

# Određivanje fitoplanktonskih toksina tekućinskom kromatografijom spregnutom s masenom spektrometrijom visoke rezolucije

---

Vukšić, Lara

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:364249>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-19**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU  
PRIRODOSLOVNO MATEMATIČKI FAKULTET

Odjel za kemiju

ZAVRŠNI RAD

**ODREĐIVANJE FITOPLANKTONSKIH TOKSINA  
TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM  
SPREGNUTOM S MASENOM SPEKTROMETRIJOM  
VISOKE REZOLUCIJE**

Lara Vukšić

Split, rujan 2022.

## **Zahvala**

*Želim se zahvaliti mentoru izv. prof. dr. sc. Stjepanu Orhanoviću i neposrednoj voditeljici mag. educ. biol. et chem. Ivani Žaper na pomoći u provedbi ovog projekta.*

## *Izjava*

Ovaj rad, izrađen na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Splitu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Stjepana Orhanovića, predan je na ocjenu Odjelu za kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnice biologije i kemije.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Odjel za kemiju  
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

Završni rad

### ODREĐIVANJE FITOPLANKTONSKIH TOKSINA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM SPREGNUTOM S MASENOM SPEKTROMETRIJOM VISOKE REZOLUCIJE

Lara Vukšić

Morski plodovi čine važnu sastavnicu uravnotežene ljudske prehrane, ali njihovom konzumacijom može doći do intoksikacije ukoliko su kontaminirani fitoplanktonskim toksinima. Proizvode ih fitoplanktonske alge, a nakupljaju se u morskim organizmima koji se hrane fitoplanktonom. Fitoplanktonski toksini su skupina kompleksnih organskih spojeva, a podijeljeni su u šest skupina s obzirom na simptome trovanja koje izazivaju. Pored negativnih utjecaja na ljudsko zdravlje kao bioaktivne molekule imaju i potencijala u razvoju novih lijekova. Zabrinjavajuća činjenica je što s porastom temperatura mora i oceana dolazi do povećane produkcije ovih toksina koji se pojavljuju i na mjestima gdje ih do sad nije bilo. Analiza uzorka školjkaša provedena je s ciljem detekcije i identifikacije poznatih i novih vrsta toksina na području Jadranskog mora. Kao metoda se koristila tekućinska kromatografija uparena s masenom spektrometrijom visoke rezolucije.

**Ključne riječi:** fitoplanktonski toksini, maseni spektrometar, tekućinska kromatografija

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

**Rad sadrži:** 33 stranice, 18 grafičkih prikaza, 2 tablice i 19 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Stjepan Orhanović, izvanredni profesor

**Neposredni voditelj:** mag. educ. biol. et chem. Ivana Žaper, asistent

**Ocjenjivači:** izv. prof. dr. sc. Stjepan Orhanović, izvanredni profesor

mag. educ. biol. et chem. Ivana Žaper, asistent

dr. sc. Nenad Vuletić, viši asistent

Rad prihvaćen: 19. rujna 2022.

## Basic documentation card

University of Split  
Faculty of Science  
Department of Chemistry  
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

Bachelor's Thesis

### DETERMINATION OF PHYTOPLANKTON TOXINS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY

Lara Vukšić

Seafood is an important component of a balanced diet, but their consumption can lead to intoxication if they are contaminated with phytoplankton toxins. They are produced by phytoplankton algae and accumulate in marine organisms that feed on phytoplankton. Phytoplankton toxins are a group of complex organic compounds divided into six groups according to the symptoms they cause. In addition to negative effects on human health, as bioactive molecules they also have potential in the development of new drugs. The worrying fact is that the rise in sea and ocean temperatures leads to an increased production of these toxins, which appear in places where they were not detected before. The analysis of the shellfish sample was carried out with the aim of detecting and identifying known and new types of toxins in the Adriatic Sea. The method used was liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry.

**Keywords:** phytoplankton toxins, mass spectrometry, liquid chromatography

Thesis deposited in the library of Faculty of Science, University of Split

**Thesis consists of:** 33 pages, 18 figures, 2 tables and 19 references. Original in: Croatian

**Mentor:** Stjepan Orhanović, Ph.D., *Associate Professor*

**Assistant Supervisor:** Ivana Žaper, The Master of Science in biol. and chem. educ. *Assistant*

**Reviewers:** Stjepan Orhanović, Ph.D., *Associate Professor*

Ivana Žaper, The Master of Science in biol. and chem. educ., *Assistant*

Nenad Vuletić, Ph.D., *Senior assistant*

Thesis accepted: September 19<sup>th</sup> 2022

# TABLICA SADRŽAJA

1.	Uvod.....	1
2.	Fitoplanktonski toksini.....	2
2.1.	Jesotoksini .....	3
2.2.	Brevetoksini.....	3
2.3.	Okadaična kiselina .....	4
2.4.	Domoična kiselina.....	5
2.5.	Saksitoksini.....	5
2.6.	Ciklički imini .....	6
2.7.	Ciguatoksini.....	7
2.8.	Azaspiracidi .....	7
3.	Maseni spektrometar.....	9
3.1.	Komponente masenog spektrometra i njihova uloga .....	11
3.1.1.	Izvori iona .....	11
3.1.2.	Maseni analizatori .....	11
3.2.	Načini rada.....	13
3.2.1.	Prikupljanje ovisno o podacima .....	13
3.2.2.	Prikupljanje neovisno o podacima .....	13
4.	Tekućinska kromatografija.....	15
4.1.	Kromatografija s obrnutom fazom.....	15
4.1.1.	Tekućinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom.....	15
5.	Materijali i metode.....	17
5.1.	Kemikalije i potrošni materijal .....	17
5.2.	Metode.....	18
5.2.1.	Uzorkovanje i priprema uzoraka za analizu .....	18

5.2.2.	Tekućinska kromatografija spregnuta masenom spektrometrijom .....	19
6.	Rezultati i rasprava .....	21
6.1.	Rezultati.....	21
6.1.1.	Total ion chromatogram .....	21
6.1.2.	Extracted ion chromatogram.....	22
6.1.3.	Maseni spektar fragmentacije gimnodimina A .....	24
6.2.	Rasprava .....	26
7.	Zaključak.....	27
8.	Popis literature.....	28
	Popis skraćenica .....	30
	Popis slika .....	32
	Popis tablica .....	33



# 1. Uvod

Morski plodovi čine važnu sastavnicu u uravnoteženoj ljudskoj prehrani. Bogati su bjelančevinama, vitaminima, mineralima i drugim nutrijentima, ali njihova konzumacija donosi i određeni rizik. Dosadašnja istraživanja ukazuju na učestalu pojavu fitoplanktonskih toksina u morskim organizmima [1].

Fitoplanktonski toksini su skupina složenih organskih molekula koje sintetiziraju fitoplanktonske alge, a toksično djeluju na ljude i neke životinje [2]. Već u malim koncentracijama pokazuju mutageno i toksično djelovanje na organizam, a neki su i tumor promotori [1]. Predstavljaju rizik za zdravlje konzumacijom kontaminirane ribe i školjkaša, visoko zastupljenih komponenti ljudske prehrane, a istovremeno su izuzetno važni. Navedeni morski organizmi potencijalni su izvori spojeva za sintezu različitih lijekova [2].

Intenzitet simptoma intoksikacije ovisi o vrsti i količini unesenog fiktoksina [1]. Osim konzumacijom, do trovanja može doći udisanjem toksičnog aerosola ili kontaktom s kožom preko zagađene vode [3].

Porastom temperatura mora i oceana došlo je do pojave sve većeg broja toksina jer topliji uvjeti pogoduju cvjetanju algi [2]. Posljedice su sve češća pojavnost fiktoksina i u područjima u kojima do sada nisu bili prisutni. Stoga su uvedene dodatne kontrole i programi monitoringa s ciljem prevencije konzumacije kontaminirane hrane [1]. Unatoč različitim analizama, nove toksine i nove analoge već postojećih je iznimno teško kontrolirati jer nema dovoljno dostupnih standarda [4].

Istraživanjem biološke aktivnosti fitoplanktonskih toksina otkriveno je da neki imaju antikancerogena svojstva. Izoliranjem spojeva koji potječu iz morskih organizama, razvila se nekolicina lijekova od kojih se čak četiri koriste kao terapija u liječenju raka. Drugi toksini su pokazali antimikrobna svojstva koja se mogu iskoristiti za razvijanje novih antibiotika, pozitivne učinke prevencije kardiovaskularnih bolesti i poboljšanu kognitivnu funkciju kod bolesnika od Alzheimerove bolesti [5].

Tematika ovog završnog rada usmjerena je na istraživanje zastupljenosti toksina u Jadranskom moru. Prilikom provođenja eksperimenta koristila se metoda masene spektrometrije koja je ujedno i najpreciznija metoda za analizu toksina.

## 2. Fitoplanktonski toksini

Morski toksini su grupa kompleksnih organskih spojeva koje organizmi proizvode kako bi se zaštitili, osigurali životni prostor i savladali plijen. Organizmi koji ih proizvode su fitoplanktoni, modrozeleno alge, meduze, puževi, ribe i sl. Toksini koje proizvode fitoplanktonske alge tj. fiktoksini su termostabilne, uglavnom neproteinske molekule malih do vrlo velikih molekulskih masa. Prema topljivosti dijele se na one topljive u vodi i topljive u mastima [2].

Neproteinski fitoplanktonski toksini, koji imaju dokazani učinak na ljude, podijeljeni su u šest klasifikacijskih skupina temeljem podrijetla, simptoma koje izazivaju i kemijske strukture. Klasifikacijske skupine trovanja toksinima su: paralitičko trovanje školjkašima (PSP - paralytic shellfish poisoning, saksitoksini), amnezijsko trovanje školjkašima (ASP – amnesic shellfish poisoning, domoična kiselina), dijaretično trovanje školjkašima (DSP – diarrheic shellfish poisoning, okadaična kiselina i dinofizistoksini), trovanje azaspiracidima (AZP – azaspiracid poisoning, azaspiracidi), neurotoksično trovanje školjkašima (NSP – neurotoxic shellfish poisoning, brevetoksini) i trovanje ribom Ciguatera (CFP – ciguatera fish poisoning, ciguatoksini) [2].

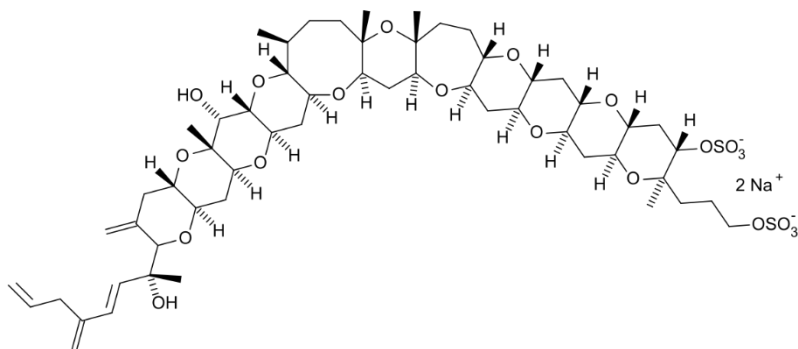
Kemijski razlikujemo jesotoksine (YTX), brevetoksine (BTX), okadaičnu kiselinu (OA), domoičnu kiselinu (DA), saksitoksine (STX), cikličke imine (CI), ciguatoksine (CTX) i azaspiracide (AZA) [1].

Fiktoksini se nakupljaju u životinjskim vrstama čija je prehrana povezana s fitoplanktonom. U školjkašima se toksini nakupljaju u probavnim žlijezdama i nemaju štetnog utjecaja na njih, ali konzumacijom takvih organizama, u kojima je koncentracija toksina prevelika, postoji rizik od ugrožavanja zdravlja [3].

## 2.1. Jesotoksini

Jesotoksini (YTX, Slika 1.) su sulfonirani polieteri koji pripadaju porodici lipofilnih fiktoksina. Proizvode ih dinoflagelati *Protoceratium reticulatum* (Claparède & Lachmann), *Lingulodinium polyedra* (F. Stein) i *Gonyaulax spinifera* (Claparède & Lachmann) [6].

Toksini se akumuliraju u školjkama prilikom njihovog hranjenja filtriranjem te na takav način ulaze u hranidbeni lanac. Učinak jesotoksina na ljude je nepoznat te nema zabilježenih slučajeva trovanja [6].

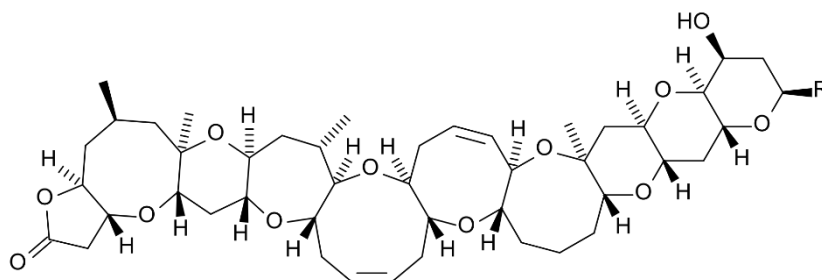


**Slika 1.-** Kemijska struktura jesotoksina

(izvor: [https://sh.wikipedia.org/wiki/Jesotoksin#/media/Datoteka:Yessotoxin\\_new.png](https://sh.wikipedia.org/wiki/Jesotoksin#/media/Datoteka:Yessotoxin_new.png))

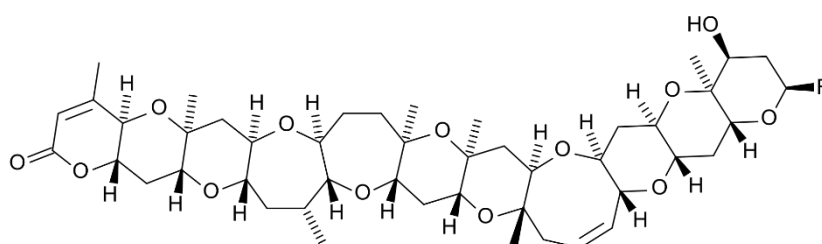
## 2.2. Brevetoksini

*Karenia brevis* je štetna alga koja proizvodi policiklički eterski tip neurotoksina, brevetoksine (BTX), koji utječu na zdravlje ljudi, morskih sisavaca, ptica i riba. Svojom cvatnjom ugrožava čitavi ekosustav. Trovanja brevetoksinima su specifična jer uzrokuju intoksikaciju konzumacijom zaraženih organizama, ali i izlaganjem aerosolu u blizini obale pri kojoj cvate *K. brevis*. Brevetoksini su podijeljeni u dvije grupe: A-tip spojeva u koje spada BTX1 (Slika 2.) i njegovi derivati te B-tip spojeva (Slika 3.) u koje spadaju BTX2 i BTX3 i njihovi derivati. Pored toksina koje proizvodi *K. brevis*, identificirani su i spojevi koji su netoksični te inhibiraju djelovanje BTX-a [7].



**Slika 2.** - Kemijska struktura brevetoksina A

(izvor: [https://en.wikipedia.org/wiki/Brevetoxin#/media/File:Brevetoxin\\_A.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Brevetoxin#/media/File:Brevetoxin_A.svg))



**Slika 3.** - Kemijska struktura brevetoksina B

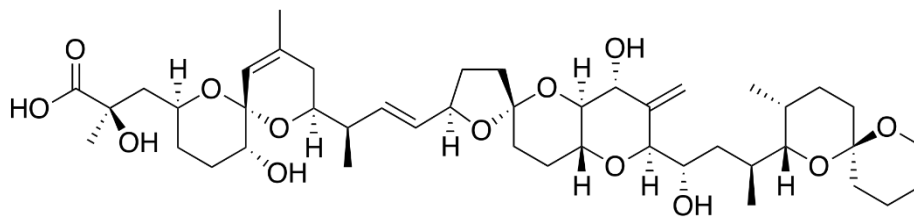
(izvor: [https://en.wikipedia.org/wiki/Brevetoxin#/media/File:Brevetoxin\\_B.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Brevetoxin#/media/File:Brevetoxin_B.svg))

### 2.3. Okadaična kiselina

Okadaična kiselina (OA, Slika 4.) pripada grupi lipofilnih polieterskih toksina koje proizvode rodovi *Dinophysis* i *Prorocentrum*. Ovoj grupi pripadaju i dinofizistoksini 1 i 2 (DTX1 i DTX2) te njihovi esteri [8].

Inhibitori su enzima serinske i treoninske protein fosfataze koji su uključeni u regulaciju niza procesa u eukariotskim stanicama. Vezno mjesto ovih toksina je aktivno mjesto enzima na katalitičkoj podjedinici. Inhibicijom fosfataza dolazi do hiperfosforilacije proteina uključenih u spojeve citoskeleta te do gubitka stanične tekućine [8].

Također, pronađena je poveznica između okadaične kiseline i sličnih polieterskih toksina s razvojem tumora kod ljudi prilikom izlaganja malim dozama toksina ove skupine [9].



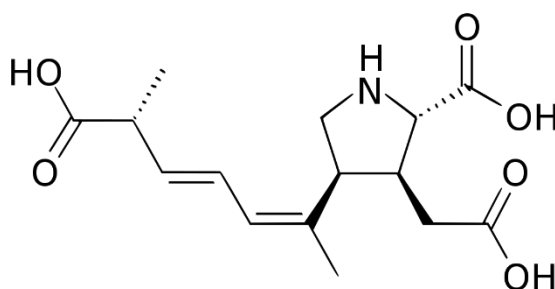
**Slika 4.** - Kemijska struktura okadaične kiseline

(izvor: [https://en.wikipedia.org/wiki/Okadaic\\_acid#/media/File:Okadaic\\_acid.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Okadaic_acid#/media/File:Okadaic_acid.svg))

## 2.4. Domoična kiselina

Domoična kiselina (DA, Slika 5.) je trikarboksilna aminokiselina koju proizvodi dijatomeja *Pseudo-nitzschia multiseries*. Akumulacija domoične kiseline varira među školjkašima pa neke toksin izlučuju vrlo brzo dok ga druge akumuliraju kroz duži period. Kiselina se apsorbira u probavnim žlijezdama školjkaša pomoću membranskih transportera ovisnih o ATP-u [10].

DA je neurotoksin s visokim afinitetom za oba tipa glutamatnih receptora. Vezanjem za receptore dolazi do otvaranja natrijevih i kalcijevih kanala te do depolarizacije membrane. Povišenje koncentracije kalcijevih iona u stanici dovodi do propadanja neurona i stvaranja lezija na mozgu. Također, niske koncentracije domoične kiseline koje ne uzrokuju strukturna oštećenja, uzrokuju probleme s memorijom [10].



**Slika 5.** - Kemijska struktura domoične kiseline

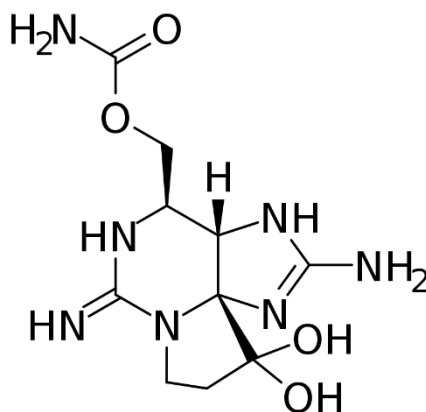
(izvor: [https://en.wikipedia.org/wiki/Domoic\\_acid#/media/File:Domoic\\_acid.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Domoic_acid#/media/File:Domoic_acid.svg))

## 2.5. Saksitoksini

Saksitoksini (STX, Slika 6.) su hidrofilni neurotoksini koje proizvode cijanobakterije i dinoflagelati.

Pripadaju skupini neurotoksina zbog mogućnosti utjecanja na natrijeve, kalcijeve i kalijeve ionske kanale te promjene koncentracije istih iona u stanici [11].

Danas je u svijetu poznato 57 analoga saksitoksina koji se razlikuju po supstituentima bočnih lanaca na perhidropurinskoj tricikličkoj okosnici. Klasificirani su kao nesulfatirani (neoSTX), monosulfatirani (GTX1-6), disulfatirani (C1-4), dekarbamilirani (dcSTX, dcneoSTX, dcGTXs1-4) te deoksi-dekarbamolirani (doSTX, doGTXs1-3) [11]. Toksičnost ove skupine toksina varira, s tim da su saksitoksin i neosaksitoksin zabilježeni kao najotrovniji [12].



**Slika 6.** - Kemijska struktura saksitoksina

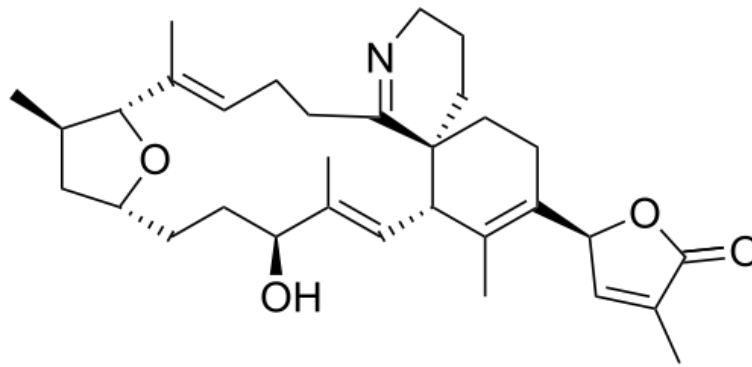
(izvor: [https://en.wikipedia.org/wiki/Saxitoxin#/media/File:Saxitoxin\\_neutral.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Saxitoxin#/media/File:Saxitoxin_neutral.svg))

## 2.6. Ciklički imini

Ciklički imini (CI) su lipofilni neurotoksini koje proizvode dinoflagelati. Prstenaste su strukture građene od 14 do 27 ugljikovih atoma od kojih svaka sadrži dvije značajke, skupinu cikličkog imina i spiroketonski prstenasti sustav. Razlikujemo pinatoksine, pteriatoksine, gimnodimine (Slika 7.) i spirolide [2].

Smatraju se „brzo djelujućima“, što pokazuju istraživanja na eksperimentalnim životinjama. Vrijeme od intraperitonealnog unošenja toksina u organizam do prve pojave neuroloških simptoma pa i smrti bilo je svega nekoliko minuta. Ne smatraju se opasnima po ljude jer od otkrića cikličkih imina do danas nema zabilježenih slučajeva akutnih trovanja [13].

Povišenjem temperature mora i oceana dolazi do povećane produkcije ovih toksina te se zbog toga mora pratiti njihova razina u morskim organizmima [2].

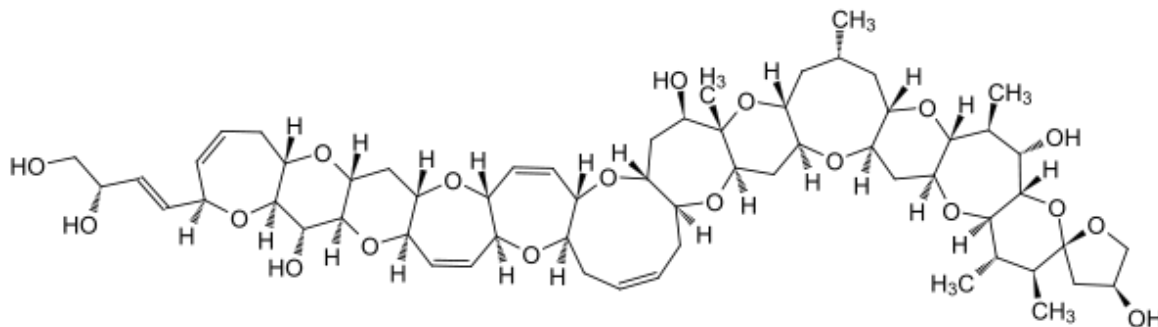


**Slika 7.** - Kemijska struktura gimnodimina A

(izvor: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4e/Gymnodimine\\_A.svg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4e/Gymnodimine_A.svg))

## 2.7. Ciguatoksini

Ciguatoksini (CTX) su skupina lipofilnih, termostabilnih toksina koje proizvode dinoflagelati roda *Gambierdiscus*. CTX (Slika 8.) su ciklički polieteri sastavljeni od 13 do 14 prstenova, međusobno povezanih eterskim vezama u rigidnu strukturu nalik ljestvama. Njihova struktura ovisi o geografskom položaju pa tako razlikujemo ciguatoksine Indijskog oceana (I-CTX), Pacifičkog oceana (P-CTX) i Karipskog mora (C-CTX). P-CTX-1 se smatra naj snažnijim toksinom ove skupine zbog sposobnosti intoksikacije pri vrlo niskim koncentracijama [14].



**Slika 8.**- Kemijska struktura ciguatoksina

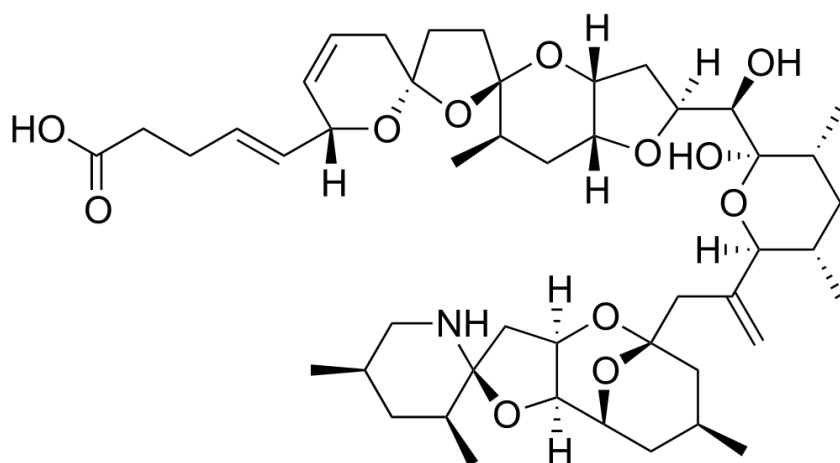
(izvor: [https://www.wikiwand.com/en/Ciguatera\\_fish\\_poisoning#/Media/File:Ciguatoxin.svg](https://www.wikiwand.com/en/Ciguatera_fish_poisoning#/Media/File:Ciguatoxin.svg))

## 2.8. Azaspiracidi

Azaspiracid (AZA), prijašnjeg naziva „Killary-toxin“ ili KT-3, je lipofilni toksin koji je dobio ime po svojoj kemijskoj strukturi. Azaspiracid 1 (AZA1, Slika 9.) je ciklički amin koji se sastoji od tri-spiro-skupine i karboksilne kiseline. Izolirano je pet analoga ovog toksina imenovanih

azaspiracid 1-5 (AZA1, AZA2, AZA3, AZA4, AZA5). U usporedbi s AZA1, AZA3 nema metilnu skupinu na C22, a AZA2 posjeduje dodatnu metilnu skupinu na C8. AZA4 i AZA5 su hidroksilni analozi AZA3 jer AZA4 posjeduje dodatnu hidroksilnu skupinu na C3, a AZA5 na C23 [15].

Smatra se da ih proizvode dinoflagelati *Protoperidinium crassipes*, a toksini se nakupljaju u tkivu školjkaša. Konzumacija hrane kontaminirane azaspiracidima uzrokuje blaže simptome trovanja kod ljudi, bez smrtnog ishoda [15].



**Slika 9.** - Kemijska struktura azaspiracida1

(izvor:<https://en.wikipedia.org/wiki/Azaspiracid#/media/File:Azaspiracid-1.svg>)

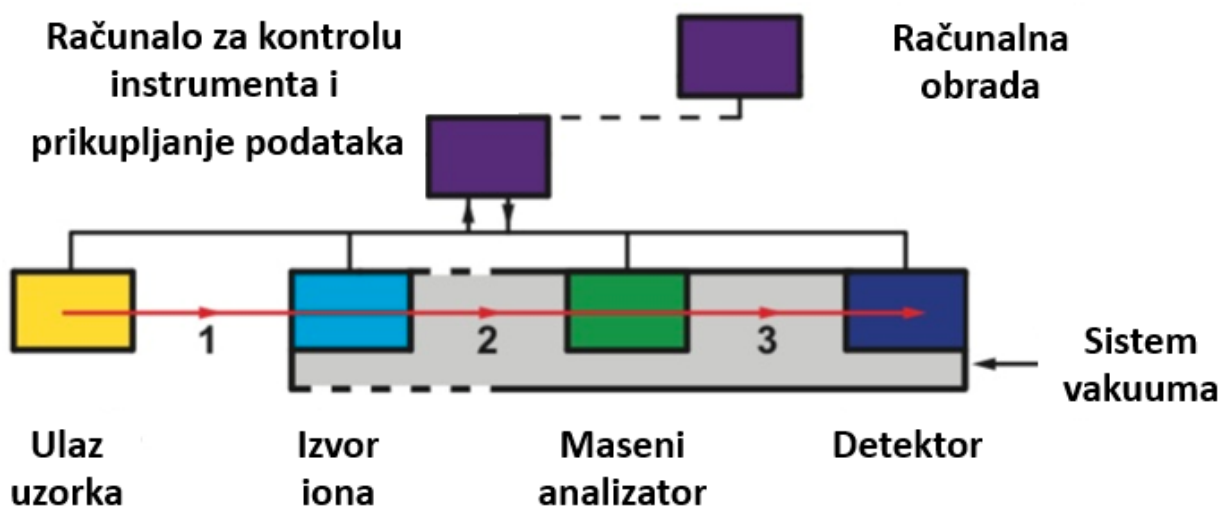


### 3. Maseni spektrometar

Maseni spektrometar je analitički uređaj koji mjeri odnos mase i naboja ( $m/z$ ) iona. Omjer mase i naboja ( $m/z$ ) je bezdimenzijski broj koji se dobije dijeljenjem mase iona ( $m$ ) i broja naboja ( $z$ ) kojeg taj ion nosi tijekom ionizacijskog procesa. Kako bi se provela masena analiza sve čestice moraju biti u plinovitom stanju i imati električni naboj tj. biti ioni [16].

Maseni spektrometar radi na principu stvaranja zrake čestica plinovitog stanja od analita (uzoraka) kako bi nastali ioni koje razdvaja po njihovom omjeru mase i naboja koristeći magnetno i/ili električno polje. Nakon detekcije prikazuje rezultate mjerenja u obliku signala koji se razlikuju po intenzitetu i omjeru  $m/z$  kako bi se mogli odrediti prisutni ioni. Svi maseni spektrometri rade na ovom principu [16].

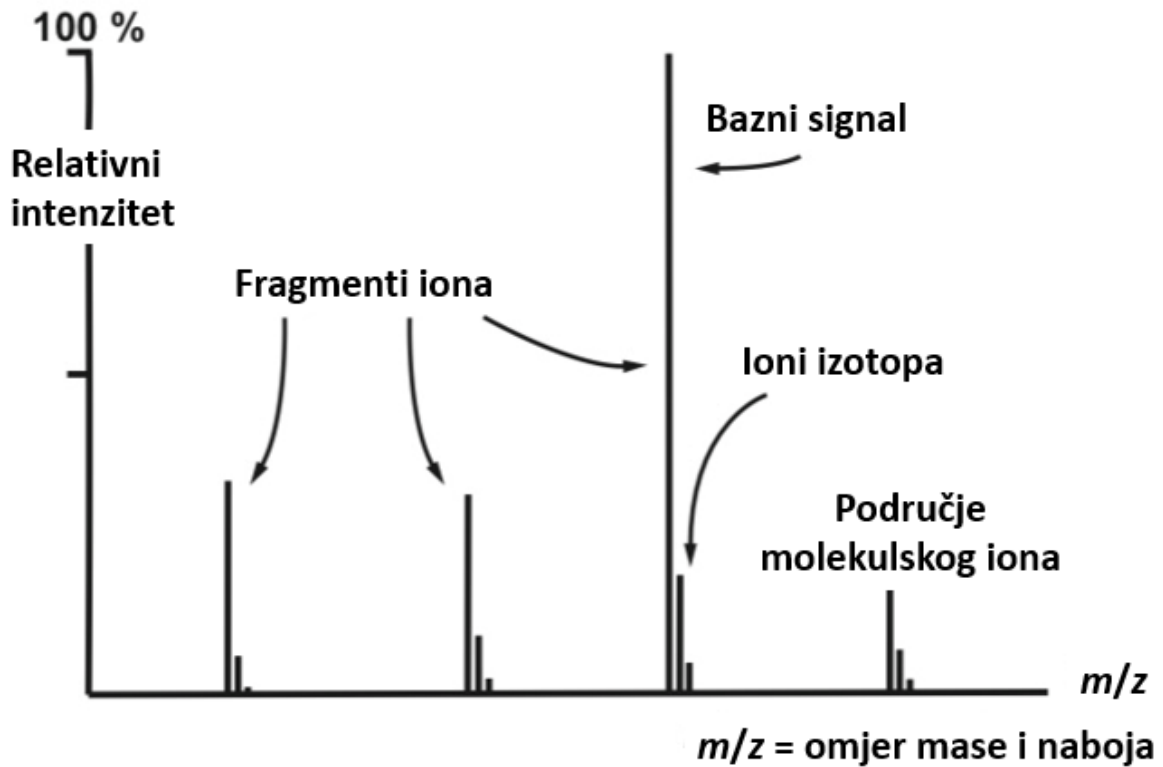
Dijelovi masenog spektrometra koji ioniziraju uzorak, odvajaju ga po  $m/z$  te ga detektiraju su: (1) sistem uvođenja uzorka, (2) izvor iona gdje se analit prevodi u plinovito stanje i ionizira se, (3) analizator iona koji ih odvaja po  $m/z$  omjeru, (4) detektor iona gdje se ioni razdvajaju po intenzitetu i određuje se  $m/z$  omjer, (5) sistem vakuumu kako se ne bi izgubili ioni te (6) računala koja kontroliraju proces i bilježe rezultate. Na Slici 10. prikazana je shema rada masenog spektrometra [16].



Slika 10.– Shema rada masenog spektrometra

(izvor: J. Greaves i J. Roboz, Mass Spectrometry for the Novice, str. 3)

Maseni spektar (Slika 11.) je dvodimenzionalna reprezentacija distribucije i intenziteta iona koje je maseni spektrometar analizirao. Prikaz masenog spektra može biti grafički i tabelarni. Na grafičkom prikazu na x-osi se nalazi parametar  $m/z$ , a na y-osi intenzitet ili relativni intenzitet prikazan u obliku postotka [16].



**Slika 11.** - Maseni spektar

(izvor: J. Greaves i J. Roboz, Mass Spectrometry for the Novice, str. 7)

Tijekom procesa ionizacije, molekulama se dovodi energija. U tom procesu može doći do pucanja kemijskih veza i nastanka fragmenata. Ponekad je fragmentacija toliko intenzivna da u grafičkom prikazu ne postoji područje molekularnog iona. Osnovni tj. bazni signal predstavlja najstabilniji ion koji je proizašao iz procesa ionizacije, a ujedno i najintenzivniji signal spektra. Taj pik se često nalazi najviše desno na x-osi te predstavlja molekulsku masu analita. Ioni koji se nalaze desno od signala najvišeg intenziteta najčešće predstavljaju signale izotopa ako ih analit posjeduje. Fragmenti tih iona se pojavljuju s različitim masama, ali su uvijek manje mase od molekulskog iona [16].

## 3.1. Komponente masenog spektrometra i njihova uloga

### 3.1.1. Izvori iona

Molekule su nenabijene te se ne mogu manipulirati pomoću magnetnog i električnog polja. Moraju se ionizirati i prevesti u plinovito stanje kako bi ih maseni spektrometar mogao filtrirati i detektirati. Tim procesom molekule dobivaju energiju na kontroliran način i prevode se u ione. Postoji više načina ionizacije, a to su: elektronska ionizacija (EI), kemijska ionizacija (CI), ionizacije pri atmosferskom tlaku (API) i to kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (APCI) i elektrosprej ionizacija (ESI) te laserska desorpcija/ionizacija pomoću matriksa (MALDI). Za potrebe ovog rada objasniti će se elektrosprej ionizacija [16].

Elektrosprej ionizacija (ESI) je metoda ionizacije koja se temelji na dovođenju visokog napona (2-5 kV) na provodljivi medij u kojem je analit otopljen te prevođenju medija u finu maglicu protiskivanjem kroz kapilaru. Nabijene kapljice isparavaju kontinuirano pa gustoća naboja kapljica raste do točke kad više ne može postojati u tom obliku što za posljedicu ima raspadanje kapljica na manje i/ili izlazak iona iz kapljice u plinsku fazu. U ovom procesu se izbacuju ioni koji mogu imati različit naboj po molekuli [16].

### 3.1.2. Maseni analizatori

Uloga masenih analizatora je razdvajanje iona prema njihovom omjeru  $m/z$  i prijenos do detektora. Odabir analizatora se smatra ključnim za analizu masenim spektrometrom jer utječe na dobivene podatke mjerenja i dostupni dinamički raspon [16].

Analizatori razdvajaju ione u vremenu ili prostoru. Postoje različite vrste masenih analizatora kao što su: kvadrupol (*engl. quadrupol*, Q), ionski filter (*engl. ion trap*), time-of-flight (TOF), magnetski sektor (*engl. magnetic sector*, B), orbitrap i ionska ciklotronska rezonancija (*engl. ion cyclotron resonance*, ICR) [16].

Dva ili više analizatora mogu biti međusobno povezani u tzv. *tandem* instrumente. Takvom kombinacijom dobivaju se uređaji koji imaju poboljšani limit detekcije te daju izuzetno precizne informacije o strukturi [16].

#### 3.1.2.1 Quadrupol

Quadrupol analizatori sastoje se od četiri metalne (molibden) šipke ili četiri keramičke šipke obložene metalom. Duge su od 10 do 20 cm i promjera 1 cm. Postavljene su paralelno jedna s

drugom u obliku kvadrata tako da su obrnuti polovi povezani električki. Šipke moraju biti postavljene precizno kako bi stvorile simetrično električno polje koje može razdvajati ione na temelju njihove razlike u omjeru  $m/z$ . Klasificirani su kao analizatori niske rezolucije jer ne mogu razdvojiti ione iste nominalne mase, a različite empirijske formule. Prednosti quadrupola su brza skeniranja, raspon masa do 4 kD i mogućnost monitoringa nad jednim ili više iona istovremeno. Zbog toga se koriste kao analizatori za kvalitativne analize [16].

### 3.1.2.2 Time-of-flight

*Time-of-flight* (vrijeme leta, TOF) analizatori rade na principu mjerenja vremena prolaska iona kroz područje bez magnetnog polja. Impulsi ione ubrzavaju od izvora do analizatorske cijevi. Vrijeme leta je funkcija momenta iona i njihovog omjera  $m/z$ . Napon ubrzanja te kinetička energija koju dobiju ioni su jednaki za sve ione. Oni s najmanjim omjerom mase i naboja će postići veću brzinu pa će doći najbrže do detektora. Time-of-flight analizatori su neskenirajući te kao takvi ione moraju pulsirati u analizator kao diskretne paketiće koji sadrže ione sa svim omjerima  $m/z$  koji su proizvedeni u izvoru iona. Svaki paketić iona analizira se zasebno [16].

Prednost TOF-a je teoretski neograničen raspon masa, do otprilike 350 kD. Dodatkom reflektora (ionskih ogledala), analizatoru se povećava rezolucija i točnost mjerenja. Maseni spektrometri koji koriste TOF analizatore su posebno korisni kad se upare s kromatografijom. Mogu biti spregnuti s plinskom ili tekućinskom kromatografijom [16].

### 3.1.2.3 Orbitrap

Maseni analizator, orbitrap, je elektrostatička ionska zamka koja sadržava unutarnju elektrodu vretenastog oblika i podijeljenu vanjsku elektrodu. Ioni se prvo skupljaju u posebnom dijelu nazvanom *C-trap* te se onda ubacuju u orbitrap kao brzi pulsevi. Brzina osigurava ionima centrifugalnu silu kako bi se suprotstavili privlačenju centralne elektrode. Pri ulasku u stanicu, ioni slijede putanju koja je sastavljena od dva dijela: rotacijskog gibanja oko unutarnje elektrode i aksijalnog osciliranja duž iste elektrode koja je pod pravim kutom u odnosu na rotacijsku komponentu. Periodičnost aksijalnog osciliranja je proporcionalna omjeru  $m/z$  komponenta iona te se zbog toga snima slika i interpretiraju se rezultati koristeći FT (*engl. Fourier transform*) analizu [16].

Rezolucija orbitrapova može prijeći 200 000. Prednosti ove vrste analizatora su mjerenje masa visoke točnosti i veliki dinamički raspon mjerenja [16].

## 3.2. Načini rada

Postoje tri načina prikupljanja podataka: *full-scan* (potpuno skeniranje), *Data-Dependent Acquisition* (prikupljanje ovisno o podacima) i *Data-Independent Acquisition* (prikupljanje neovisno o podacima). Prvo se provodi *full-scan* kako bi se svakom ionu u uzorku odredio omjer mase i naboja te relativna zastupljenost fragmenata. Kad se napravi spektar fragmentacije uzorka mogu se potvrditi kemijski identiteti. Ovakva analiza razdvaja kvantifikaciju od strukturnog određivanja te su potrebne dodatne analize. Kako bi se omogućio vremenski učinkovitiji način prikupljanja podataka koji uključuje fragmentaciju ishodnih iona koristi se DDA (*Data-Dependent Acquisition*) ili DIA (*Data-Independent Acquisition*) način rada [17].

### 3.2.1. Prikupljanje ovisno o podacima

*Data-Dependent Acquisition* (DDA/IDA) odnosno prikupljanje ovisno o podacima je način rada masenog spektrometra iz kojeg se mogu dobiti informacije o kvantitativnosti i strukturi. To znači da ovaj način rada omogućuje istovremeno snimanje spektra ishodnih iona i spektra fragmenata, ali samo za najintenzivnije ione. Ograničenje DDA analize je ovisnost o intenzitetu signala, što znači da značajke od interesa s niskom zastupljenošću neće biti analizirane te neće biti podataka o postojanju istih. Osim toga, problem je što se uzorak stalno mijenja tj. stalno ulazi u maseni spektrometar i tako ograničava vrijeme analize. To smanjuje intenzitet signala i ograničava kvantifikaciju i identifikaciju [17][18].

Ako se analiza provodi u TOF načinu rada, uređaj identificira sve što se nalazi u uzorku, ali ne radi fragmentaciju. Ako se žele dobiti fragmenti, odredi se ion točno određene mase koji će se fragmentirati. Taj ion ulazi u prvu kolizijsku komoru-*quadrupol*, a zatim u TOF komoru u kojoj se analizira [17].

### 3.2.2. Prikupljanje neovisno o podacima

*Data-Independent Acquisition* (DIA/MRM) odnosno prikupljanje neovisno o podacima je način rada masenog spektrometra koji je nastao kako bi se riješila ograničenja DDA analize. Ovom metodom se mogu identificirati i detektirati i unaprijed definirani prekursori iona koji su zastupljeni u niskim koncentracijama. U ovom načinu rada instrument može fragmentirati više od jednog iona istovremeno. DIA se koristi kad se unaprijed znaju ioni koje se treba analizirati. Može se fragmentirati i skup iona koji izlazi iz prvog *quadrupola* kao prozor s definiranim

rasponom, ali nastaje kompleksan spektar u kojem je teško povezati prekursor s njegovim fragmentima iona [17][18].

## 4. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (*High-performance liquid chromatography*, HPLC skraćeno *Liquid chromatography*, LC) je tehnika koja se koristi kako bi se uzorak odvojio na individualne komponente. Odvajanje se javlja zbog interakcije uzorka sa stacionarnom i mobilnom fazom. LC se sastoji od tekuće mobilne faze koja polako filtrira kroz krutu stacionarnu fazu odvajajući komponente uzorka [19].

Komponente uzorka se razdvajaju zbog različitog afiniteta prema mobilnoj i stacionarnoj fazi. Odvajanje ovisi o polarosti mobilne faze i komponenta te zbog toga jedna komponenta eluira kroz kolonu brže od druge. Stacionarna faza je najčešće adsorbens koji može zadržati čestice na svojoj površini. Najpoznatije vrste tekućinske kromatografije su kromatografija s normalnom i kromatografija s obrnutom fazom [19].

### 4.1. Kromatografija s obrnutom fazom

Kod kromatografije s obrnutom fazom koristi se polarna mobilna i nepolarna stacionarna faza. Komponente brže eluiraju kroz kolonu porastom polarosti. Ako eksperiment zahtjeva gradijentnu promjenu polarosti mobilne faze, gradijent mora biti takav da se kreće od najpolarnijeg otapala prema najmanje polarnom. Kod HPLC-a se kao stacionarna faza koristi manje polarna stacionarna faza kemijski povezana s polarnim silikagelom. Koristeći se ovom metodom, najpolarnija komponenta eluira prva, a slijede je komponente opadajuće polarosti [19].

#### 4.1.1. Tekućinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom

Tekućinska kromatografija povezana s masenom spektrometrijom (*Liquid chromatography – Mass spectrometry*, LC-MS, Slika 12.) visoke rezolucije je trenutno jedna od najistaknutijih analitičkih metoda zbog svoje specifičnosti i osjetljivosti metode. U metodi, tekućinska kromatografija razdvaja komponente uzorka prema njihovim kemijskim svojstvima. Vrijeme zadržavanja komponenta je važno za identifikaciju. Maseni spektrometar ove podatke koristi za otkrivanje intenziteta signala komponenta jer je signal proporcionalan koncentraciji [16].

U ovoj metodi koristi se kromatografija s obrnutom fazom zbog polarnosti komponenata koje se analiziraju. Komponente se eluiraju uspješno promjenom gradijenta mobilne faze od smjese s najvećim udjelom vode do smjese s najvećim udjelom organskog otapala. Kao stacionarna faza se najčešće koristi ugljikovodični lanac. Problem u metodi stvaraju vrlo polarne komponente. One se ne adsorbiraju na stacionarnu fazu te eluiraju odmah nakon čistog otapala, zbog čega se ne razdvajaju jedne od drugih [16][17][19].

Kromatografija s normalnom fazom se ne može koristiti uparena s masenom spektroskopijom jer koristi otapala koja nisu kompatibilna s LC-MS-om.

S obzirom na jedinstvene značajke i ograničenja svakog načina prikupljanja podataka, odabir metode može utjecati na kvalitetu podataka. Kvaliteta i osjetljivost metode se maksimizira optimizacijom pripreme uzoraka i uvjeta za LC-MS. Provedbom analize nepoznatog uzorka, teško je optimizirati metodu zbog različitih kemijskih svojstava i koncentracija nepoznatih komponenata. Zbog toga se provede više eksperimenata kako bi se odabrala optimalna metoda.



**Slika 12.** - Maseni spektrometar (SCIEX - Triple TOF 6600+) uparen s tekućinskom kromatografijom (SCIEX – ExionLC)



## 5. Materijali i metode

U ovom radu koristili su se svi reagensi LCMS građe tj. ultra čisti reagensi namijenjeni za masenu spektrometriju.

### 5.1. Kemikalije i potrošni materijal

Za potrebe ovog rada korištene su sljedeće kemikalije:

- Metanol (>99,9% )
- Natrijeva lužina-2,5 M
- Klorovodična kiselina – 2,5 M
- Acetonitril (>99,9%)
- Ultra čista voda - miliQ

Potrošni materijal:

- Falcon tube (Falcon, 15 mL i 50 mL)
- Eppendorf tube (3 mL)
- Nastavci za automatske mikropipete (Eppendorf)
- Vial (Phenomenex, 1,5 mL)
- Šprice (Fisher, 3 mL)
- Filteri za šprice (Whatman paradisc 4, PTFE, Politetrafluoretilen membrana- širine pora 0,2  $\mu\text{m}$ )
- Kromatografska kolona (Kinetex 2,6  $\mu\text{m}$ , C18, 100 A, 100 \* 2,1 mm)
- Čaše (Simax)

Korišteni uređaji:

- Automatske mikropipete (Eppendorf)
- Vortex mixer (Velp Scientifica)
- Centrifuga (Biofuge - Heraeus)

- Analitička vaga
- Vodena kupelj
- Sistem za pročišćavanje vode – miliQ (Labena - ELGA)
- Maseni spektrometar (SCIEX - Triple TOF 6600+)
- HPLC uređaj (SCIEX - ExionLC)

## 5.2. Metode

### 5.2.1. Uzorkovanje i priprema uzoraka za analizu

Za analizu je pripremljeno 11 uzoraka tkiva školjkaša koji su prikupljeni u Neumu, u rasponu od svibnja 2018. do siječnja 2019. godine. Tablica 1.prikazuje odvage i datume prikupljanja uzoraka.

**Tablica 1.** - Uzorci za analizu

Broj uzorka	Datum prikupljanja uzorka	Izvagana masa uzorka
1.	9. travnja 2018.	2,0000 g
2.	21. svibnja 2018.	2,0005 g
3.	3. lipnja 2018.	1,9999 g
4.	8. srpnja 2018.	2,0001 g
5.	27. srpnja 2018.	2,0005 g
6.	4. kolovoza 2018.	2,0009 g
7.	25. kolovoza 2018.	2,0004 g
8.	9. rujna 2018.	2,0008 g
9.	21. listopada 2018.	1,9998 g
10.	26. studenog 2018.	2,0003 g
11.	24. siječnja 2019.	2,0001 g

Iz svakog uzorka je prebačeno približno 2,0000 g homogeniziranog tkiva u Falcon tubu (50mL) zajedno s 9 mL metanola. Tako pripremljeni uzorci su vorteksirani 3 minute te centrifugirani 10 minuta na 4750 okretaja po minuti. Završetkom postupka centrifugiranja, čisti supernatanti su odvojeni od taloga u nove Falcon tube (50 mL). S talozima je ponovljen ranije navedeni postupak te su svi dobiveni supernatanti prikupljeni zajedno. U Falcon tube je dodana potrebna količina metanola kako bi se korigirao volumen do 20 mililitara. U vialice su se profiltrirali uzorci korištenjem šprica na koje su stavljeni PTFE filteri kako bi se uklonili komadići tkiva ako su preostali u uzorku. Ovaj korak je važan kako bi se spriječilo začepljenje analitičke kolone tijekom kromatografske metode.

Od svakog supernatanta su mikropipetom uzeta 2,5 mL i prebačena u Falcon tube (15 mL) kako bi se hidrolizirali. U svaki uzorak dodano je 313  $\mu$ L natrijeve lužine, koncentracije 2,5 M. Falcon tube su stavljene u prethodno zagrijanu vodenu kupelj na 76 °C. Nakon 40-minutnog tempiranja i na navedenoj temperaturi tretirani uzorci su ohlađeni na sobnu temperaturu. U svaku tubu je dodano 313  $\mu$ L klorovodične kiseline, koncentracije 2,5 M. Uzorci su centrifugirani 60 sekundi, kako bi se mogući preostali talog odvojio od supernatanta. Hidrolizirani uzorci su preneseni u vialice za daljnju analizu. Pripremljeni uzorci su ekstrahirani, ali nisu analizirani.

## 5.2.2. Tekućinska kromatografija spregnuta masenom spektrometrijom

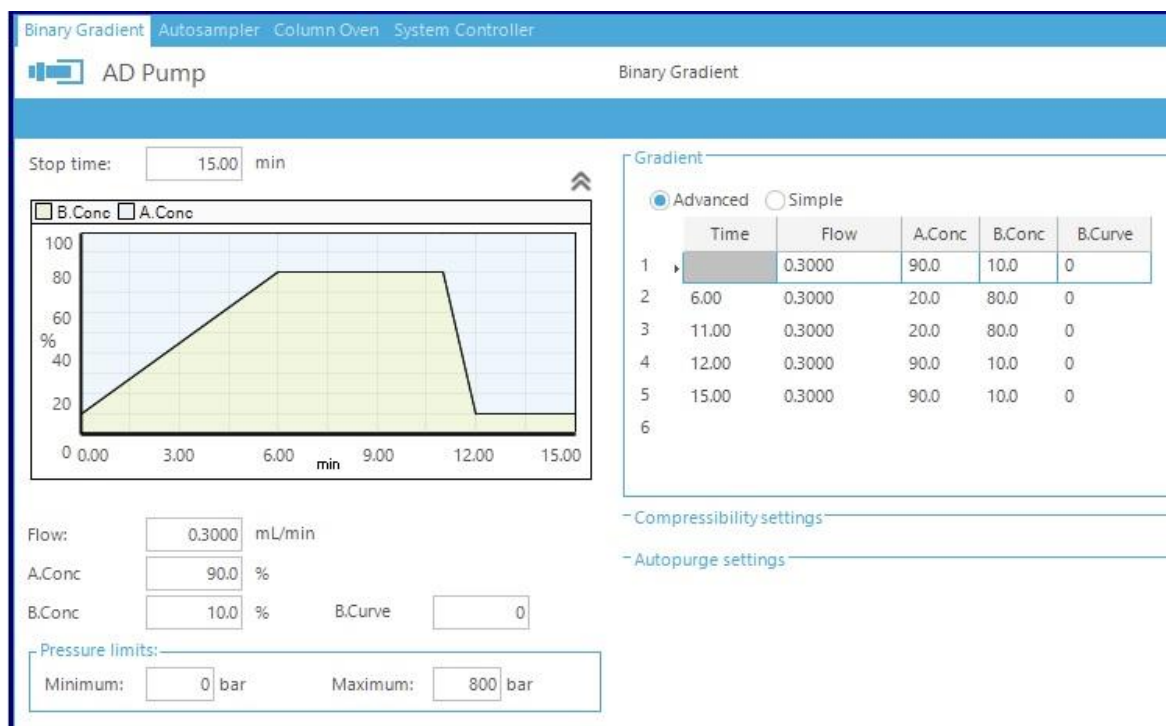
Parametri metode za masenu spektrometriju su podešeni kako je prikazano u Tablici 2. Pogodan način rada instrumenta za analizu traženih lipofilnih toksina je pozitivni način. Masenom spektrometru se način rada prilagođava prema tipu uzorka kojeg se analizira pa on može biti pozitivan ili negativan. U ovom slučaju, traženi lipofilni toksini se protoniraju u primijenjenim eksperimentalnim uvjetima zbog čega je postavljen pozitivni način rada.

**Tablica 2.** - Parametri metode

Postavke parametara	
Source/Gas (Izvor/Plin)	Vrijednosti
Ion Source Gas 1 (GS1)	40
Ion Source Gas 2 (GS2)	50
Curtain Gas (CUR)	30

Temperature (TEM)	425.0
IonSpray Voltage Floating (ISVF)	5500.0
Compound	Vrijednosti
Declustering Potential (DP)	80.0
Collision Energy (CE)	50.0
Collision Energy Spread (CES)	10.0
Ion Release Delay (IRD)	66
Ion Release Width (IRW)	24

Za kromatografsku metodu korištena je gradijentna kromatografija s dva otapala. Kao otapalo A je korištena voda, a kao otapalo B acetonitril. S obzirom da se radi o analizi u pozitivnom načinu rada instrumenta, u oba otapala dodano je 0,1% mravlje kiseline. Korištena je kolona Kinetex širine 2.6  $\mu\text{m}$ . Primijenjena metoda je grafički prikazana na Slici 13.



**Slika 13.** - Gradijent otapala kroz kromatografsku metodu uz protok od 0,3000 mL/min

## 6. Rezultati i rasprava

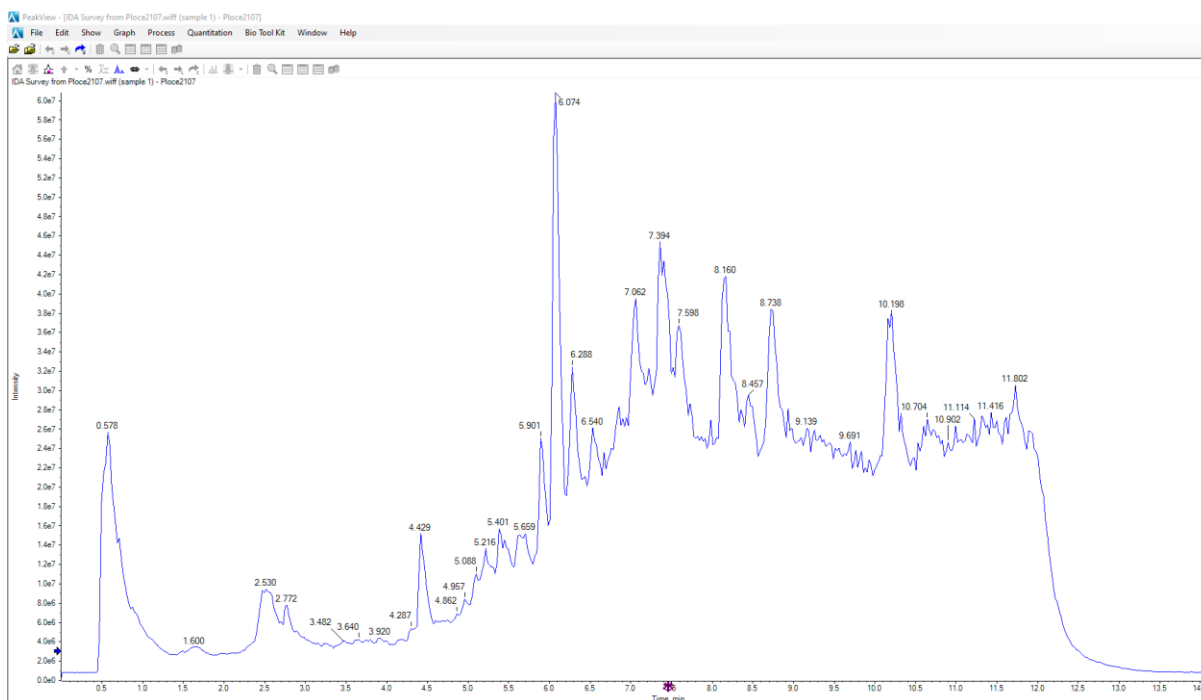
### 6.1. Rezultati

Za potrebe ovog rada analiziran je uzorak prikupljen u Pločama, 21. srpnja 2021. godine.

U uzorku je pronađen toksin iz skupine cikličkih imina, gimnodimin (GYM).

Rezultati su prikazani u obliku tri vrste grafičkih prikaza: *Total ion chromatogram* (TIC), *Extracted ion chromatogram* (XIC) i maseni spektar fragmentacije pojedinih iona. TIC i maseni spektar fragmentacije iona su prikazani za standard i za analizirani uzorak.

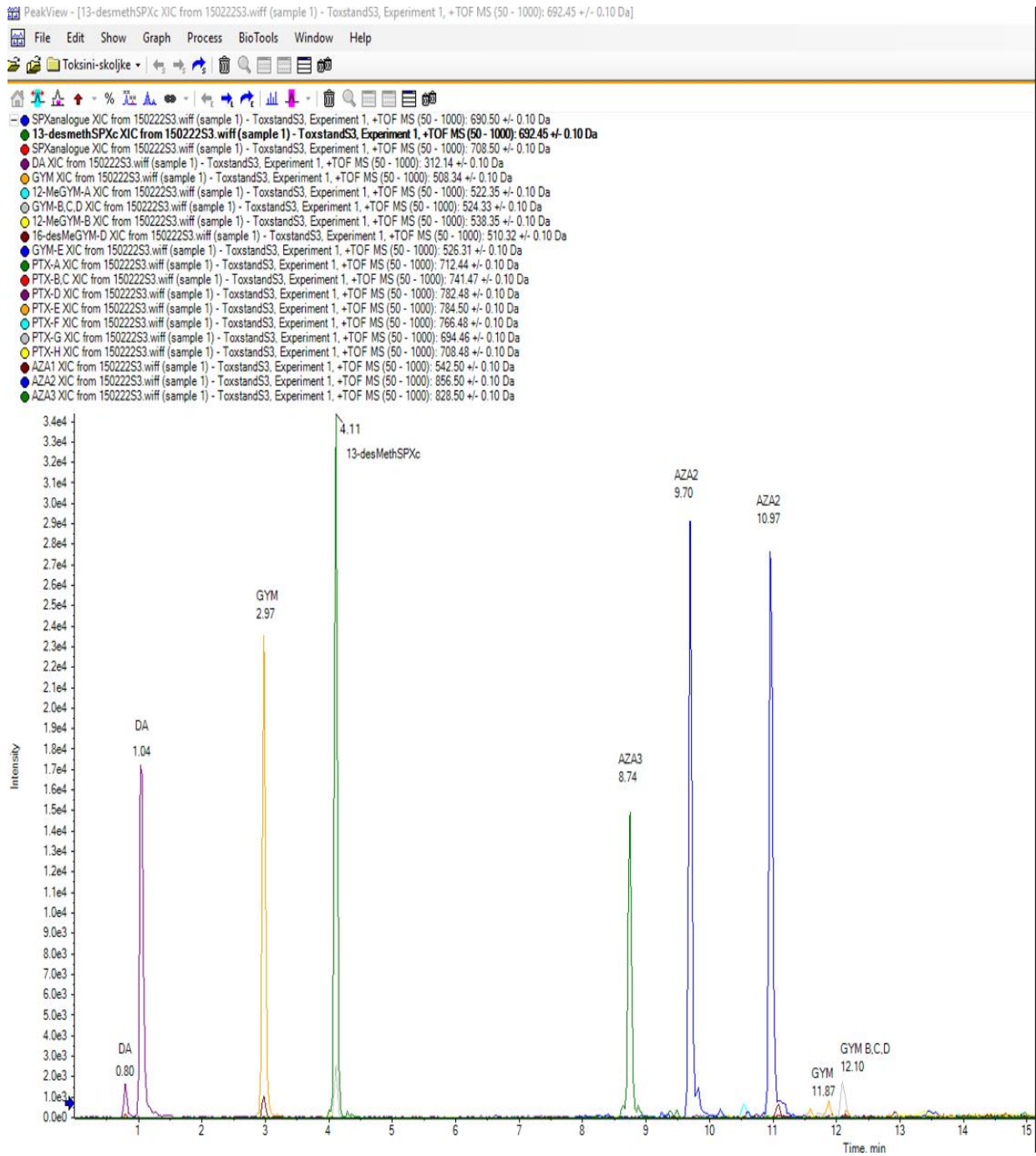
#### 6.1.1. Total ion chromatogram



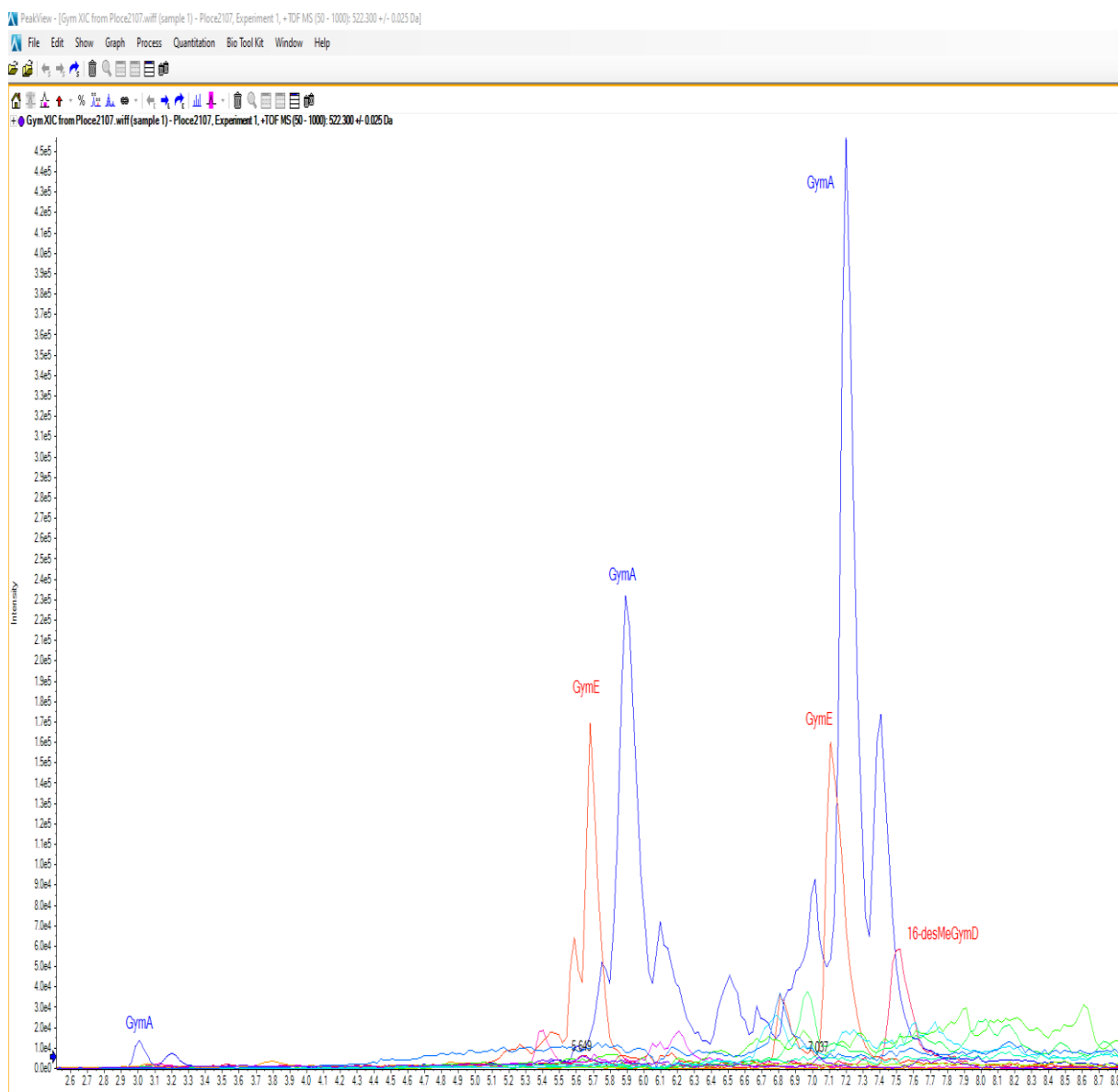
**Slika 14.**– *Total ion chromatogram* uzorka prikupljenog 21. srpnja 2021. mjesto Ploče

Analizom uzorka Ploče, dobiven je sljedeći grafički prikaz na Slici 14. TIC prikazuje odziv svih iona prisutnih u uzorku. Kako bi se otkrilo o kojim se toksinima radi, napravljen je XIC (*extracted ion chromatogram*) za potencijalno prisutne toksine u uzorku te je uspoređen sa standardom.

## 6.1.2. Extracted ion chromatogram



Slika 15.—Extracted ion chromatogram standarda toksina

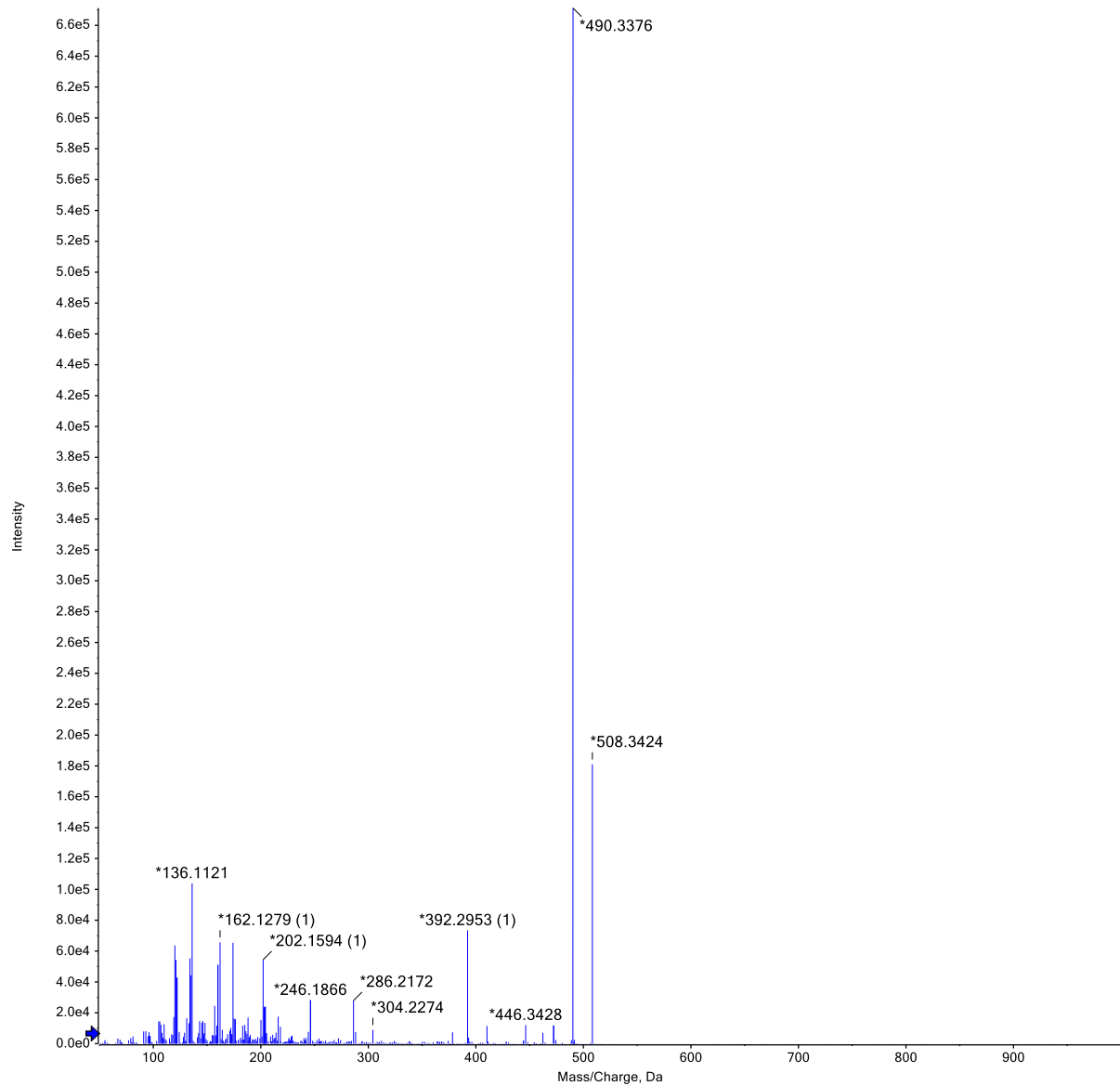


**Slika 16.**—*Extracted ion chromatogram* uzorka Ploče, 21. srpnja 2021.

XIC je ukazao na postojanje iona odgovarajućeg omjera  $m/z$  za GymA, GymE i 16-desMeGymD. Usporedbom uzorka (Slika 16.) sa standardom (Slika 15.) za određene toksine može se jasno utvrditi da samo pik s retencijskim vremenom 2.97 min u uzorku odgovara retencijskom vremenu standarda GymA. Ostala retencijska vremena ne odgovaraju standardima pa je provjerena i fragmentacija iona u svim pikovima.

### 6.1.3. Maseni spektar fragmentacije gimnodimina A

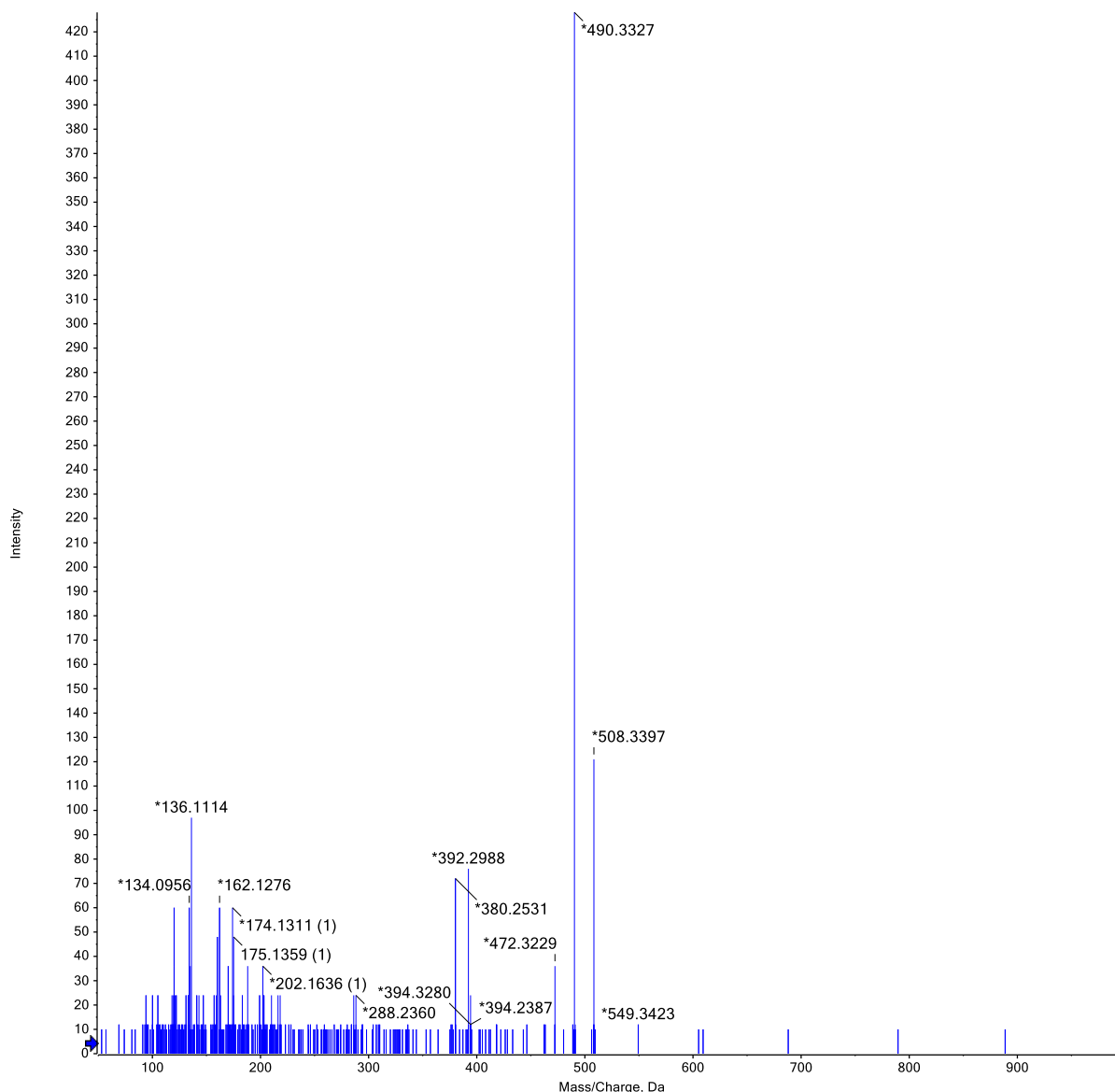
Spectrum from GymStandard.wiff (sample 2) - GymStan, Experiment 3, +TOF MS<sup>2</sup> (50 - 1000) from 3.011 min  
Precursor: 508.3 Da, CE: 50.0



Slika 17. - Fragmentacija standarda gimnodimina A



Spectrum from Ploce210721.wiff (sample 1) - Ploce210721, Experiment 7, +TOF MS\*2 (50 - 1000) from 3.308 min  
Precursor: 508.3 Da, CE: 50.0



**Slika 18.** - Fragmentacija gymnodimina A pronađenog u uzorku Ploče 21. srpnja 2021. s retencijskim vremenom 3.308 min.

Fragmentacijom standarda za GymA (Slika 17.) i uzorka (Slika 18.) pokazano je da nastaju identični fragmenti što dokazuje postojanje toksina u uzorku koji ima isto retencijsko vrijeme kao i standard. Fragmenti spojeva s istim  $m/z$  kao GymA, koji se pojavljuju u različitim retencijskim vremenima, ne odgovaraju fragmentima standarda pa su tako detektirani spojevi lažno pozitivni odnosno ne predstavljaju tražene spojeve.

## 6.2. Rasprava

Dosadašnji monitoring fitoplanktonskih toksina u Jadranskom moru pokazao je najčešće pojavljivanje toksina iz skupine jesotoksina i cikličkih imina. Zbog te činjenice se metoda za analizu mogla postaviti ciljano. Rad je napravljen kako bi se istražili mogući novi ili već postojeći toksini. Rezultati eksperimenta su u skladu s očekivanjima jer su pronađeni samo gimnodimini, toksini iz skupine cikličkih imina.

Iako situacija u Jadranu nije alarmantna, ne znači da se neće promijeniti. U današnje vrijeme velikih klimatskih promjena i zagađenja mora, dolazi do pojave toksina i na područjima gdje ih nikad do sad nije bilo. Problem je što se u tim područjima monitoring ne provodi redovito. Nedovoljno znanja o toksinima stvara dodatne poteškoće. Iako nema dokaza o toksičnosti gimnodimina za ljude, ne znači da oni ne mogu izazivati trovanja u budućnosti. Nisu dovoljno istraženi što ostavlja dodatan prostor za nova znanstvena saznanja.

Unatoč svim problemima koje toksini izazivaju, mogu biti izuzetno korisni u farmakološkim istraživanjima. Naime, predstavljaju potencijalne izvore za sintezu novih lijekova i ostavljaju prostor za napredak medicine. Zbog toga se postavlja pitanje koliko su toksini štetni, a koliko korisni i nužni za napredak znanosti.

Uskoro se može očekivati porast i stvaranje novih vrsta toksina. Navedeno treba rezultirati pojačanim monitoringom i proučavanjem mogućih rješenja ovog problema. Razvijanje budućih i poboljšanih metoda detekcije može biti jedno od njih.

## 7. Zaključak

Metoda tekućinske kromatografije spregnute s masenom spektrometrijom pogodna je za određivanje velikog broja toksina. Nakon analize navedenog uzorka prikupljenog u Pločama izrađen je *Total ion chromatogram* (TIC) koji je pokazao odziv svih iona prisutnih u uzorku. Potom je izrađen *Extracted ion chromatogram* (XIC) kako bi se otkrilo koji su to toksini. Prebrojani su svi signali, ali pronađen je samo signal za gimnodimin u niskim koncentracijama. Potvrđena je pretpostavka da se u Jadranskom moru pojavljuju samo toksini iz skupine jesotoksina i cikličkih imina.

Iako se za toksine, zbog specifičnosti njihovog djelovanja, uglavnom veže negativni utjecaj, oni imaju veliki potencijal za daljnja istraživanja i napredak znanosti. Fitoplanktonski toksini su malo istraženi te ostavljaju brojna neodgovorena pitanja koja se daljnjim analizama mogu razjasniti.

## 8. Popis literature

- [1] K. Kvirgić, N. Džafić, and J. Pleadin, “Fikotoksini u morskim organizmima - potencijalna prijetnja sigurnosti potrošača,” *Veterinarska Stanica*, vol. 52, no. 6. Croatian Veterinary Institute, pp. 739–749, 2021. doi: 10.46419/VS.52.6.13.
- [2] C. E. Stivala *et al.*, “Synthesis and biology of cyclic imine toxins, an emerging class of potent, globally distributed marine toxins,” *Natural Product Reports*, vol. 32, no. 3. Royal Society of Chemistry, pp. 411–435, Mar. 01, 2015. doi: 10.1039/c4np00089g.
- [3] N. Vilariño *et al.*, “Human poisoning from marine toxins: Unknowns for optimal consumer protection,” *Toxins*, vol. 10, no. 8. MDPI AG, Aug. 09, 2018. doi: 10.3390/toxins10080324.
- [4] L. M. Botana, “Toxicological Perspective on Climate Change: Aquatic Toxins,” *Chemical Research in Toxicology*, vol. 29, no. 4. American Chemical Society, pp. 619–625, Apr. 18, 2016. doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00020.
- [5] K. A. Martínez Andrade, C. Lauritano, G. Romano, and A. Ianora, “Marine microalgae with anti-cancer properties,” *Marine Drugs*, vol. 16, no. 5. MDPI AG, May 01, 2018. doi: 10.3390/md16050165.
- [6] A. G. Mudadu *et al.*, “Yessotoxin detection in bivalve molluscs: A case study from coastal mussel farms (Sardinia, Italy),” *Ital J Food Saf*, vol. 6, no. 4, pp. 213–216, Jan. 2017, doi: 10.4081/ijfs.2017.7015.
- [7] H. Shen *et al.*, “Profiling of brevetoxin metabolites produced by *karenia brevis* 165 based on liquid chromatography-mass spectrometry,” *Toxins (Basel)*, vol. 13, no. 5, May 2021, doi: 10.3390/toxins13050354.
- [8] J. Kilcoyne *et al.*, “Improved Isolation Procedures for Okadaic Acid Group Toxins from Shellfish (*Mytilus edulis*) and Microalgae (*Prorocentrum lima*),” *Mar Drugs*, vol. 18, no. 12, Dec. 2020, doi: 10.3390/MD18120647.
- [9] D. Jiménez-Cárcamo, C. García, and H. R. Contreras, “Toxins of okadaic acid-group increase malignant properties in cells of colon cancer,” *Toxins (Basel)*, vol. 12, no. 3, 2020, doi: 10.3390/toxins12030179.

- [10] J. Blanco, C. Mariño, H. Martín, G. Álvarez, and A. E. Rossignoli, “Article characterization of the domoic acid uptake mechanism of the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) digestive gland,” *Toxins (Basel)*, vol. 13, no. 7, Jul. 2021, doi: 10.3390/toxins13070458.
- [11] M. A. Akbar *et al.*, “Biosynthesis of saxitoxin in marine dinoflagellates: An omics perspective,” *Marine Drugs*, vol. 18, no. 2. MDPI AG, Feb. 05, 2020. doi: 10.3390/md18020103.
- [12] K. D. Cusick and G. S. Sayler, “An overview on the marine neurotoxin, saxitoxin: Genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions,” *Marine Drugs*, vol. 11, no. 4. MDPI AG, pp. 991–1018, 2013. doi: 10.3390/md11040991.
- [13] C. Zurhelle, J. Nieva, U. Tillmann, T. Harder, B. Krock, and J. Tebben, “Identification of novel gymnodimines and spirolides from the marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*,” *Mar Drugs*, vol. 16, no. 11, Nov. 2018, doi: 10.3390/md16110446.
- [14] T. Pasinszki, J. Lako, and T. E. Dennis, “Advances in detecting ciguatoxins in fish,” *Toxins*, vol. 12, no. 8. MDPI AG, Aug. 01, 2020. doi: 10.3390/toxins12080494.
- [15] M. Twiner, “Azaspiracid Shellfish Poisoning: A Review on the Chemistry, Ecology, and Toxicology with an Emphasis on Human Health Impacts,” *Mar Drugs*, vol. 6, no. 2, pp. 39–72, Jun. 2008, doi: 10.3390/md20080004.
- [16] J. Greaves and J. Roboz, “Mass Spectrometry for the Novice.”
- [17] J. Guo and T. Huan, “Comparison of Full-Scan, Data-Dependent, and Data-Independent Acquisition Modes in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Based Untargeted Metabolomics,” *Anal Chem*, vol. 92, no. 12, pp. 8072–8080, Jun. 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.9b05135.
- [18] “Data-dependent vs. Data-independent Proteomic Analysis | Technology Networks.” <https://www.technologynetworks.com/proteomics/lists/data-dependent-vs-data-independent-proteomic-analysis-331712> (accessed Sep. 19, 2022).
- [19] “Liquid Chromatography - Chemistry LibreTexts.” [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Analytical\\_Chemistry\)/Instrumental\\_Analysis/Chromatography/Liquid\\_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Liquid_Chromatography) (accessed Sep. 15, 2022).

## Popis skraćenica

APCI – Kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (*engl. Atmospheric pressure chemical ionisation*)

API – Ionizacija pri atmosferskom tlaku (*engl. Atmospheric pressure ionisation*)

ASP – Amnezijsko trovanje školjkašima (*engl. Amnesic shellfish poisoning*)

ATP – Adenozin trifosfat (*engl. Adenosine triphosphate*)

AZA – Azaspiracid (*engl. Azaspiracid*)

AZP – Trovanje azaspiracidima (*engl. Azaspiracid poisoning*)

BTX – Brevetoksin (*engl. Brevetoxin*)

CFP – Trovanje ribom Ciguatera (*engl. Ciguatera fish poisoning*)

CI – Kemijska ionizacija (*engl. Chemical ionisation*)

CI – Ciklički imini (*engl. Cyclic imine*)

CTX – Ciguatoksin (*engl. Ciguatoxin*)

DA – Domoična kiselina (*engl. Domoic acid*)

DDA – Prikupljanje ovisno o podacima (*engl. Data dependent acquisition*)

DIA – Prikupljanje neovisno o podacima (*engl. Data independent acquisition*)

DSP - Dijaretično trovanje školjkašima (*engl. Diarrheic shellfish poisoning*)

EI – Elektronska ionizacija (*engl. Electron ionisation*)

ESI – Elektrosprej ionizacija (*engl. Electrospray ionisation*)

FT – Fourierova transformacija (*engl. Fourier transformation*)

HPLC – Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*engl. High-performance liquid chromatography*)

IDA – Prikupljanje ovisno o informacijama (*engl. Information dependent acquisition*)

kD - kilodalton

LC – Tekućinska kromatografija (*engl. Liquid chromatography*)

LC-MS – Tekućinska kromatografija spregnuta masenom spektrometrijom (*engl. Liquid chromatography – Mass spectrometry*)

MALDI – Laserska desorpcija/ionizacija uz pomoć matrice (*engl. Matrix-assisted laser desorption/ionisation*)

MRM – Praćenje višestrukih reakcija (*engl. Multiple reaction monitoring*)

NSP – Neurotoksično trovanje školjkašima (*engl. Neurotoxic shellfish poisoning*)

OA – Okadaična kiselina (*engl. Okadaic acid*)

PSP – Paralitičko trovanje školjkašima (*engl. Paralytic shellfish poisoning*)

PTFE – Politetrafluoretilen

STX – Saksitoksin (*engl. Saxitoxin*)

TIC – Ukupni ionski kromatogram (*engl. Total ion chromatogram*)

TOF – Vrijeme leta (*engl. Time-of-flight*)

XIC – Ekstrahirani ionski kromatogram (*engl. Extracted ion chromatogram*)

YTX – Jesotoksin (*engl. Yessotoxin*)

## Popis slika

<b>Slika 1.</b> - Kemijska struktura jesotoksina.....	3
<b>Slika 2.</b> - Kemijska struktura brevetoksina A.....	4
<b>Slika 3.</b> - Kemijska struktura brevetoksina B.....	4
<b>Slika 4.</b> - Kemijska struktura okadaične kiseline.....	5
<b>Slika 5.</b> - Kemijska struktura domoične kiseline.....	5
<b>Slika 6.</b> - Kemijska struktura saksitoksina.....	6
<b>Slika 7.</b> - Kemijska struktura gimnodimina A.....	7
<b>Slika 8.</b> - Kemijska struktura ciguatoksina.....	7
<b>Slika 9.</b> - Kemijska struktura azaspiracida1.....	8
<b>Slika 10.</b> – Shema rada masenog spektrometra.....	9
<b>Slika 11.</b> - Maseni spektar.....	10
<b>Slika 12.</b> - Maseni spektrometar (SCIEX - Triple TOF 6600+) uparen s tekućinskom kromatografijom (SCIEX – ExionLC).....	16
<b>Slika 13.</b> - Gradijent otapala kroz kromatografsku metodu uz protok od 0,3000 mL/min.....	20
<b>Slika 14.</b> – <i>Total ion chromatogram</i> uzorka prikupljenog 21. srpnja 2021. mjesto Ploče.....	21
<b>Slika 15.</b> – <i>Extracted ion chromatogram</i> standarda toksina.....	22
<b>Slika 16.</b> – <i>Extracted ion chromatogram</i> uzorka Ploče, 21. srpnja 2021.....	23
<b>Slika 17.</b> - Fragmentacija standarda gimnodimina A.....	24
<b>Slika 18.</b> - Fragmentacija gimnodimina A pronađenog u uzorku Ploče 21. srpnja 2021. s retencijskim vremenom 3.308 min. ....	25



## Popis tablica

**Tablica 1.** - Uzorci za analizu.....18

**Tablica 2.** - Parametri metode .....19