 1), produced by the cleavage between carbons eight and nine in almost all the known palytoxins, has been considered as

a clear diagnostic signal for PITX and its analogues, which generally differ among them in the B moiety (Uemura et al., 1985; Lenoir et al., 2004; Riobó et al., 2006; Ciminiello et al., 2008, 2009). In our case, only one cluster of mono-charged ions, at  $m/z$  2249.3002 [ $M + H - 362 - 2H_2O$ ] $^+$ ,  $m/z$  2267.3071 [ $M + H - 362 - H_2O$ ] $^+$  and  $m/z$  2285.3097 [ $M + H - 362$ ] $^+$ , deriving from the loss of the A moiety, was found in the MS spectrum (Supporting Information 2s). Differences among the ovatoxin molecules were rather found in their A moiety: four distinct fragment ions [ $M + H$ ] $^+$  were retrieved at  $m/z$  327.1958 (corresponding to the formula  $C_{16}H_{27}N_2O_5$  for OvTX-a),  $m/z$  343.1840 (corresponding to the formula  $C_{16}H_{27}N_2O_6$  for OvTX-b),  $m/z$  371.2202 (corresponding to the formula  $C_{17}H_{27}N_2O_7$  for OvTX-c) and  $m/z$  377.2040 (corresponding to the formula  $C_{16}H_{29}N_2O_8$  for OvTX-d). This result clearly shows that all four ovatoxins share the same structure for the part B (Supporting Information 2s) and that the absence of a fragment  $m/z$  327 does not necessarily exclude the presence of a palytoxin-like compound. Indeed, structural differences in the A moiety were already known for toxins

Table 3

Summary of the known molecules in the palytoxin family, their source organisms, molecular weight (MW) and chemical formula (ND: not determined).

Compounds	Source organism	MW	Formula	References
Palytoxin	<i>Palythoa tuberculosa</i>	2678	$C_{128}H_{223}N_3O_{54}$	Moore and Scheuer, 1971
Homo-Palytoxin	<i>Palythoa tuberculosa</i>	2692	$C_{130}H_{225}N_3O_{54}$	Uemura et al., 1985
Bishomo-Palytoxin	<i>Palythoa tuberculosa</i>	2706	$C_{131}H_{227}N_3O_{54}$	Uemura et al., 1985
Neo-Palytoxin	<i>Palythoa tuberculosa</i>	2661	$C_{128}H_{222}N_3O_{53}$	Uemura et al., 1985
Deoxy-Palytoxin	<i>Palythoa tuberculosa</i>	2662	$C_{128}H_{223}N_3O_{53}$	Uemura et al., 1985
CA-I	<i>Chondria armata</i>	ND	ND	Yasumoto and Murata, 1990
CA-II	<i>Chondria armata</i>	ND	ND	Yasumoto and Murata, 1990
<i>L. pictor</i> toxin	<i>Lophozozymus pictor</i>	ND	ND	Lau et al., 1995
Mascarenotoxin-a	<i>Ostreopsis mascarenensis</i>	2500–2535 <sup>a</sup>	ND	Lenoir et al., 2004
Mascarenotoxin-a	<i>Ostreopsis ovata</i>	2588	$C_{127}H_{221}N_3O_{50}$	This study
Mascarenotoxin-b	<i>Ostreopsis mascarenensis</i>	2500–2535 <sup>b</sup>	ND	Lenoir et al., 2004
Mascarenotoxin-c	<i>Ostreopsis ovata</i>	2628	$C_{128}H_{221}N_3O_{51}$	This study
Ostreocin-d	<i>Ostreopsis siamensis</i>	2634	$C_{127}H_{220}N_3O_{53}$	Ukena et al., 2001
Ovatoxin-a	<i>Ostreopsis ovata</i>	2646	$C_{128}H_{223}N_3O_{52}$	Ciminiello et al., 2008
42-Hydroxy-palytoxin	<i>Palythoa toxica</i>	2694	$C_{128}H_{223}N_3O_{55}$	Ciminiello et al., 2009
Palytoxin-b	<i>Palythoa tuberculosa</i>	2720	$C_{131}H_{225}N_3O_{55}$	This study
Ovatoxin-b	<i>Ostreopsis ovata</i>	2662	$C_{128}H_{223}N_3O_{53}$	This study
Ovatoxin-c	<i>Ostreopsis ovata</i>	2690	$C_{130}H_{223}N_3O_{54}$	This study
Ovatoxin-d	<i>Ostreopsis ovata</i>	2706	$C_{130}H_{223}N_3O_{55}$	This study

<sup>a</sup> Calculations based on the spectrum give an MW of 2588.

<sup>b</sup> Calculations based on the spectrum give an MW of 2606.

extracted from the crab *Lophozozymus pictor* and in minor toxins from *Palythoa tuberculosa* (Uemura et al., 1985; Lau et al., 1995).

A separate cluster of mono-charged ions ( $[M + H - 362]^+$  at  $m/z$  2267) was not detected for mactarenotoxin-a, although this molecule does have a fragment ion  $[M + H]^+$  at  $m/z$  327.1958 (Lenoir et al., 2004). However, only a small amount of this compound was retrieved in our samples. For the same reason, no information is available on the position of the differences in the molecule of the McTX-c.

The four new toxins identified in this study differed from all the palytoxin-like compounds so far described in both molecular weight (MW) and supposed chemical formula (Table 3). The only exception was OvTX-b, which showed the same MW and formula as deoxy-palytoxin, described from *P. tuberculosa* (Uemura et al., 1985). However, the additional oxygen atom of deoxy-palytoxin is located in the part B (Uemura et al., 1985), whereas our results suggest that it is located in part A in OvTX-b. Further studies are necessary to confirm that deoxy-palytoxin and OvTX-b are indeed structural isomers.

#### 4. Concluding remarks

Palytoxin is a large, very complex molecule with both lipophilic and hydrophilic areas, and has the longest chain of continuous carbon atoms known to exist in a natural product. Secondary products similar to palytoxin or closely related compounds are synthesized by a number of different algae (Table 3), and it has long been known that individual species may contain mixtures of different isomers (Moore and Bartolini, 1981). Therefore the effective identification of both known and unknown compounds in naturally occurring organisms with a simple and fast method is an important objective. The LC/TOF/MS method developed in this study proved to be rapid and highly effective for the determination of PITX and its analogues. The information provided by this method complements that obtained with other LC/MS/MS techniques, overcoming the problem of the identification of unknown peaks only based on the mass spectrum. In addition, LC/TOF/MS allows the acquisition of full spectra of the sample and provides accurate mass measurements for the estimation of elemental composition. The method proposed could be applied to investigate the presence of novel biotoxins in other microalgal species, thus contributing to a more effective prevention of human intoxications following assumption of toxin contaminated seafood.

LC/TOF/MS allowed the identification of one novel palytoxin-like compound from the reference material extracted from *P. tuberculosa* and four novel analogues from the Mediterranean *O. cf. ovata*. This finding raises to six the number of palytoxin-like compounds present in this species, confirming that a variety of similar but distinct molecules can be found in a single species. Based on their molecular formula, these new compounds appeared to be strictly related to PITX. Further studies are necessary to isolate these new molecules, elucidate their chemical structure and be able to detect them in seafood. In addition, it would be important to study the interspecific variability of the palytoxin spectrum by analysing more strains, and to

assess the variability in toxin pattern and relative abundance in different strains and environmental conditions.

The new molecules retrieved in *O. cf. ovata* pose questions as to their actual contribution to the toxicity of this species, highlighting a possible underestimation of toxicity in analyses on marine organisms contaminated by *O. cf. ovata* that have been conducted so far. Indeed, the total concentration of the new analogues in the analyzed samples is comparable to that of OvTX-a, which doubles the amount of palytoxin-like substances in *O. cf. ovata*. For the time being, the analysis of shellfish contaminated by *O. cf. ovata* toxins should take into account the presence of OvTX-b, OvTX-c, OvTX-d, McTX-a and McTX-c in addition to the previously known toxins. Future toxicological studies on the new compounds produced by *O. cf. ovata* are warranted in order to better assess the total risks posed to human health by seafood contamination in the Mediterranean Sea.

#### Acknowledgements

This work is part of a research supported by the Ministry of Health and by the Regione Campania – Assessorato alla Sanità. Eleonora Scalco was funded by a grant of the Italian Ministry of Environment (project *Ostreopsis ovata* in the Italian Seas).

#### Conflict of interest

The authors do not recognize any conflict of interest regarding any information and/or data presented in this work.

#### Funding source

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno and Stazione Zoologica Anton Dohrn.

#### Appendix. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.toxicon.2010.08.003.

#### References

- Aligizaki, K., Nikolaidis, G., 2006. The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece. *Harmful Algae* 5, 717–730.
- Aligizaki, K., Katikou, P., Nikolaidis, G., Panou, A., 2008. First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece). *Toxicon* 51, 418–427.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S.G., Tartaglione, L., Grillo, C., Melchiorre, N., 2006. The Genoa 2005 outbreak: determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Anal. Chem.* 78, 6153–6159.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Grillo, C., Melchiorre, N., 2008. Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian Coasts during the 2006 toxic outbreak. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 19, 111–120.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Florio, C., Lorenzon, P., De Bortoli, M., Tubaro, A., Poli, M., Bignami, G., 2009. Stereostructure and biological activity of 42-hydroxy-palytoxin: a new palytoxin analogue from Hawaiian *Palythoa* subspecies. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 1851–1859.

- Deeds, J.R., Schwartz, M.D., 2010. Human risk associated with palytoxin exposure. *Toxicon* 56, 150–162.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2009. Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish – palytoxin group. *EFSA J.* 7 (12), 1393. 1–38.
- Faust, M.A., Morton, S.L., Quod, J.P., 1996. Further SEM study of marine dinoflagellates: the genus *Ostreopsis* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 32, 1053–1065.
- Guerrini, F., Pezzolesi, L., Feller, A., Riccardi, M., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Pistocchi, R., 2010. Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas. *Toxicon* 55, 211–220.
- Keller, M.D., Selvin, R.C., Claus, W., Guillard, R.R.L., 1987. Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *J. Phycol.* 23, 633–638.
- Lau, C.O., Tan, C.H., Khoo, H.E., Yuen, R., Lewis, R.J., Corpuz, G.P., Bignami, G.S., 1995. *Lophozozymus pictor* toxin: a fluorescent structural isomer of palytoxin. *Toxicon* 33, 1373–1377.
- Lenoir, S., Ten-Hage, L., Turquet, J., Quod, J.P., Bernard, C., Hennion, M.C., 2004. First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascareneensis* (Dinophyceae) benthic bloom in southwestern Indian Ocean. *J. Phycol.* 40, 1042–1051.
- Mangialajo, L., Bertolotto, R., Cattaneo-Vietti, R., Chiantore, M., Grillo, C., Lémée, R., Melchiorre, N., Moretto, P., Povero, P., Ruggieri, N., 2008. The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 1209–1214.
- Moore, R.E., Bartolini, G., 1981. Structure of palytoxin. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 2491–2494.
- Moore, R.E., Scheuer, P.J., 1971. Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. *Science (Washington, DC)* 172, 495–498.
- Panagiota, K., 2007. Chemistry of palytoxins and ostreocins. In: Botana, L. (Ed.), *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*. Wiley-Blackwell, pp. 75–93.
- Penna, A., Vila, M., Fraga, S., Giacobbe, M.G., Andreoni, F., Riobó, P., Vernesi, C., 2005. Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8S rDNA sequences. *J. Phycol.* 41, 212–225.
- Penna, A., Fraga, S., Battocchi, C., Casabianca, C., Giacobbe, M.G., Riobó, P., Vernesi, C., 2010. A phylogeographical study of the toxic benthic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. *J. Biogeogr.* 37, 830–841.
- Riobó, P., Paz, B., Franco, J.M., 2006. Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. *Anal. Chem. Acta* 566, 217–223.
- Sansoni, G., Borghini, B., Camici, G., Casotti, M., Righini, P., Fustighi, C., 2003. Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* (Gonyaulacales: Dinophyceae): un problema emergente. *Biologia Ambientale* 17, 17–23.
- Simoni, F., Gaddi, A., Di Paolo, C., Lepri, L., 2003. Harmful epiphytic dinoflagellate on Tyrrhenian Sea reefs. *Harmful Algal News* 24, 13–14.
- Uemura, D., Hirata, Y., Iwashita, T., Naoki, H., 1985. Studies on palytoxins. *Tetrahedron* 41, 1007–1117.
- Ukena, T., Satake, M., Usami, M., Oshima, Y., Naoki, H., Fujita, T., Kan, Y., Yasumoto, T., 2001. Structure elucidation of ostreocin d, a palytoxin analog isolated from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 2585–2588.
- Yasumoto, T., Murata, M., 1990. Polyether toxins involved in seafood poisoning. In: Hall, S., Strickartz, G. (Eds.), *Marine Toxins*. ACS Symposium Series 418. American Chemical Society, pp. 120–132.

## **Ringraziamenti**

*A conclusione di questo lavoro desidero innanzitutto ringraziare il mio Tutor Professor Giancarlo Barbieri e il mio “capo” Dr. Vittorio Soprano che sono stati sempre disponibili a dirimere i miei dubbi durante la stesura di questo lavoro  
Ma il mio più sentito “GRAZIE!!!”, però, va a Rachele, la mia ala protettrice, una persona che ho la fortuna di avere come amica, senza la quale non sarei arrivato, anzi ritornato qui, dopo circa trent’anni.*