



LABORATORIO NAZIONALE DI REFERENZA  
PER LE BIOTOSSINE MARINE

---

***APPROCCIO ANALITICO  
PER LA RILEVAZIONE  
DELLE PALITOSSINE***

Anna Milandri  
Silvia Pigozzi  
Elena Riccardi

**CORSO APAT**

**Cesenatico, 15 - 18 maggio 2007**

# METODI DI ANALISI

---

C'è l'esigenza di metodi d'analisi molto sensibili e specifici sia per **rilevare ed identificare** la palitossina ed analoghi dalle altre tossine marine, sia per **monitorare** la tossina in fase di purificazione dagli stessi organismi produttori.

E' spesso necessario utilizzare  
una combinazione di metodi !!!

## METODI BIOLOGICI

Proprietà funzionali  
o sulle attività biologiche  
delle palitossine

## METODI CHIMICI

Proprietà chimico-fisiche  
o sulle caratteristiche  
della molecola  
della palitossina

# METODI BIOLOGICI

---

\* il **biosaggio sul topo** (è il metodo più semplice).

## LIMITI

**Aspecificità:**  
fornisce scarse  
indicazioni sulla  
natura dei  
composti tossici

**Scarsa  
sensibilità**

**Variabilità nel  
rapporto  
dose/risposta  
dell'animale**

\* il **test emolitico** (molto utile per rilevare le patitossine).

Si basa sul fatto che questi composti sono potenti emolisine con una particolarità: l'emolisi **si manifesta lentamente** e può essere determinata soltanto a partire da periodi di incubazione di 4 h a 37 °C).

# PROPRIETA' CHIMICO-FISICHE

---

## *SOLUBILITA'*

### *NON SOLUBILE*

- cloroformio
- etere
- acetone

### *SOLUBILE*

- acqua
- metanolo
- etanolo
- piridina
- dimetilsolfossido

Grazie alla solubilità delle palitossine in acqua o in solventi miscibili con acqua, **metanolo** ed **etanolo** sono stati comunemente usati per l'estrazione di queste tossine

1971

Per il primo caso di isolamento e purificazione della palitossina da *Palythoa toxica* furono utilizzati (Moore *et al.*, 1971)

⊗ **EtOH 70% a temperatura ambiente** per l'estrazione

⊗ evaporazione dell'alcool

⊗ delipidizzazione dell'estratto con benzene e butanolo

⊗ allontanamento del sale

⊗ purificazione per mezzo della cromatografia a scambio ionico.

1993

Successivamente nel tentativo di isolare omologhi della palitossina da *Lophozozymus pictor* altri ricercatori (Lau *et al.*, 1993) utilizzarono

⊗ **un'estrazione acquosa a caldo**

(poiché le vittime di avvelenamento da granchi avevano consumato una zuppa di questi granchi).

Anche se la tossina sembra piuttosto resistente alla bollitura, **l'estrazione con metanolo/etanolo acquoso** invece dell'acqua a caldo dà migliori risultati ed un aumento dell'attività specifica.

# Metodi da letteratura

---

Metodo di Rhodes *et al.*, 2002

**Estrazione della tossina da molluschi alimentati con  
*Ostreopsis siamensis* (da coltura):**

@ con MeOH : H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>COOH (50 : 50 : 0,2)

(5 mL/g di tessuto)

## Metodi da letteratura

---

Metodo di Taniyama *et al.*, 2003

su *Ostreopsis* sp. e *Scarus ovifrons*

### Estrazione della tossina:

- ③ 3 volte con **EtOH 75% a pH 3.5 (3 mL /g di tessuto)**
- ③ sonicazione per 5'
- ③ evaporazione del MeOH
- ③ **delipidizzazione con equal volume di etere etilico**
- ③ evaporazione dello strato acquoso risultante
- ③ e **ripartizione fra H<sub>2</sub>O e BuOH** (liquido/liquido)
- ③ evaporazione di ciascuna fase ottenuta
- ③ residuo → 10 mL con H<sub>2</sub>O (sottoposto ai test biochimici)

## Metodi da letteratura

---

Metodo di Lenoir *et al.*, 2004

**Estrazione della tossina da *Ostreopsis mascarenensis* (bloom):**

Ⓜ **con MeOH e MeOH : H<sub>2</sub>O (80 : 20)**

Ⓜ sonicazione, centrifugazione ed evaporazione

Ⓜ MeOH 80%

Ⓜ **delipidizzazione con esano**

Ⓜ evaporazione del MeOH 80%

Ⓜ risospensione in MeOH 30%

Ⓜ **ripartizione con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>**

Ⓜ evaporazione dell'estratto acquoso

Ⓜ risospensione in H<sub>2</sub>O

Ⓜ **ripartizione in BuOH**

**ogni frazione analizzata**

# TEST BIOLOGICO SU TOPO

per la ricerca di PTX ed analoghi in organismi marini

(modificato da Rhodes *et al.*, 2002; Taniyama *et al.*, 2003; Lenoir *et al.*, 2004)

## 1. ESTRAZIONE

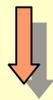
tessuto (wf/hp) estratto con MeOH 50% acidificato con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,2 %

$\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{COOH}$  (50 : 50 : 0,2)



Ⓢ per 2 min in ULTRATURRAX

Ⓢ centrifugazione per 10' a 3000 rpm



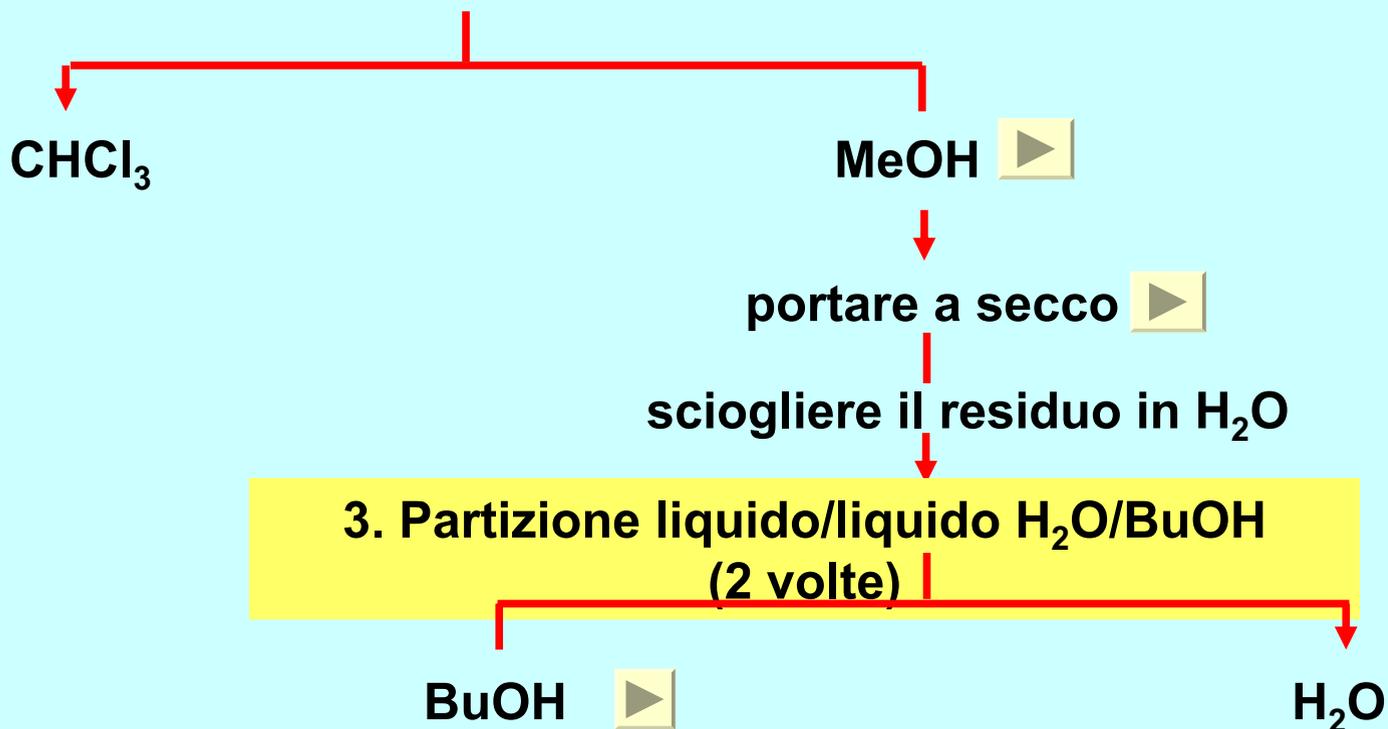
(ripetere altre 2 volte)



Ⓢ l'estratto metanolico è raccolto in imbuto separatore



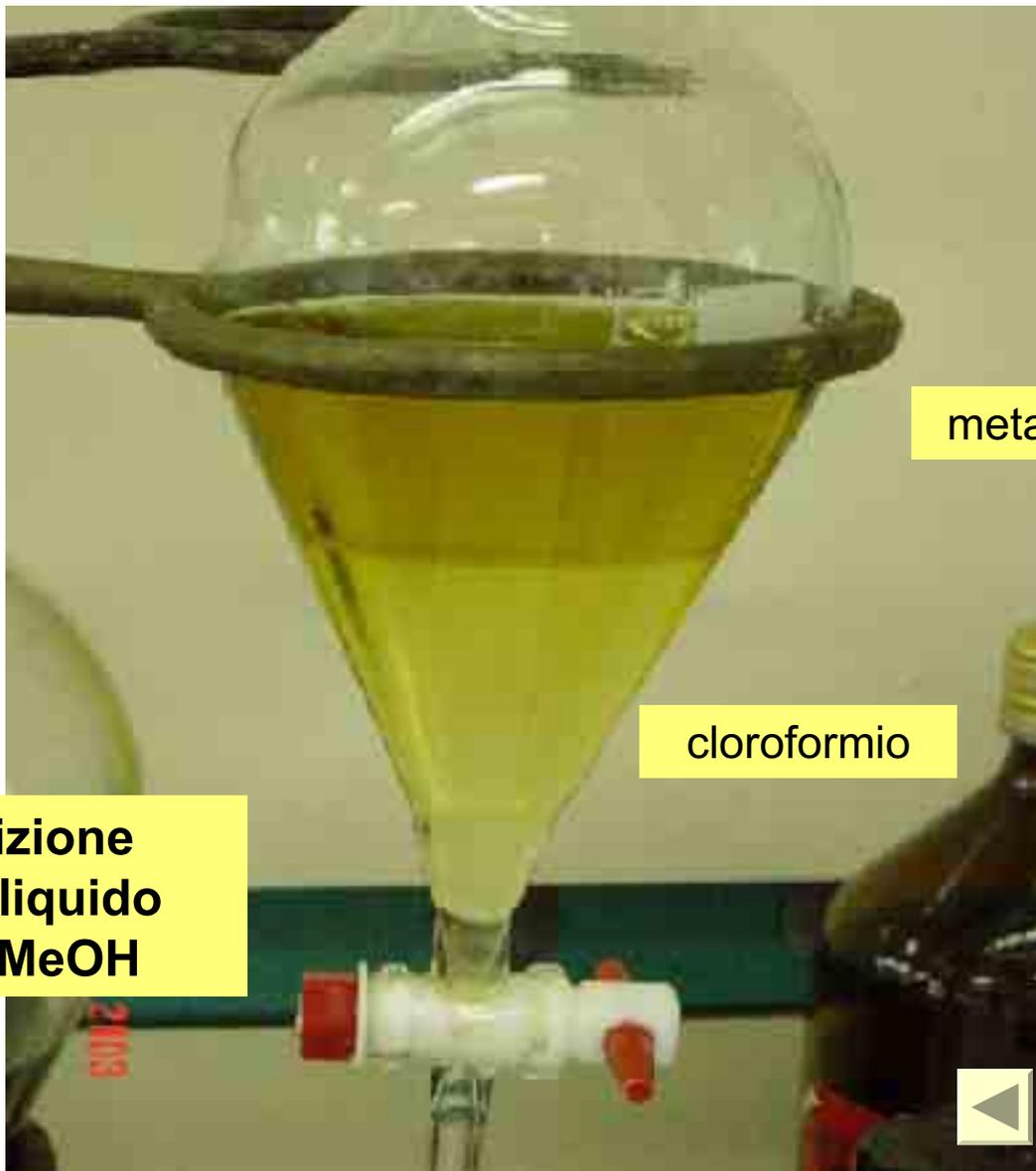
## 2. Partizione liquido-liquido estratto metanolico e cloroformio



aliquote di 0,5/1 mL di soluzione vengono somministrati per via intraperitoneale a 2/3 topi di peso 18-22 g.

Un campione di controllo ("bianco") deve essere analizzato con il medesimo protocollo.





metanolo

cloroformio

**Ripartizione  
liquido/liquido  
 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$**





Evaporazione  
dell'estratto  
metanolico ◀

# Ripartizione acqua/butanolo

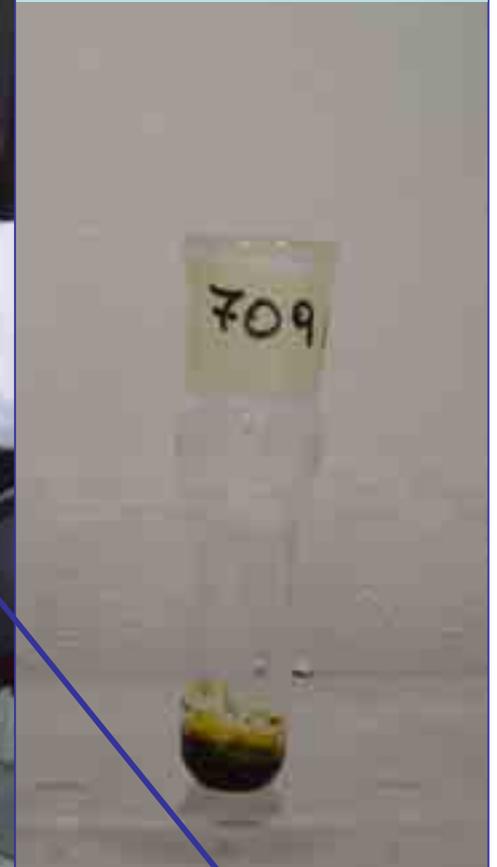


butanolo

acqua



**Risospensione del  
residuo in Tween  
60 all'1%**



**Evaporazione del  
butanolo**



⊗ Gli animali sono tenuti in osservazione per 48 ore, con particolare attenzione alla sintomatologia e alla modalità di morte del topo.

**La sintomatologia è di tipo neurotossico:**

**nei primi minuti dall'iniezione i topi mostrano disorientamento; può seguire un periodo di immobilità (stato comatoso), più o meno lungo, con perdita dell'orientamento e ipotermia.**

**Infine 10 - 15 minuti prima della morte si assiste ad un quadro caratterizzato da spasmi addominali, spasmi muscolari, movimenti bruschi ed incontrollati delle estremità, difficoltà respiratoria, tachicardia**

**(da Riobò *et al.*)**

**Dopo l'iniezione in CD1 (peso 20g) di estratti ottenuti da mitili, echinodermi, *Ostreopsis ovata* (coltura) sono stati osservati:**

⊗ **stiramento e “perdita” degli arti posteriori (primi minuti);**

⊗ **fase di immobilità, con evidente motilità addominale (difficoltà respiratoria, tachicardia)**

⊗ **infine spasmi muscolari**

**CRM 2005, 2006, 2007**

***“Tenori massimi e metodiche di analisi delle biotossine algali nei molluschi bivalvi vivi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini”***

---

**DETERMINAZIONE DI TOSSINE LIPOSOLUBILI  
(AOs, DTXs, PTXs, YTXs e AZAs)  
(Protocollo 1 e Protocollo 2)**

2. *Specificità.* Il metodo rileva tutte le componenti storicamente incluse nel gruppo delle DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning): acido okadaico ed analoghi, dinophysitossine, pectenotossine, yessotossine; tossine liposolubili diarroiche identificate recentemente come azaspiracidi.

Sono inoltre rilevate con lo stesso metodo: brevitossine; gymnodimine, spirolidi, pinnatossine, ciguatossine, **palytossine**, aplysiatossine e lyngyatossine. La presenza di alcune di queste tossine liposolubili, non riferibili all'AOs e DTXs, puo' essere sospettata osservando attentamente i sintomi nel topo dopo iniezione intraperitoneale.

# PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE SU “*Ostreopsis* DAL CAMPO”

(modificato da Rhodes *et al.*, 2002; Riobò *et al.*, 2006; Ciminiello *et al.*, 2006)

## Filtrare/centrifugare il campione

sonicare il *pellett* in MeOH:H<sub>2</sub>O

=1:1 (v/v) (2 volte) ▶

centrifugare → surnatante

lavare il *pellett* con MeOH

(su agitatore) ▶

centrifugare ▶

portare a secco il surnatante totale

risospendere in MeOH 50%

acqua di mare

in MeOH 50%

# PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DA “*Ostreopsis* DAL CAMPO”

(modificato da Rhodes *et al.*, 2002; Riobò *et al.*, 2006; Ciminiello *et al.*, 2006)

**ogni fase metanolica**

ripartizione liquido-liquido con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 volte)

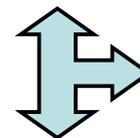
portare a secco l'estratto metanolico

$\text{CH}_2\text{Cl}_2$

risospendere il residuo in  $\text{H}_2\text{O}$   
e lavare con BuOH (2 volte)

Saggio  
emolitico

portare a secco l'estratto butanolico  
e risospendere in MeOH



HPLC-FLD, LC-MS

**MBA**

# PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DA COLTURE DI FITOPLANCTON

(modificato da Rhodes *et al.*, 2002; Riobò *et al.*, 2006; Ciminiello *et al.*, 2006)

Filtrare/centrifugare il campione

mezzo di coltura

(portare a secco)

risospendere il residuo in MeOH

pellett

sonicare in MeOH:H<sub>2</sub>O=1:1 (v/v) (2 volte)

centrifugare (raccogliere la fase metanolica)

estrarre il pellett su agitatore con MeOH

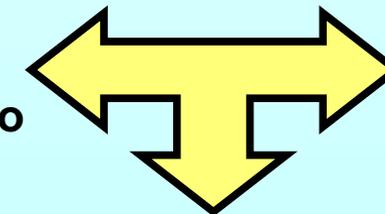
centrifugare

riunire le 2 fasi metanoliche e portare a secco

risospendere il residuo in MeOH

saggio  
emolitico

MBA



HPLC-FLD, LC-MS

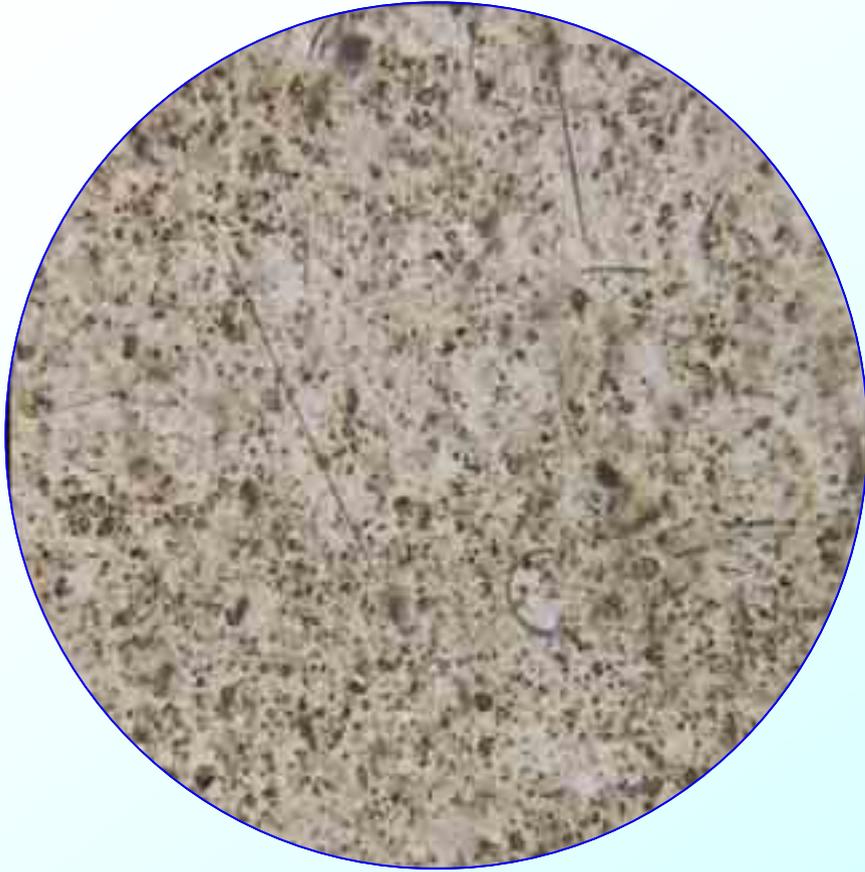




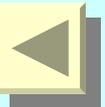
**pellett in MeOH : H<sub>2</sub>O  
(50:50)**



**sonicare per 5'  
in *pulse mode*  
(in bagno freddo)**



**Verificare la rottura  
delle cellule**





Lavaggio del pellett  
con MeOH





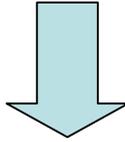
“centrifugato”

estratti metanolici riuniti



**La palitossina ha un effetto CITOTOSSICO  
(cambiamenti morfologici delle cellule fino alla loro rottura)**

---



**non sorprende il fatto che agisca come  
*POTENTE EMOLISINA***

**Diversamente da altre sostanze (ad es. saponina), la palitossina non distrugge direttamente l'integrità della membrana per provocare emolisi.**

**Piuttosto la tossina induce un rilascio "*PRE-LITICO*" di  $K^+$  e richiamo di  $Na^+$ , cui segue l'ingresso di  $H_2O$ .**

**Il rigonfiamento degli eritrociti provoca l'emolisi.**

**La suscettibilità all'emolisi è specie/specifica: i globuli rossi di ratti e maiali sono ad esempio molto sensibili all'emolisi indotta da palitossina.**

**La quantità di emoglobina rilasciata dipende dalla concentrazione della tossina.**

**Su tutto ciò si basa il saggio emolitico:**

**la quantificazione della palitossina in un campione può essere effettuata incubando degli eritrociti col campione e con diverse concentrazioni di standard, cui farà seguito la misura dell'emoglobina rilasciata dagli eritrociti dopo un periodo di tempo stabilito.**

# SAGGIO EMOLITICO (Riobò *et al.*, 2006)

basato sul metodo di Bignami 1993

---

Si utilizzano sangue defibrinato di pecora (1:100) e ouabaina (Gleibs *et al.*, 1995) 1 mM come antagonista: si considerano contenere PTX unicamente quei campioni in cui l'emolisi viene totalmente inibita dall'ouabaina

## •Preparazione del sangue:

Ⓜ lavare il sangue 2 volte, eliminando il sovrantante;

Ⓜ diluire 1:100 in tampone fosfato salino (PBS) a pH 7.4

## •Preparazione del campione:

Ⓜ evaporare l'estratto

Ⓜ risospendere in PBS a pH 7.4 con aggiunta di BSA 0,1%,  $\text{CaCl}_2$  1mM e  $\text{H}_3\text{BO}_3$  1 mM

In micropiastre (96 wells) mescolare (1:1) il campione e le cellule sanguigne.

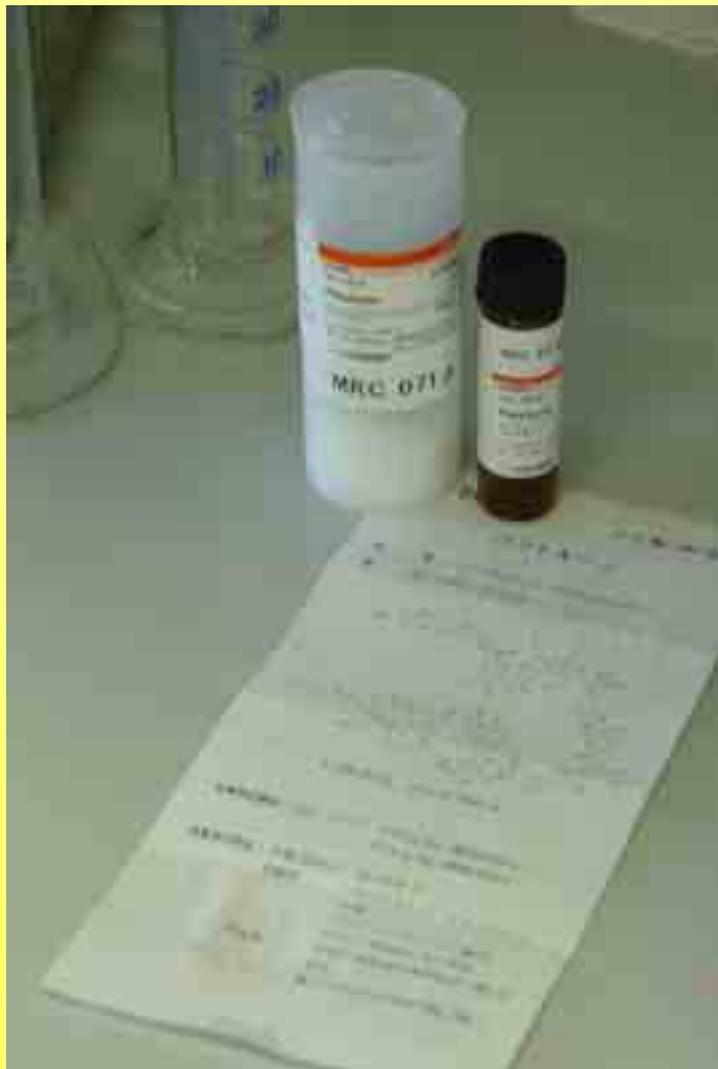
Si prepara anche un bianco, mescolando il sangue diluito e il PBS (1:1).

L'emolisi totale si ottiene aggiungendo  $\text{H}_2\text{O}$  distillata

## TEST di NEUTRALIZZAZIONE

In parallelo si mescolano (1:1) ouabaina e le cellule sanguigne.

Si attendono 30' e si aggiunge la sospensione dei campioni.



**Standard:**

**Palytoxin (*C51-55-hemiacetal*)**

**Origine: *Palythoa tuberculosa* (P-PTX)**

**$C_{129}H_{223}N_3O_{54}$  (MW=2680.14)**

**LD50 = 450 ng/kg**

**1 MU = 9 ng**

**Product n°: 161-15131 (100 µg)**

**T+ *Molto tossico***

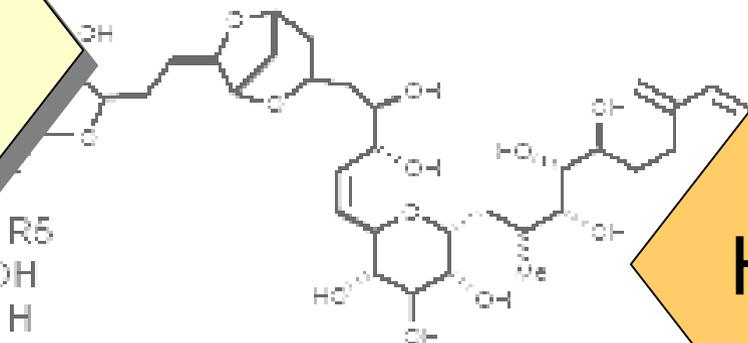
**(per inalazione, contatto con la pelle e  
per ingestione)**

**Wako Chemicals GmbH**

**<http://www.wako-chemicals.de/>**

HPLC-UV  
HPLC-DAD

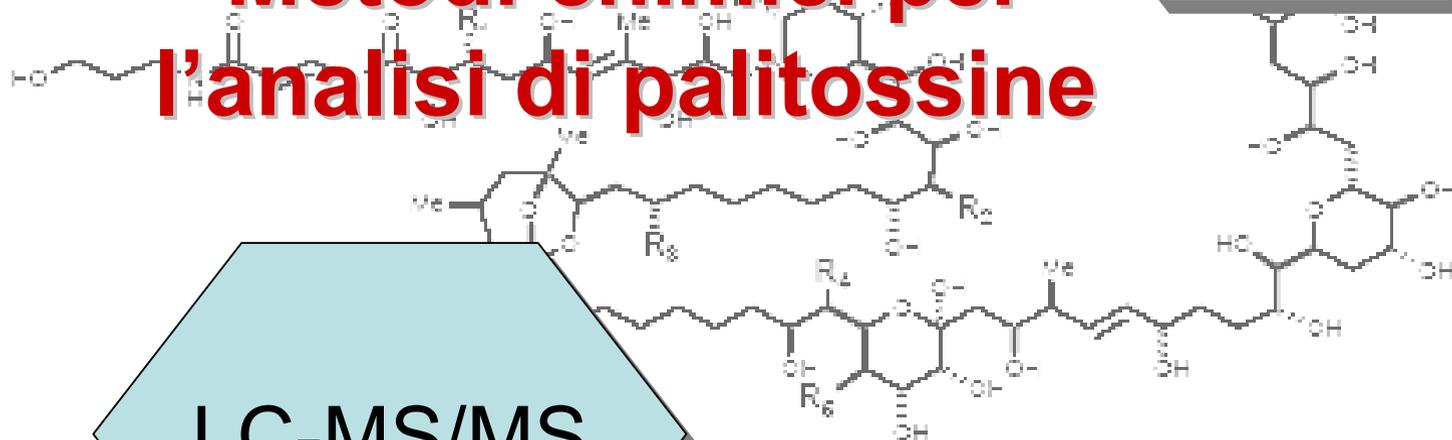
1: Me OH Me H OH  
2: H H H OH H



HPLC-FLD

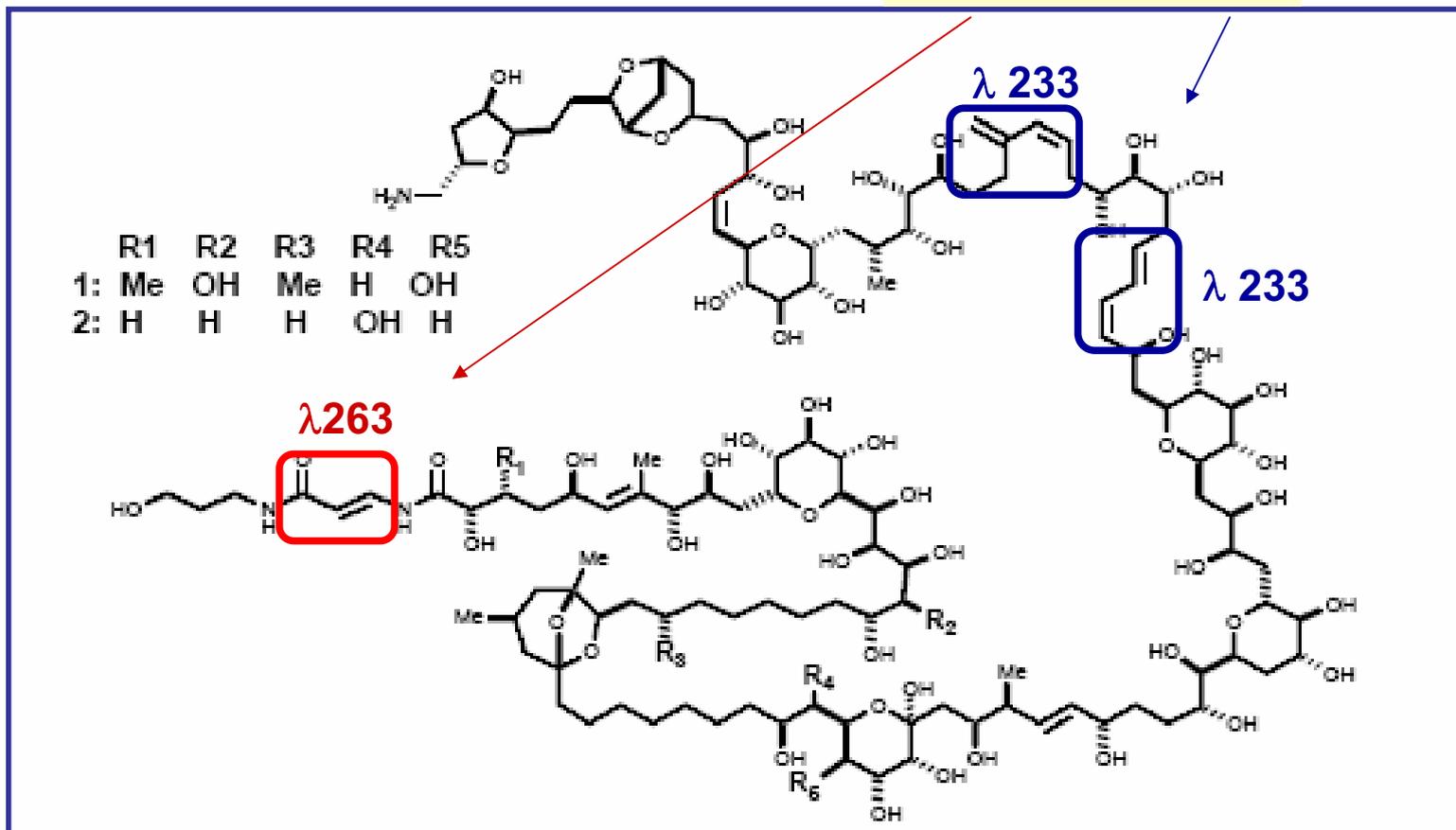
# Metodi chimici per l'analisi di palitossine

LC-MS/MS



# Palitossina

2 picchi di assorbimento (cromofori) in UV



Questo caratteristico profilo di assorbimento UV è uno dei parametri che potrebbero essere utilizzati per verificare la presenza della tossina. Le interferenze presenti nelle matrici biologiche purtroppo diminuiscono notevolmente la sensibilità del metodo.

Onuma *et al.* (1999).

## Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism.

Toxicon 37: 55-65.

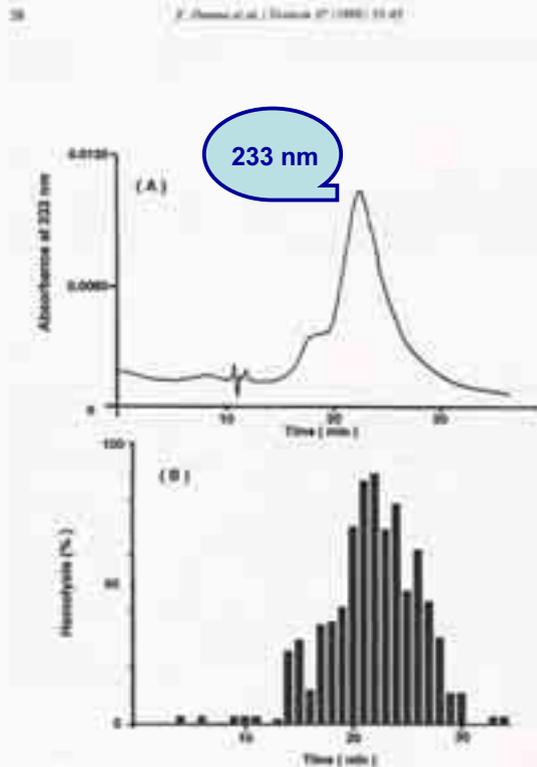


Fig. 1. Comparison of active toxic with palytoxin on HPLC. Chromatography was carried out on a Shodex C80 µm, 300 Å (10) column (Shimadzu, 15 × 250 mm) using 10 mM phosphate buffer (pH 4.4) (0.1M NaCl, 0.1M NaAc) as a mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min. (A) Elution of palytoxin from the column was monitored by UV absorption at 233 nm. (B) Elution of active toxic was monitored by hemolytic activity of each fraction collected in a 1 mL portion. Normally 100% hemolysis was observed in the elution from 10 to 30 min (0.5).

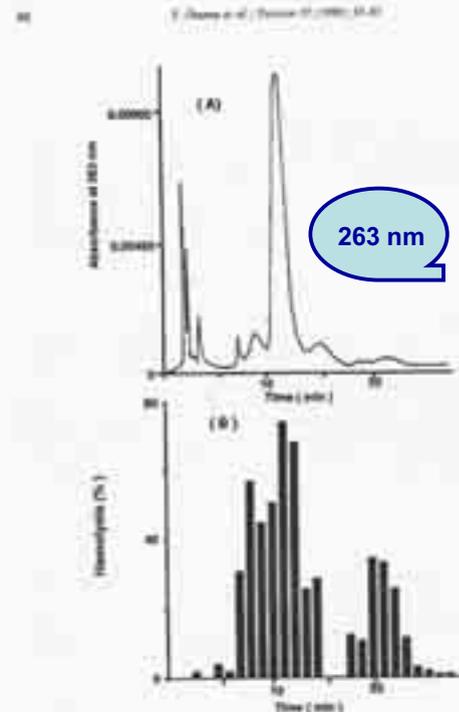


Fig. 1. Comparison of active toxic with palytoxin on HPLC. Chromatography was carried out on a Shodex C80 µm, 300 Å (10) column (Shimadzu, 15 × 250 mm) using 10 mM phosphate buffer (pH 4.4) (0.1M NaCl, 0.1M NaAc) as a mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min. (A) Elution of palytoxin from the column was monitored by UV absorption at 263 nm. (B) Elution of active toxic was monitored by hemolytic activity of each fraction collected in a 1 mL portion. Normally 100% hemolysis was observed in the elution from 10 to 30 min (0.5).

Lenoir *et al.* (2004).

## First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (*Dinophyceae*) benthic bloom in Southwestern Indian Ocean.

J. Phycol. 40: 1042-1051.

BSF (buthanol soluble fraction)

Palytoxin standard

Colonna: Hypersil ODS C18 (250x4.6mm 5µm)  
Rivelatore: Varian Prostar 330 photo-DAD system  
Fase mobile A: acqua acidificata con TFA a pH 2.5  
Fase mobile B: acetonitrile  
Eluizione a gradiente  
Flusso: 1.0 mL/min  
Lunghezza d'onda: 230 nm

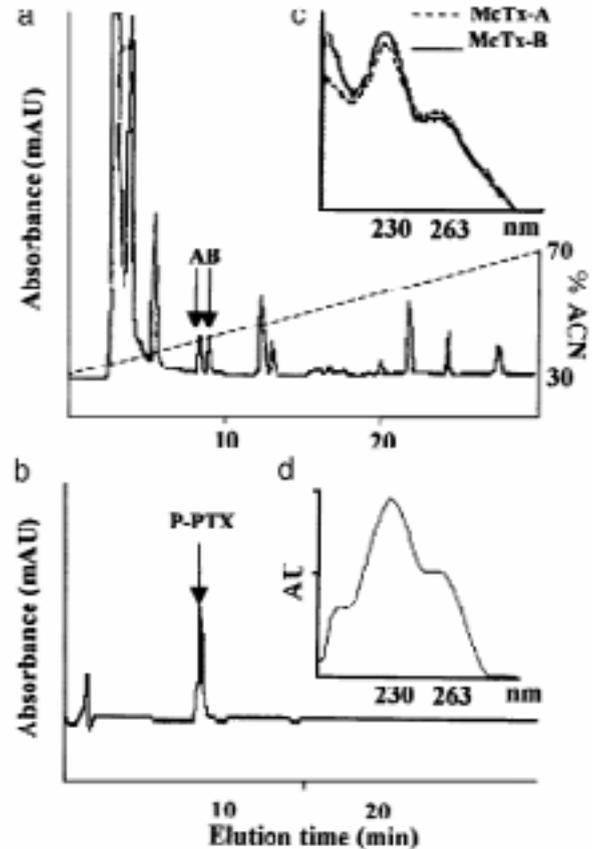


FIG. 5. HPLC-DAD chromatograms monitored at 250 nm of (a) BSF and (b) reference P-PTX (injectal dose, 1.25 µg). Reference P-PTX and McTx-A and -B were eluted at 8.5, 8.3, and 8.8 min, respectively. (c) UV spectra of McTx-A and -B isolated from BSF. (d) UV spectra of reference P-PTX.

Riobò P., Paz B. and Franco J.M. (2006).

## Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection.

Analytica Chimica Acta 566: 217-223.

SPE Cleanup su cartucce  
Oasis Max (Waters) da 3cc

MIXED MODE ANION EXCHANGE

- Condizionamento: 2mL MeOH
- Equilibratura: 2mL H<sub>2</sub>O
- Caricamento: 2mL campione disciolto in H<sub>2</sub>O
- Lavaggio: 2mL 2% NH<sub>4</sub>OH ⇒F1  
2mL MeOH ⇒F2
- Eluizione: 2mL MeOH:5%acido acetico (80:20) ⇒F3



## Derivatizzazione con AccQ Fluor Reagent Kit

- Portare a secco il campione
- Risospendere in 10  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  + 70  $\mu\text{L}$  di AccQ Fluor Borate Buffer
- Agitare energicamente su vortex
- Aggiungere 20  $\mu\text{L}$  di AccQ Fluor Reagent
- Agitare immediatamente su vortex per 20 sec
- Porre su un blocco di riscaldamento a  $50^\circ\text{C}$  per 10 min

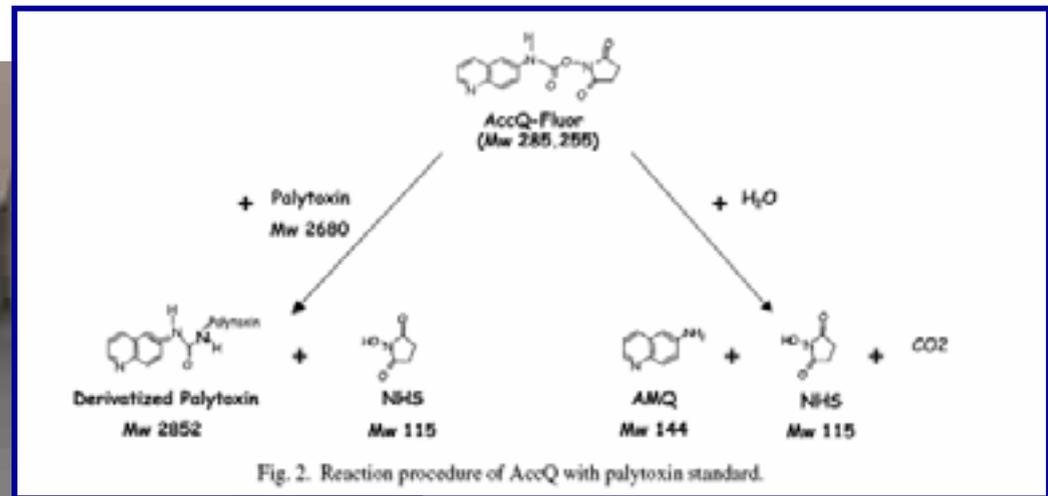
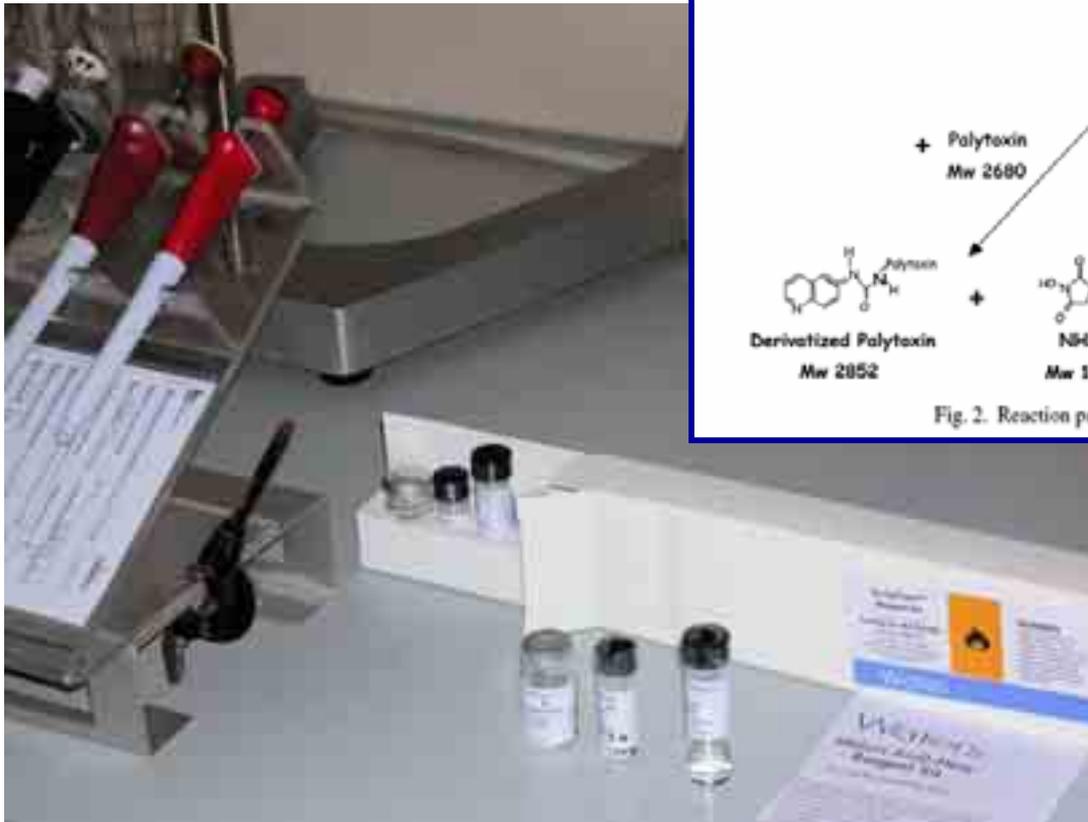


Fig. 2. Reaction procedure of AccQ with palytoxin standard.

AccQ-Fluor



6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate

## Condizioni cromatografiche

LOD 0.75 ng

Colonna: Xterra C18 5  $\mu$ m (150 x 4.6 mm)  
Fluorimetro: Waters 474 fluorescent detector  
Fase mobile A: MeOH  
Fase mobile B: Ammonio acetato 2 mM pH 5.8  
Eluizione a gradiente  
Flusso: 0.6 mL/min  
Temperatura colonna: 35°C  
Lunghezza d'onda di eccitazione 250 nm, emissione 395 nm



## Condizioni cromatografiche per la messa a punto di un metodo interno

Colonna: Pursuit C18 5  $\mu$ m (150 x 2.0 mm)  
Fluorimetro: Jasco FP-920  
Fase mobile: Ammonio acetato 50 mM pH 5.8  
Ammonio acetato 2 mM pH 5.8  
MeOH  
Eluizione isocratica  
Flusso: 0.3 mL/min  
Temperatura colonna: 35°C  
Lunghezza d'onda di eccitazione 250 nm,  
emissione 395 nm

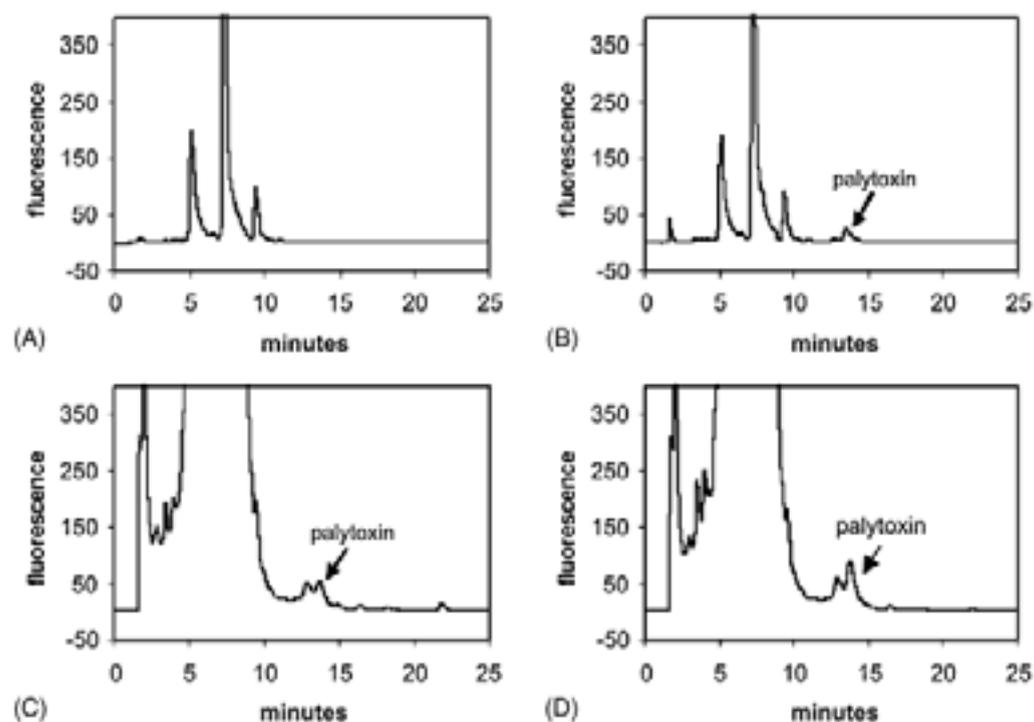
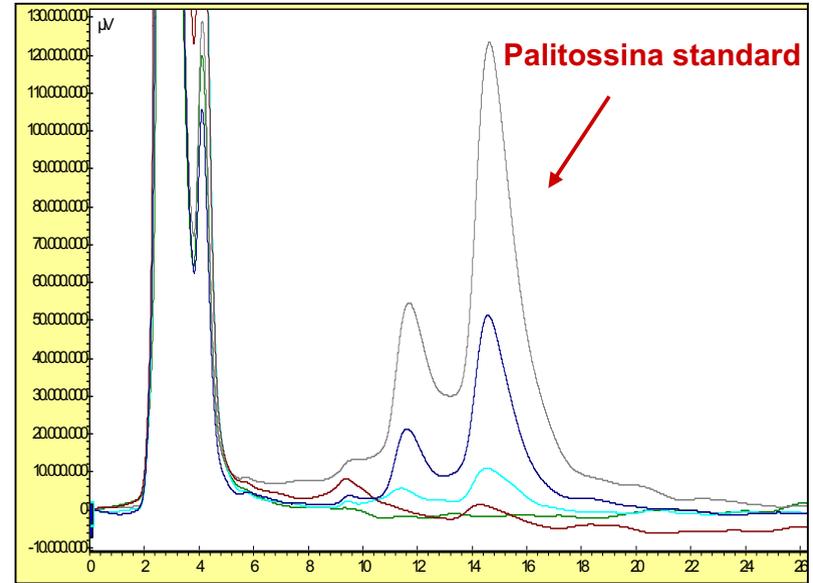
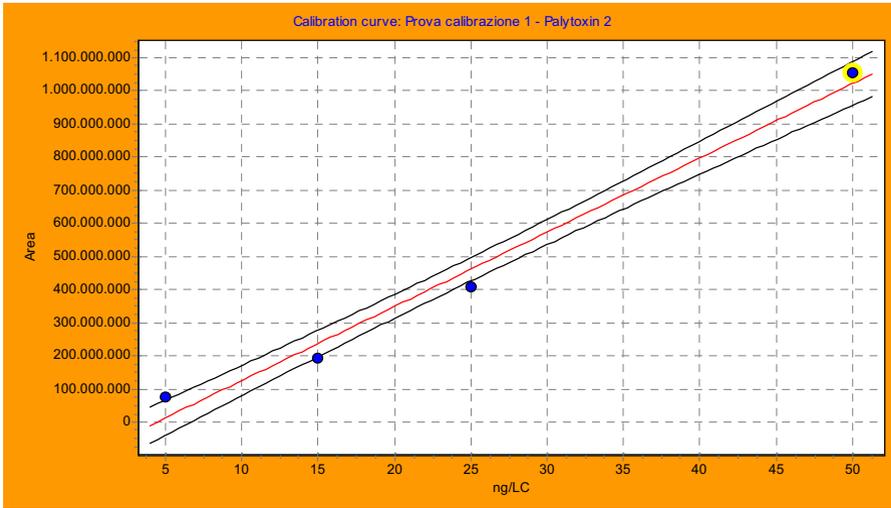
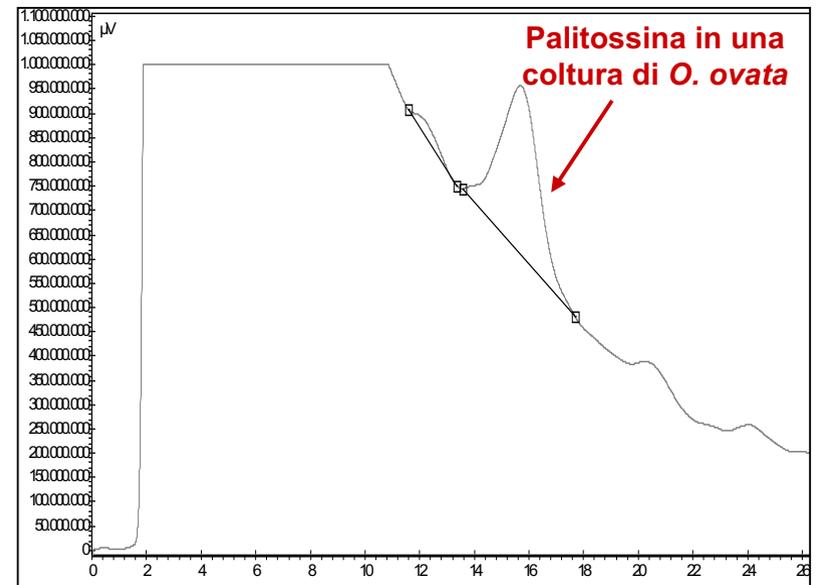


Fig. 5. Representative chromatograms of derivatized blank (A) in comparison with derivatized palytoxin standard (B), derivatized MeOH:acetic eluate from Oasis Max cartridge of *Ostreopsis* sample (C) and the previous eluate spiked with palytoxin standard (D). Experimental conditions for LC-FLD are given in the text. The arrow indicates the palytoxin peak.

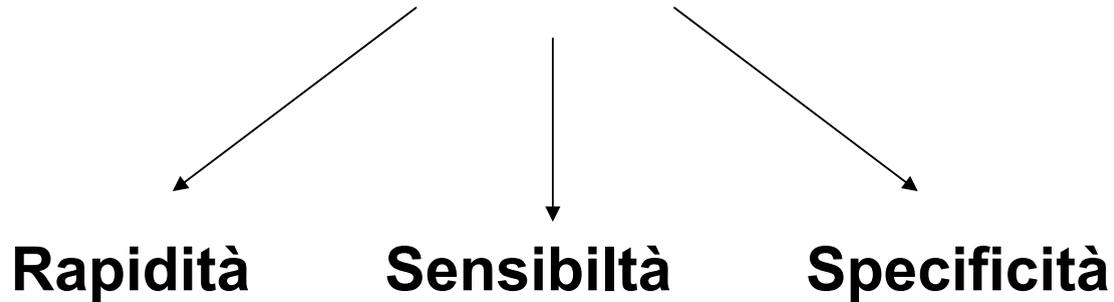


Curva di taratura =>  $r^2=0.9825$



# Cromatografia liquida in spettrometria di massa

## LC-MS



Con una unica tecnica analitica possiamo analizzare in modo rapido numerosi campioni (analisi automatizzate) confermando in modo non ambiguo la presenza di composti del tipo palitossina, ed escludendo la contaminazione da altre biotossine lipo- e idrosolubili.

# LC-MS/MS per analisi multiresiduo

## 1. Preparazione del campione e iniezione

2. Sep

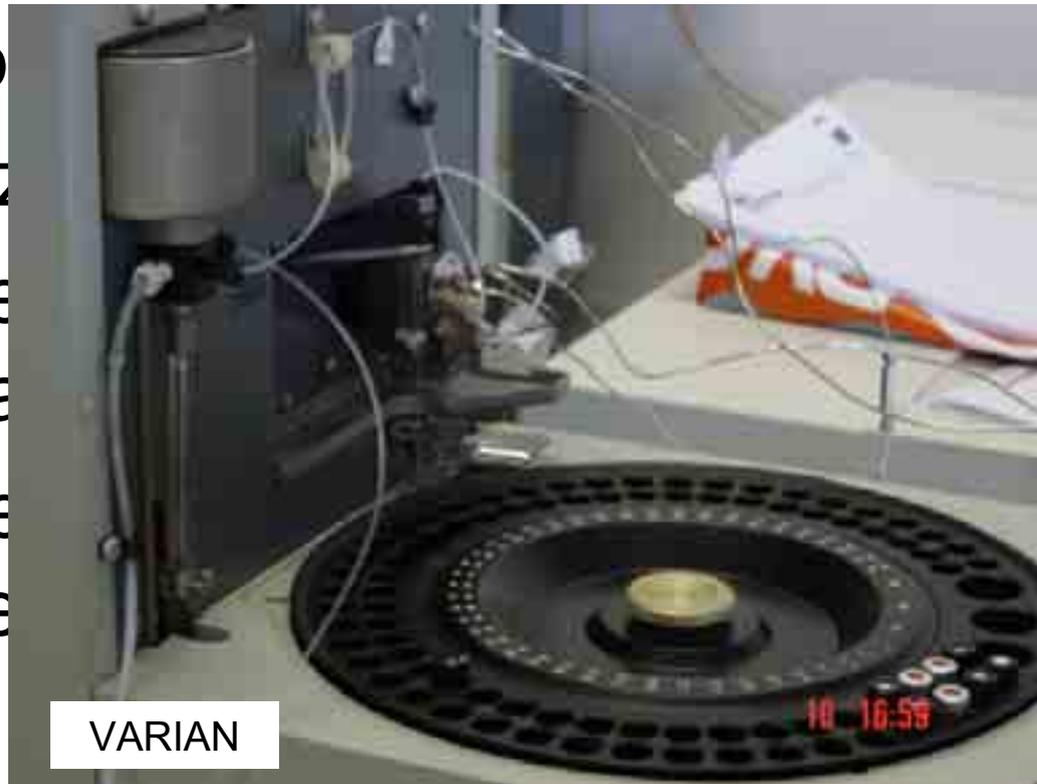
3. Ioniz

4. Sele

attra

5. Rive

dete



VARIAN

# LC-MS/MS per analisi multiresiduo

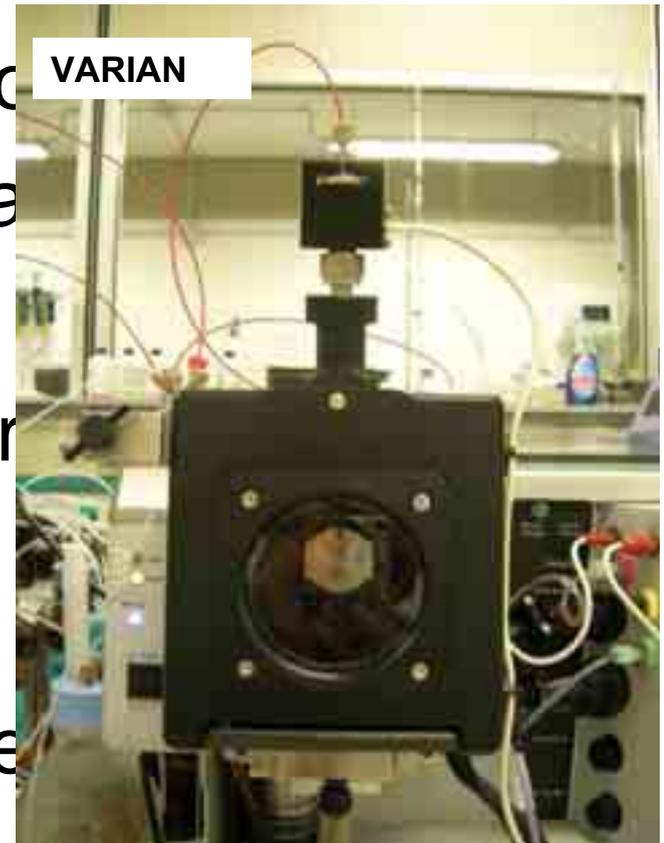
1. Preparazione del campione e iniezione
2. Separazione cromatografica

- 3.
- 4.
- 5.



# LC-MS/MS per analisi multiresiduo

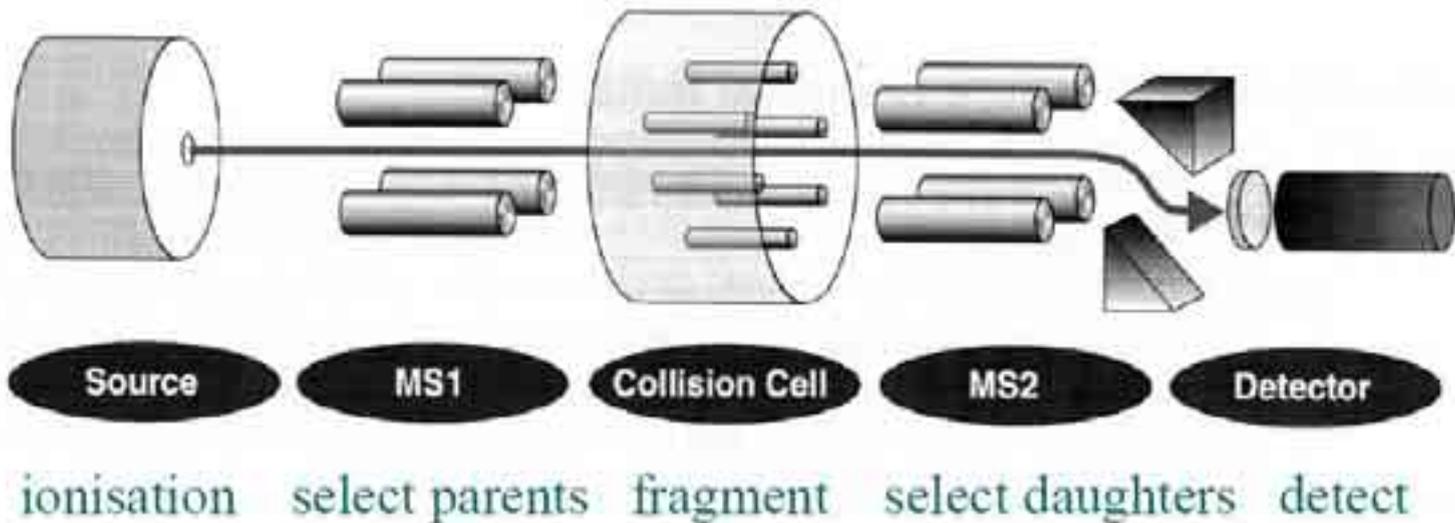
1. Preparazione del campione
2. Separazione cromatografica
3. **Ionizzazione ESI**
4. Selezione degli ioni appropriati attraverso l'analizzatore
5. Rivelazione del segnale detector ed elaborazione



# LC-MS/MS per analisi multiresiduo

3. Ionizzazione ESI

4. Selezione degli ioni appropriati attraverso l'analizzatore MS/MS

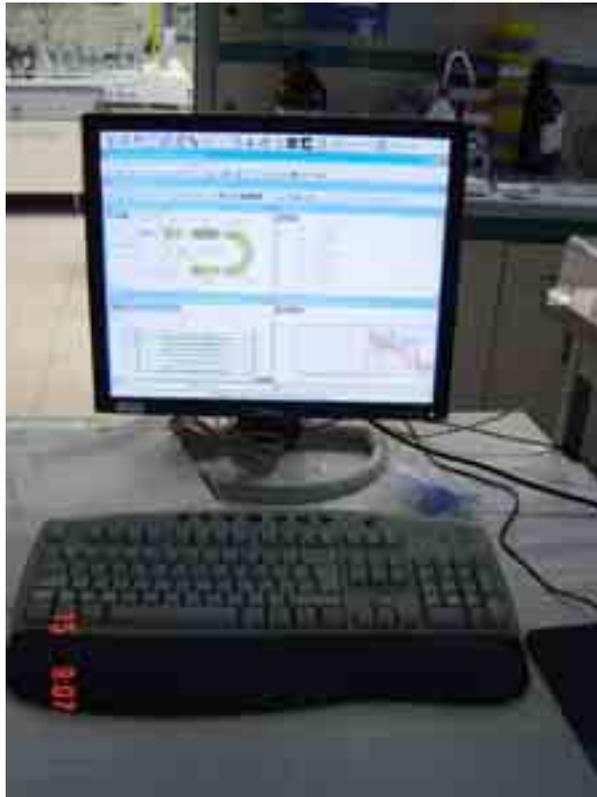


# LC-MS/MS per analisi multiresiduo



# LC-MS/MS per analisi multiresiduo

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.

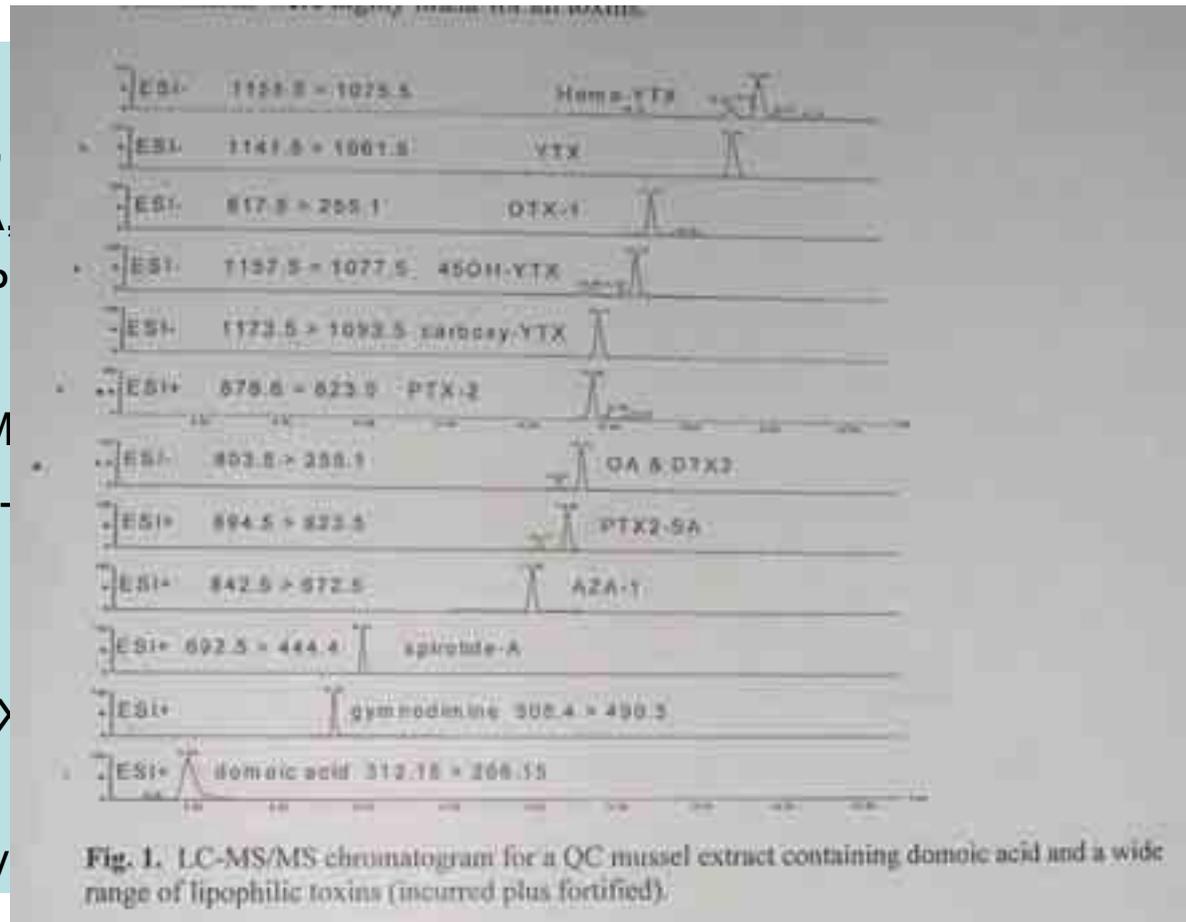


5. Rivelazione del segnale tramite il detector ed elaborazione dati.

# LC-MS method for marine biotoxins and their introduction into the NZ shellfish regulatory programme

Holland *et al.*, 2003

- ⊗ Acido domoico (DA,
- ⊗ Acido ocadaico (OA,
- ⊗ Pectenotossina 2 (P
- ⊗ Yessotossina (YTX,
- ⊗ Gymnodimina (GYM
- ⊗ AZA-1, AZA-2, AZA-
- ⊗ iso-DA-C
- ⊗ DTX-1, DTX-2
- ⊗ PTX-6, PTX-11, PTX
- ⊗ SPX-A
- ⊗ 45OH-YTX, carboxy



# Applicazione della tecnica LC-MS a campioni contenenti palitossina e/o suoi analoghi.

Usami M., Satake M., Ishida S., Inoue A., Kan Y. And Yasumoto T. (1995). Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. J. Am. Chem. Soc. 117: 5389-5390.

Onuma Y., Satake M., Ukena T., Roux J., Chanteau S., Rasolofonirina N., Ratsimaloto M., Naoki H. and Yasumoto T. (1999). Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. Toxicon 37: 55-65.

Ukena T., Satake M., Usami M., Oshima Y., Naoki H. Fujita T., Kan Y. and Yasumoto T. (2001). Structure elucidation of ostreocin D, a palytoxin analog isolated from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65 (11): 2585-2588.

Ukena T., Satake M., Usami M., Oshima Y., Fujita T., Naoki H. and Yasumoto T. (2002). Structural confirmation of ostreocin-D by application of negative-ion fast-atom bombardment collision-induced dissociation tandem mass spectrometric methods. Rapid Commun. Mass Spectrom. 16: 2387-2393.

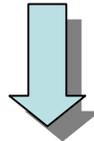
Lenoir S., Ten-Hage L., Turquet J., Quod J-P. and Bernard C. (2004). First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dinophyceae) benthic bloom in the southwestern Indian Ocean. Journal of Phycology 40: 1042-1051.

Riobò P., Paz B. and Franco J.M. (2006). Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. Analytica Chimica Acta 566: 217-223.

Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Tartaglione L., Grillo C. and 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.

**The Genoa 2005 Outbreak. Determination of Putative Palytoxin  
in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a New Liquid  
Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method.**  
Ciminiello *et al.*, 2006

ottimizzazione dei parametri **LC** e **MS**



messa a punto di un nuovo metodo

## STRUMENTAZIONE

Cromatografia => Agilent 1100 LC

MS => PE-Sciex API-2000 triplo quadrupolo con  
sorgente TSI (turbospray)

# Condizioni cromatografiche

- Colonna: 5- $\mu$ m Gemini C18 (150x2.00mm) (Phenomenex, Torrance, CA)
- Temperatura ambiente
- Flusso: 0.2 mL/min
- Fase mobile A: acqua contenente acido acetico 30 mM
- Fase mobile B: acetonitrile 95% contenente acido acetico 30 mM
- Gradiente

Time	% A	% B
0.00	80	20
10.00	0	100
14.00	0	100

# Rivelazione MS/MS

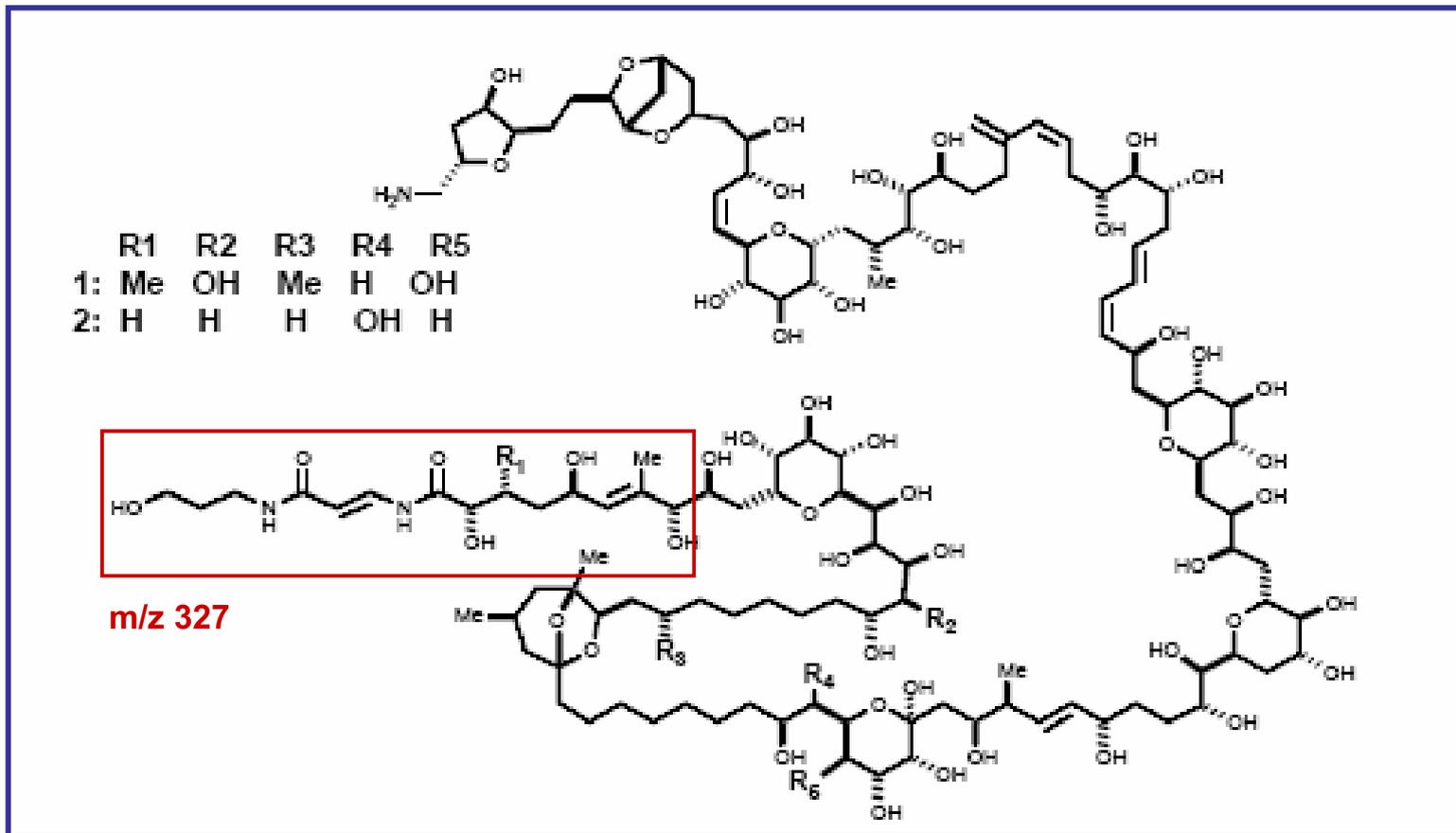
- **Ion mode: positivo**
- Turbogas temperature: 300°C
- Ion spray voltage: 5500 V
- Focusing potential: 350 V
- Entrance potential: 11 V
- Collision energy: 50 eV
- Cell exit potential: 10 V
- Dwell time: 500 ms

MRM

SIM

FS-MS

Individuazione delle **transizioni** più selettive e con un maggiore rapporto segnale/rumore che verranno utilizzate per la determinazione e quantificazione della palitossina.

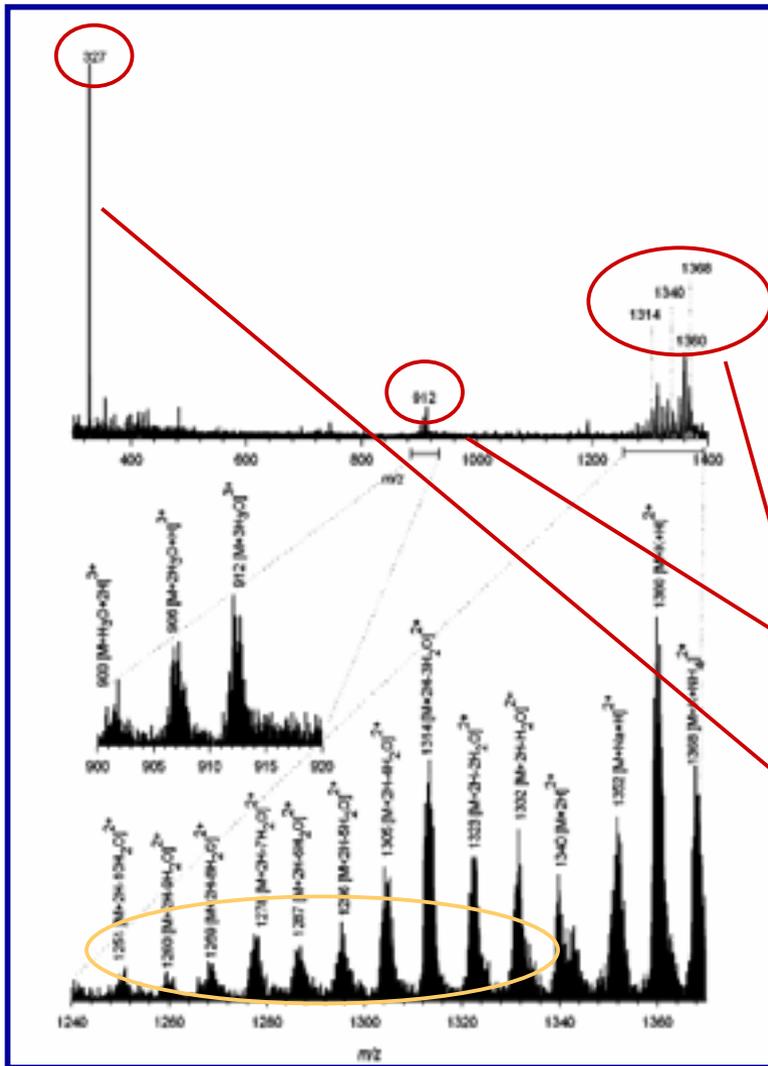


Struttura della **palitossina** (1) e della **ostreocina-D** (2) isolate da *Ostreopsis siamensis* (Ukena *et al.*, 2001).

Lo ione a  $m/z$  327 domina gli spettri di massa in full-scan. Esso deriva dalla frammentazione tra gli C 8 e 9 della molecola e dalla addizionale perdita di una molecola di acqua nella sorgente di ionizzazione.

## POTENZIALITA' DELLA IONIZZAZIONE ELECTROSPRAY (ESI)

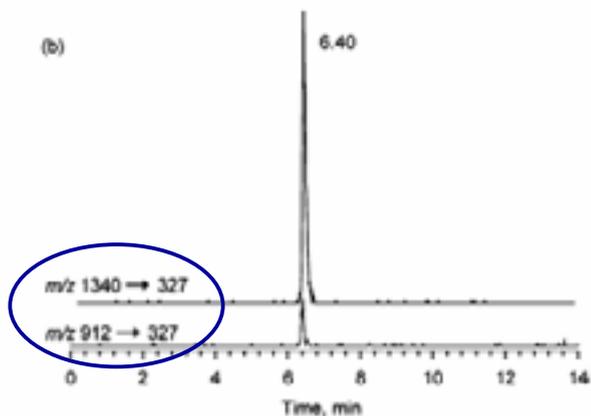
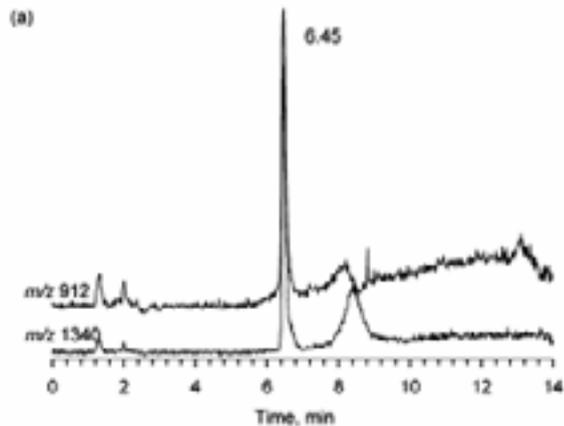
E' una ionizzazione "soft" che produce **molecole a carica multipla** e **permette l'analisi di composti ad alto peso molecolare** (come la palitossina) anche con spettrometri di massa caratterizzati da un intervallo di  $m/z$  non necessariamente così ampio.



Palitossina	MW 2680
Ioni tricarica	$m/z$ 912 $[M+3H+3H_2O]^{3+}$
Ioni bicarica	$m/z$ 1340 $[M+2H]^{2+}$
Ione dominante	$m/z$ 327

Molecola caratterizzata dalla perdita di numerose molecole d'acqua.

Spettro di massa della molecola di palitossina in full-scan (ion mode positivo), ottenuto per infusione diretta dello standard della tossina in una soluzione di acetonitrile/acqua (1:1, v/v) contenente ammonio formiato 2mM e acido formico 50mM (Ciminiello *et al.*, 2006)



**Figure 5.** LC–MS analyses of a 1  $\mu\text{g/mL}$  standard solution of palytoxin in positive ion mode. SIM (a) was performed for ions at  $m/z$  1340  $[\text{M} + 2\text{H}]^+$  and  $m/z$  912  $[\text{M} + 3\text{H} + 3\text{H}_2\text{O}]^+$ . MRM experiment (b) was performed by selecting ion transitions consistent with the fragmentation behavior of palytoxin. Chromatographic conditions are reported in the Experimental Section.

Transizioni selezionate per le analisi in MRM.

Da Ciminiello *et al.*, 2006.

LOD 25 ng/mL

# Messa a punto di un metodo interno LC-MS/MS per l'analisi di palitossine

## STRUMENTAZIONE

cromatografia => pompa binaria Varian Prostar 230

MS => Varian 1200L triplo quadrupolo con sorgente ESI

## CONDIZIONI CROMATOGRAFICHE

Colonna: 3- $\mu$ m Polaris C18 (150 x 2.00 mm)

Temperatura ambiente

Flusso: 0.2 mL/min

Fase mobile A: acqua contenente acido acetico 30 mM

Fase mobile B: acetonitrile 95% contenente acido acetico 30 mM

Gradiente

Time	% A	% B
0.00	80	20
2.00	80	20
5.00	5	95
10.00	5	95
10.01	80	20
15.00	80	20

# Messa a punto di un metodo interno LC-MS/MS per l'analisi di palitossine

## RIVELAZIONE MS/MS

Ion mode: positivo

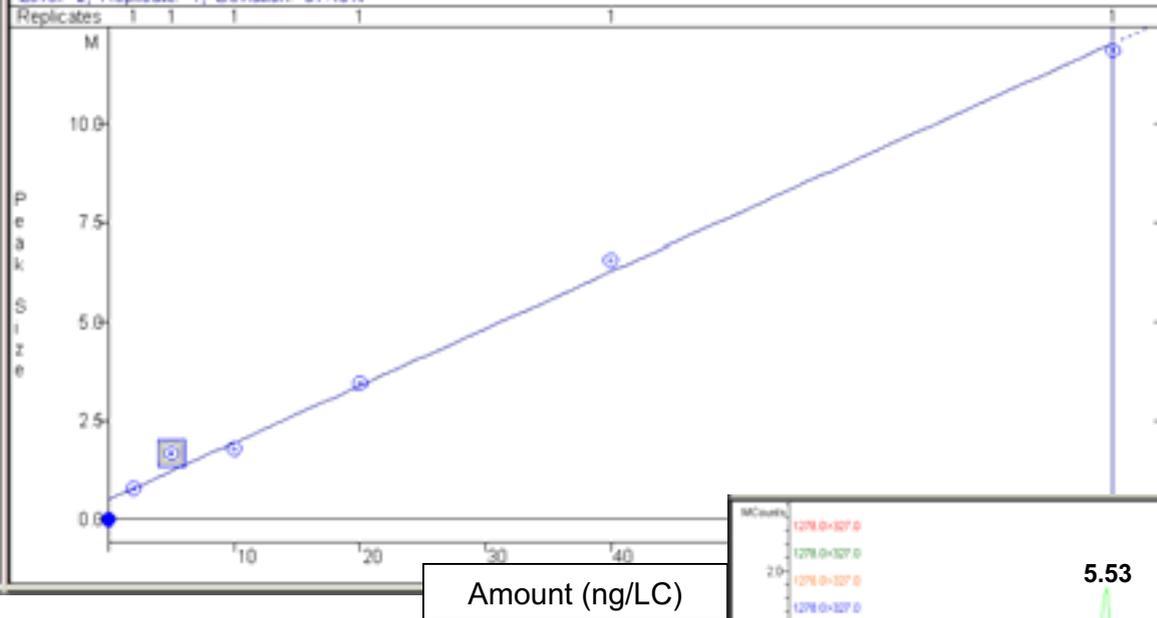
API drying gas: 320 °C, 19 psi

Needle: 5000 V

Shield: 600 V

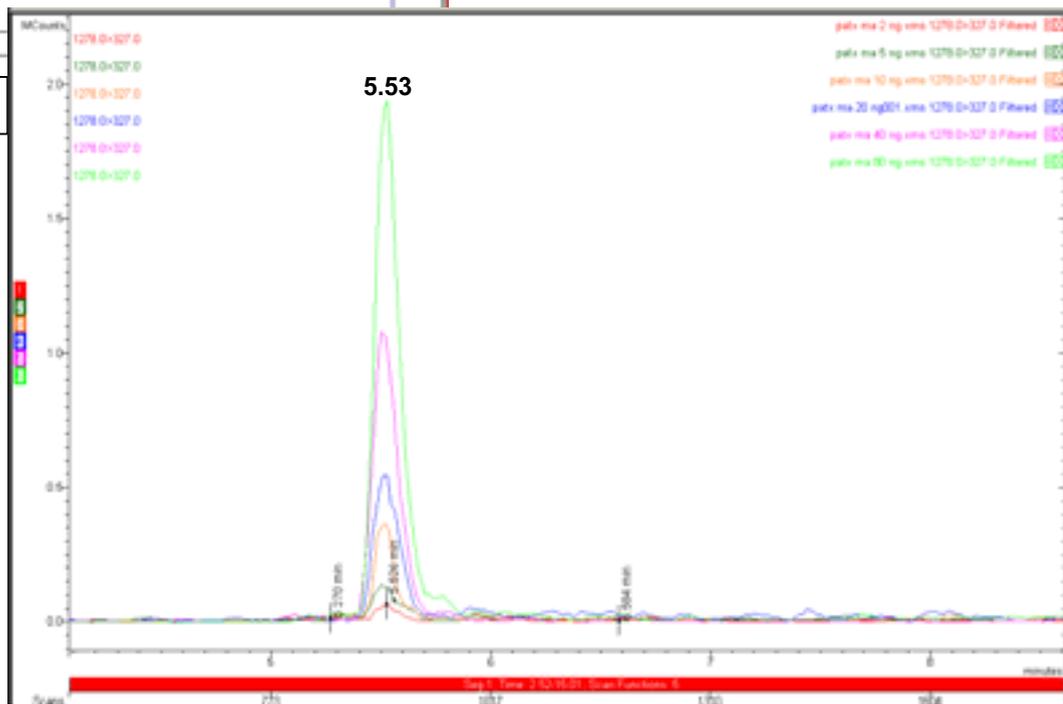
Capillary CID (V)	Q1	Q3	Collision Energy (V)
+ 62.0	852 [M+3H-7H <sub>2</sub> O] <sup>3+</sup>	327	- 20
+ 100.0	1278 [M+2H-7H <sub>2</sub> O] <sup>2+</sup>	327	- 40

External Standard Analysis  
Curve Fit: Linear, Origin: Include, Weight: None  
Resp. Fact: RSD: 44.73%, Coeff. Det. (r<sup>2</sup>): 0.994262  
y = +1.4443e+5x + 4.9543e+5  
Level: 2, Replicate: 1, Deviation: 37.48%

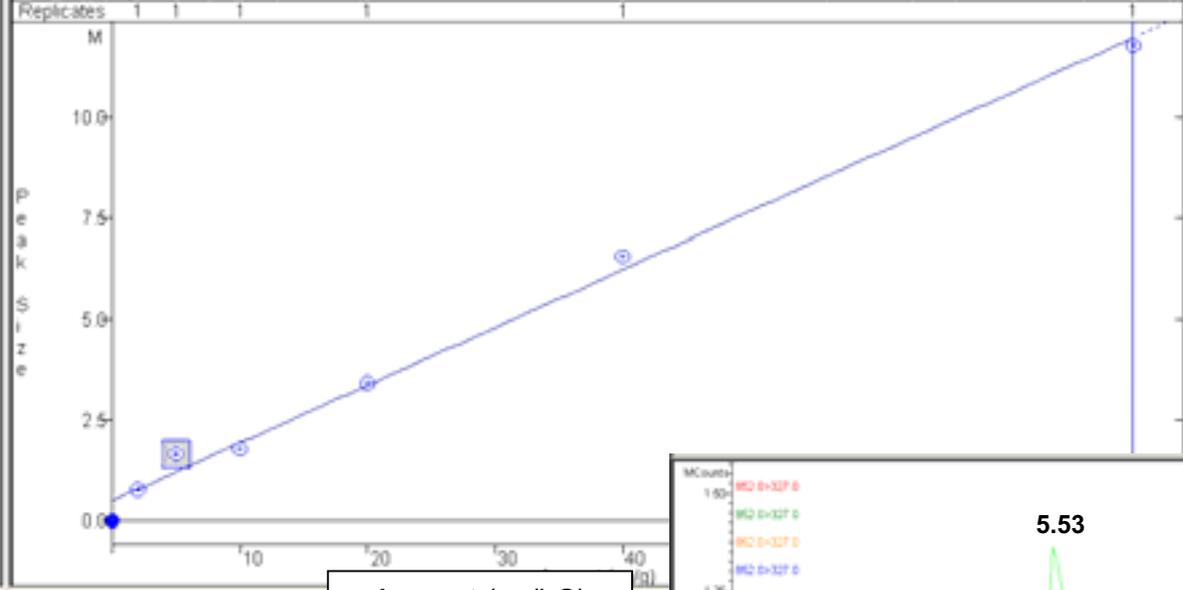


Amount (ng/LC)

**m/z 1278>327**

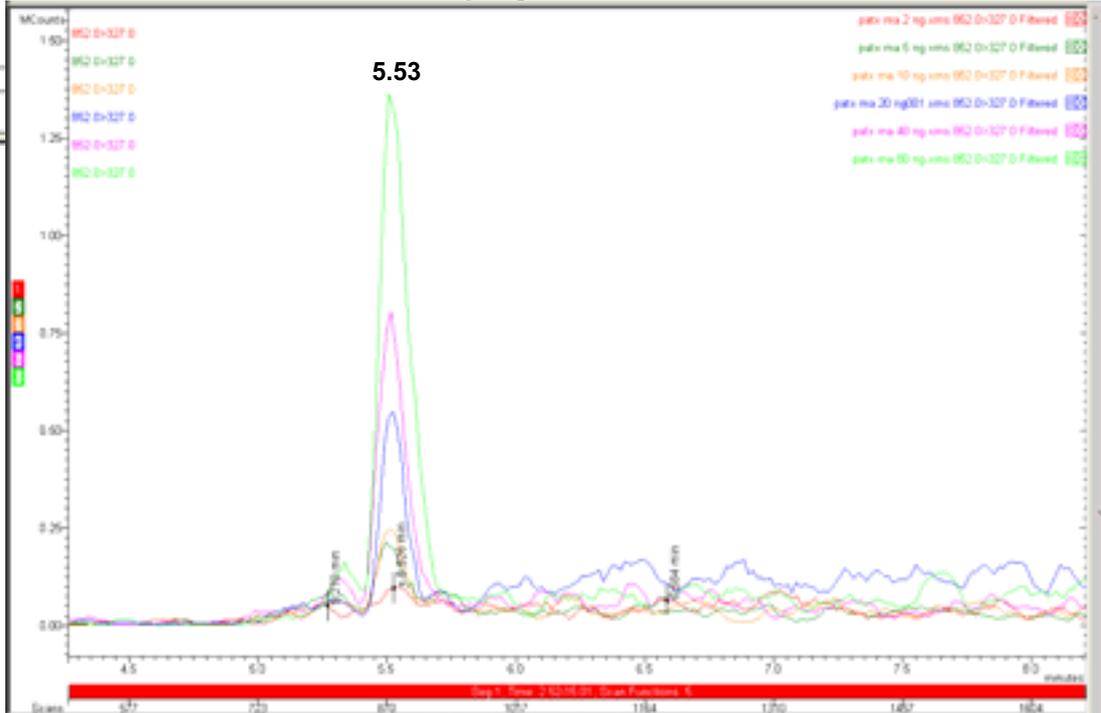


External Standard Analysis  
Curve Fit: Linear, Origin: Include, Weight: None  
Resp. Fact: RSD: 44.80%, Coeff. Det.(r2): 0.994079  
 $y = +1.4364e+5x + 4.9705e+5$   
Level: 2, Replicate: 1, Deviation: 36.70%



Amount (ng/LC)

***m/z 852>327***



# Cromatogramma relativo ad una coltura di *Ostreopsis ovata*

