

Utjecaj pH i temperature na sadržaj domoične kiseline u dagnjama *Mytilus galloprovincialis*

Dujić, Andrijana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:226:653500>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of University Department of Marine Studies](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
DIPLOMSKI STUDIJ MORSKO RIBARSTVO

Andrijana Dujčić

UTJECAJ PH I TEMPERATURE NA SADRŽAJ
DOMOIČNE KISELINE U DAGNJAMA *MYTILUS*
GALLOPROVINCIALIS

Diplomski rad

Split, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
DIPLOMSKI STUDIJ MORSKO RIBARSTVO

UTJECAJ PH I TEMPERATURE NA SADRŽAJ
DOMOIČNE KISELINE U DAGNJAMA *MYTILUS*
GALLOPROVINCIALIS

Diplomski rad

Predmet: Toksičnost školjkaša

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Ivana Ujević

Student:

Andrijana Dujić

Split, rujan 2018.

Sveučilište u Splitu
Sveučilišni odjel za studije mora
Diplomski studij Morsko ribarstvo

Diplomski rad

**UTJECAJ pH I TEMPERATURE NA SADRŽAJ DOMOIČNE KISELINE U
DAGNJAMA *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS***

Andrijana Dujić

Sažetak

Domoična kiselina (DK) je neurotoksin koji je polaran i topljiv u vodi, a uzročnik je amnezijskog trovanja školjkašima (engl. *Amnesic Shellfish Poisoning* - ASP). Kod ljudi se trovanje domoičnom kiselinom očituje gastrointestinalnim i neurološkim simptomima. U ovom radu koristila se metoda tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (LC-MS/MS) za kvantitativno i kvalitativno određivanje domoične kiseline u mekom tkivu dagnje *Mytilus galloprovincialis*. Istraživan je utjecaj pH i temperature na stabilnost domoične kiseline u metanolskim ekstraktima. Otopina metanola se koristila za ekstrakciju domoične kiseline iz tkiva organizma. Rezultati pokazuju da temperatura ne utječe značajno na stabilnost domoične kiseline, dok pH vrijednost utječe pri niskim vrijednostima.

(39 stranica, 16 slika, 9 tablica, 74 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: domoična kiselina, ASP, LC-MS/MS, pH, temperatura

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Ivana Ujević

Ocjenjivači: 1. Doc. dr. sc. Jure Brčić
2. Doc. dr. sc. Mirela Petrić
3. Izv. prof. dr. sc. Ivana Ujević

University of Split
Department of Marine Studies
Graduate study Marine Fishery

MSc Thesis

**INFLUENCE OF PH AND TEMPERATURE ON THE DOMOIC ACID CONTENT IN
MUSSELS *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS***

Andrijana Dujčić

Abstract

Domoic acid (DK) is a heterocyclic and water soluble neurotoxin that is responsible for Amnesic Shellfish Poisoning (ASP). The poisoning is characterized by gastrointestinal and central nervous system (CNS) clinical symptoms. In this research, the tandem method of liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS/MS) was used for the quantitative and qualitative determination of domoic acid in soft tissue of mussel *Mytilus galloprovincialis*. The influence of pH and temperature on the stability of domoic acid in methanol extracts was investigated. A methanol solution was used to extract the domoic acid from the shellfish tissue. The results show that the temperature does not significantly affect the stability of the domoic acid. Nonetheless, only low Ph values do affect its stability.

(39 pages, 16 figures, 9 tables, 74 references, original in: Croatian)

Keywords: domoic acid, ASP, LC-MS/MS, pH, temperature

Supervisor: Ivana Ujević, PhD / Associate Professor

Reviewers:

1. Jure Brčić, PhD / Assistant Professor
2. Mirela Petrić, PhD / Assistant Professor
3. Ivana Ujević, PhD / Associate Professor

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Mediteranska dagnja <i>Mytilus galloprovincialis</i>	1
1.2. Domoična kiselina	3
1.3. Dijatomeje	5
1.4. Taksonomija roda <i>Pseudo-nitzschia</i>	7
1.5. Geografska rasprostranjenost toksičnih vrsta roda <i>Pseudo-nitzschia</i>	9
1.6. Ekologija i dinamika cvatnje	10
1.7. Domoična kiselina u hranidbenom lancu	11
1.8. Trovanje domoičnom kiselinom	12
1.9. Određivanje domoične kiseline	13
1.10. Dosadašnja istraživanja	14
1.11. Svrha i ciljevi rada.....	14
2. MATERIJALI I METODE	16
2.1. Područje sakupljanja uzoraka	16
2.2. Obrada uzoraka.....	17
2.3. Određivanje domoične kiseline na LC-MS/MS	22
3. REZULTATI.....	26
3.1. Domoična kiselina u metanolskim ekstraktima dagnji pri temperaturi od 90°C	28
3.2. Domoična kiselina u metanolskim ekstraktima dagnji pri pH ~ 3	29
3.3. Domoična kiselina u metanolskim ekstraktima dagnji pri pH ~ 1	30
4. RASPRAVA.....	32
5. ZAKLJUČAK	34
6. LITERATURA.....	35

1. UVOD

Školjkaši (razred Bivalvia) su morski i slatkovodni organizmi koji se hrane filtracijom vode, a pripadaju koljenu mekušaca (Mollusca). U Republici Hrvatskoj najviše se uzgaja mediteranska dagnja *Mytilus galloprovincialis* i kamenica *Ostrea edulis* te se s njima potrošači najviše i susreću. Mediteranska dagnja *M. galloprovincialis* je školjkaš koji živi u Mediteranu, uključujući i Jadransko more. Samoniklu dagnju nalazimo uzduž istočne obale Jadrana. Naselja dagnji uglavnom su gusta i dosta prostrana. Dagnja se hrani planktonom, filtrirajući morsku vodu. Prema tvrdnjama stručnjaka dagnja u jednom satu profiltrira čak 7 litara vode (Anonimus, 2016). Zbog karakterističnog hranjenja filtracijom, školjkaši su u mogućnosti akumulirati velike količine toksina koje toksične planktonske alge produciraju (Ribarić i sur., 2012). Školjkaši najčešće akumuliraju toksine za vrijeme "cvjetanja mora", odnosno pojačanog razmnožavanja određene toksične alge. Toksine najčešće proizvode dinoflagelati, osim domoične kiseline (DK) koju proizvode dijatomeje, odnosno alge kremenjašice.

1.1. Mediteranska dagnja *Mytilus galloprovincialis*

Mediteranska dagnja *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819, najčešće naseljava zonu plime i oseke i uobičajen je školjkaš duž cijele obale Jadranskog mora. U nekim područjima je pod antropogenim utjecajem, zatim utjecajem industrije, urbanih sredina i turizma te zbog toga može biti zagađena opasnim ili potencijalno opasnim tvarima. Ograničena dubinska rasprostranjenost uvjetovana je biološkim čimbenicima predacije i kompeticije, a ne nemogućnošću preživljavanja u uvjetima koji vladaju u dubljim slojevima infralitoralne zone (Gosling, 1992). Mediteranska dagnja (Slika 1) ima tamnomodre asimetrične ljuštore. Stopalo je smanjeno i prstasto. U njemu se nalaze žlijezde koje izlučuju sluz. Izlučena sluz u morskoj vodi otvrdne u dugačka i žilava vlakna, tzv. bisus, pomoću kojeg se školjkaš prihvaća na podlogu (Račić, 2013). Dagnje su gonohoristi s vanjskom oplodnjom. Spolno sazrijevaju u prvoj godini života. Spol jedinki se može odrediti po boji gonada koje se nalaze unutar ljuštore. Mužjaci imaju gonade mliječne boje, dok ženke imaju gonade narančasto crvenkaste boje (Fiorentin, 2016).

Mediteranska dagnja je od visoke ekonomske važnosti, pri čemu godišnja proizvodnja u Hrvatskoj iznosi do 3000 tona (Anonimus, 2017). Na uzgoj dagnji utječu ekološki čimbenici kao što su temperatura, salinitet, pH, količina otopljenog kisika i prozirnost morske vode.

Mediteranska dagnja odgovara zahtjevima dobrog bioindikatora kvalitete mora zbog rasprostranjenosti, jednostavnog identificiranja i jednostavnog uzorkovanja, budući da se radi o sesilnom organizmu. Zbog filtriranja morske vode, dagnja u sebi nakuplja razna zagađivala i toksine. Provođenjem stalnog monitoringa i raznih tzv. *mussel watch* (engl.) programa može se utvrditi stanje ekosustava i kvaliteta morske vode što je od velike važnosti za ljudsko zdravlje (Fiorentin, 2016). Pokusima je utvrđeno da se u tkivu školjkaša DK najviše akumulira u probavnoj žlijezdi, zatim u organima za sekreciju i škragama, dok su najmanje količine pronađene u gonadama, mišićima i vezivnom tkivu (Ribarić i sur., 2012). Dagnje se koriste i kao bioindikator praćenja radioaktivnosti voda priobalnog mora Mediterana. U idealnim uvjetima filtriraju i do 7 litara morske vode u jednom satu te na taj način mogu apsorbirati i akumulirati tvari otopljene u morskoj vodi ili adsorbirane na krutim česticama (suspendiranoj tvari). Upravo zbog te mogućnosti akumulacije, dagnje predstavljaju dobar biološki indikator za praćenje zagađenja morskog okoliša raznim onečišćivačima (Mačefat i sur., 2013).



Slika 1. Mediteranska dagnja *Mytilus galloprovincialis* (izvor: www.coolinarika.com/namirnica/dagnje/preporuke).

1.2. Domoična kiselina

Domoična kiselina je jedan od najznačajnijih fitotoksina koji je odgovoran za amnezijско trovanje školjkašima (engl. *Amnesic Shellfish Poisoning* - ASP) kod ljudi (Wright i sur., 1989). Domoična kiselina je prvi put izolirana iz crvene makroalge, *Chondria armata* u Japanu (Takemoto i Daigo, 1958), a izolirali su je japanski istraživači Takemoto i Daigo koji su proučavali insekticidna svojstva ekstrakta algi. Ime domoične kiseline dolazi od riječi

domoi (ili *doumoi*), što je lokalno ime za algu *C. armata* u Japanu (Bates i sur., 1998). Istovremeno je izolirana i iz crvene alge *Chondria baileyana* (Takemoto i Daigo, 1958), a kasnije i iz *Alsidium corallinum* (Impellizzeri, 1975).

Od mikroalgi, domoičnu kiselinu proizvode dijatomeje *Amphora coffeaeformis*, (Lundholm i sur., 1994), *Nitzschia navisvaringica* (Lundholm i Moestrup, 2000), te 11 vrsta roda *Pseudo-nitzschia* (Lundholm i Moestrup, 2007). Bates i sur. (1989) su otkrili da je dijatomeja *Nitzschia pungens* (danas poznata kao *Pseudo-nitzschia multiseriis*) odgovorna za kontaminaciju dagnji na otoku Prince Edward 1987. godine.

Poznato je da crvene alge *C. armata* sadrže visoku razinu DK. ASP toksini u *C. armata* se sastoje od 80% osnovnog oblika DK i 20% izomera. Prisutni su u divljim školjkašima i školjkašima iz uzgajališta. U Jadranskom moru je potvrđena njihova prisutnost i uz talijansku i uz hrvatsku obalu (Ujević i sur., 2010). Školjkaši filtriranjem morske vode zadržavaju fitoplanktonske organizme koji sadrže domoičnu kiselinu, te se ona akumulira u tkivu školjkaša. Nekoliko je zabilježenih slučajeva zatvaranja uzgajališta zbog nakupljanja domoične kiseline u tkivu mekušaca. Takvi slučajevi su zabilježeni 1987. godine na otoku Prince Edward (kontaminacija dagnji), u zaljevu Monterey u Kaliforniji (ugibanje morskih ptica i sisavaca), zatvaranje uzgajališta školjkaša u zaljevu Fundy 1988. godine i u zaljevu St. Lawrence u Kanadi 1998. do 2000. godine (James i sur., 2005).

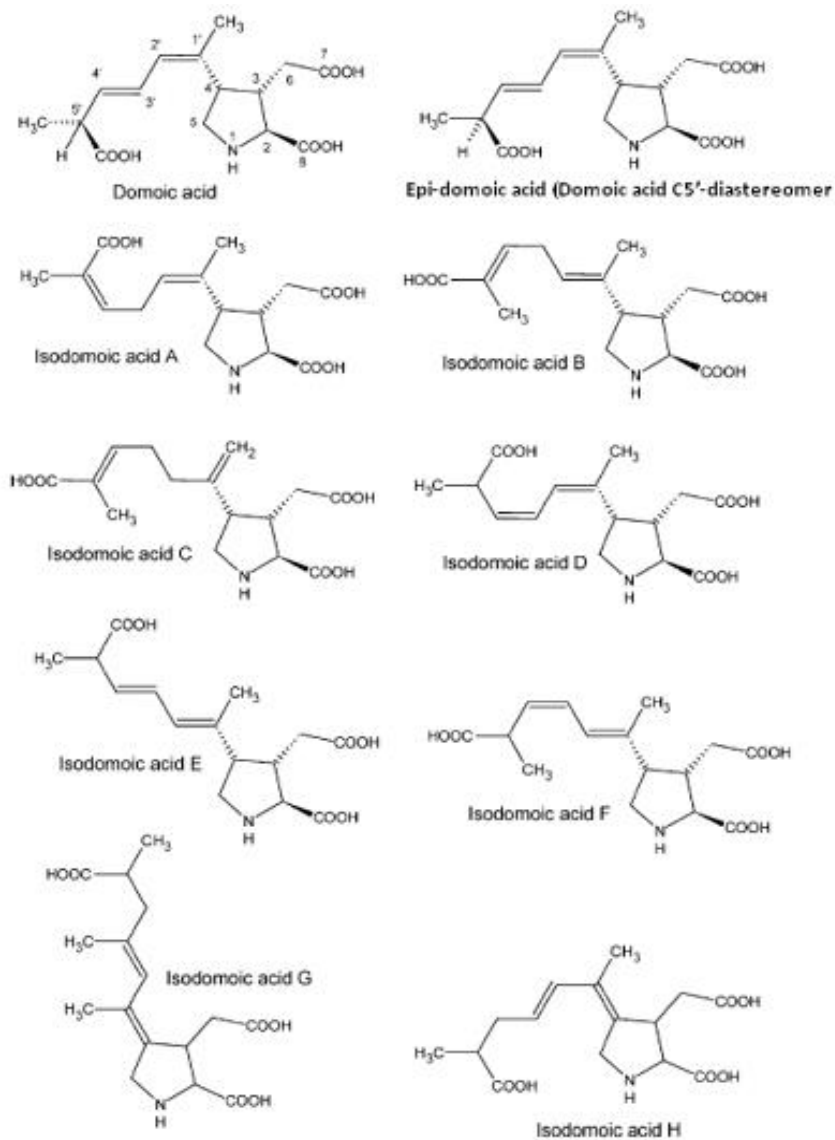
Trovanje domoičnom kiselinom očituje se kod ljudi gastrointestinalnim i neurološkim simptomima. U ranoj fazi, do 24 sata od konzumacije, dolazi do povraćanja, abdominalnih grčeva, proljeva i mučnine. U ozbiljnijih slučajeva, unutar 48 sati od konzumacije, dolazi do neuroloških simptoma kao što su glavobolja, vrtoglavica, facijalna paraliza, napadaji, kratkotrajna amnezija, poteškoće u disanju i koma. Neurološki simptomi mogu trajati mjesecima, a kod najtežih slučajeva trovanja može nastupiti smrt (Ribarić i sur., 2012).

U Jadranu se domoična kiselina prvi put pojavila 2006. godine u siječnju, a najveće koncentracije su izmjerene u mjesecu veljači nakon velikih oborina, čemu je prethodilo cvjetanje dijatomeja *Pseudo-nitzschia* spp. Iako relativno visoke temperature mora (14-17°C) pogoduju većim akumulacijama *Pseudo-nitzschia*, ovaj događaj pokazuje da su se cvjetanja *Pseudo-nitzschia* dogodila u iznimno niskim temperaturama mora, jer su u veljači tijekom 2006. godine izmjerene najniže temperature s mjesečnim prosjekom od 6°C. Međutim, izmjerena je u niskim masenim udjelima koji nisu štetni po ljudsko zdravlje (Ujević i sur., 2010).

Analiza domoične kiseline obavlja se primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s UV detekcijom (HPLC-UV) i analitičke metode tekućinske kromatografije s

masenom spektroskopijom (LC-MS). Prema direktivi komisije EU (2002/226/EC) maksimalna dozvoljena količina ASP toksina iznosi 20 mg domoične kiseline po kilogramu mesa školjkaša.

Domoična kiselina je topljiva u vodi i polarna je. Pripada skupini aminokiselina koje se nazivaju kanoidi, a koje su klasificirani kao neuroekscitatori jer ometaju mehanizme neurotransmisije u mozgu (Wright i sur., 1989). Izvorni član grupe, kanoinska kiselina, izolirana je ranije iz druge crvene makroalge *Digenea simplex* (Murakami i sur., 1953). Domoična kiselina je uzročnik amnezijskog trovanja školjkašima nakon konzumacije toksičnih školjkaša ili drugih morskih organizama koji sadrže ovaj toksin. Molekula domoične kiseline sadrži jednu sekundarnu amino skupinu i tri karboksilne skupine zbog kojih je domoična kiselina lako topljiva u vodi i relativno jako polarna (Quilliam, 2001). Domoična kiselina apsorbira UV zračenje zbog konjugiranih dvostrukih veza. Otporna je na temperaturu i kuhanjem se neće razgraditi (Žure, 2010). Danas je poznato oko desetak geometrijskih izomera domoične kiseline (Slika 2), i to izodomoična kiselina A, B, C, D, E, F, G i H i 5'-epi-domoična kiselina, pri čemu svi izomeri nisu detektirani u tkivu školjkaša (Lelong i sur., 2012). Izodomoična kiselina A, B i C (Meda i sur., 1986) te izodomoična kiselina G i H (Zaman i sur., 1997) su izolirane iz crvene alge *C. armata*. Izodomoična kiselina A, B i C nisu izolirane iz vrsta roda *Pseudo-nitzschia* spp. (Meda i sur., 1986). Iz fitoplanktonskih stanica i tkiva školjkaša u manjim količinama su izolirani geometrijski izomeri, izodomoična kiselina D, E, F i 5'-epi-domoična kiselina (Wright i sur., 1990; Walter i sur., 1994). Posljednja istraživanja sugeriraju da se izodomoične kiseline A, B i C slabije vežu za receptore u mozgu od domoične kiseline te da nisu toliko opasne (Ujević i sur., 2010). Formiranje 5'-epi-domoične kiseline ubrzava se zagrijavanjem i taj dijastereomer ima skoro istu efikasnost vezivanja za receptor kao i domoična kiselina (Wright i Quilliam, 1995). Izomerne kiseline čine mali udio u kontaminiranim školjkama u odnosu na domoičnu kiselinu, a nekada nisu ni prisutni (Zhao i sur., 1997). Domoična kiselina može prijeći u izodomoičnu pod utjecajem UV svijetla ili topline (Wright i sur., 1990; Ravn, 1995; Wright i Quilliam, 1995). Domoična kiselina bi mogla biti produkt biosinteze, a zatim u povoljnim okolišnim uvjetima prijeći u izodomoičnu (Wright i sur., 1990). Izomeri se raspadaju u kiselim uvjetima (50% gubitka domoične kiseline u tjedan dana pri pH 3) (Jeffery i sur., 2004).



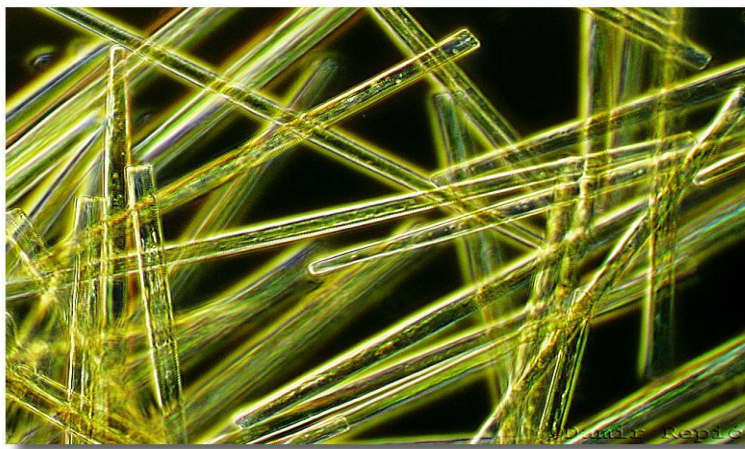
Slika 2. Struktura domoične kiseline, diastereomera 5'-epi-domoične kiseline i izomera, izodomoična kiselina A, B, C, D, E, F, G, H (izvor: Pineiro i sur., 1999).

1.3. Dijatomeje

Alge kremenjašice ili dijatomeje (*Bacillariophyceae, Diatomeae*) (Slika 3) su mikroskopske jednostanične biljke koje žive u slatkovodnim i morskim ekosustavima, od hladnijih do tropskih područja. Pripadaju carstvu Protista. Stanice dijatomeja nemaju staničnu stjenku već modifikaciju periplasta. Ispod plazmaleme periplasta nalaze se vezikule u kojima se sintetizira amorfnj opal ($\text{SiO}_2 \times n\text{H}_2\text{O}$) iz netopljivog silicija, koji je u moru prisutan u obliku ortosilicijeve kiseline (H_4SiO_4) i njezinih polimera. Naslage opala se u vezikulama povećavaju i izbijaju na vanjsku stranu stanice, a zatim opal (kremen) obavija čitavu stanicu u

obliku opalne „kućice“ s dvjema ljušturicama. Ljušturica (frustula) se sastoji od dva dijela (valve), od kojih veći dio, kao poklopac kutije, pokriva manji dio (Lelong i sur., 2012). Bentonske dijatomeje žive u ili na sedimentima i na površini drugih biljaka (epifitički), životinja (epizootski) ili stijena (epilita). One koje žive u vodenom stupcu, zajedno sa dinoflagelatima, drugim flagelatima i modrozelenim algama (cijanobakterije), među ostalima, čine fitoplankton, a nazivaju se i mikroalge.

Dijatomeje su podijeljene u dva podrazreda: Centricae i Pennate. Centricae su radijalno simetrične (okrugle, uglavnom planktonske) stanice, tzv. centrične dijatomeje, dok su Pennate longitudinalno simetrične (duge, uske, uglavnom bentonske) stanice, tzv. penatne dijatomeje (lat. *penne* - pero). Vrste roda *Pseudo-nitzschia* su penatne dijatomeje. Stanice dijatomeja su pojedinačne ili se drže međusobno apikalnim dijelovima stanice tvoreći lance. Obično su ravne poput igle ili sigmoidalne (Lelong i sur., 2012). Toksične cvatnje dijatomeja koje proizvode DK su u porastu s obzirom na učestalost i stupanj toksičnosti, što predstavlja prijetnje ljudskom zdravlju i sigurnosti morske hrane (Trainer i sur., 2008). Odgovara im područje visoke turbulencije i odlično su prilagođene na uvjete slabog osvjetljenja.



Slika 3. Mikroskopska dijatomeja

(izvor: www.mikrosvijet.wordpress.com/2011/05/03/alge-kremenjasice).

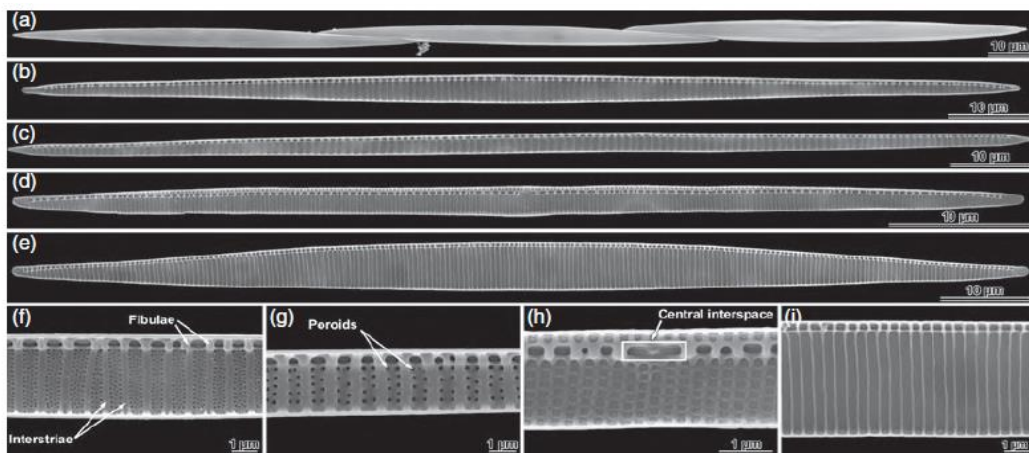
1.4. Taksonomija roda *Pseudo-nitzschia*

Taksonomija fitoplanktona proživljava neke promjene dolaskom novih informacija o morfologiji organizama i molekularnih karakteristika. Rod dijatomeja koje proizvode DK bio je prvo poznat kao *Nitzschia pungens* forma *multiseries* (Bates i sur., 1989). S obzirom na nove

morfološke i molekularne dokaze, vrste s preklapajućim krajevima stanica su se odvojile od ostalih stanica roda *Nitzschia* i dodijelile u rod *Pseudo-nitzschia* (Bates, 2000). Stoga, sve vrste dijatomeja koje proizvode DK, osim *Amphora coffeaeformis* (čija je sposobnost proizvodnje toksina osporena) i novootkrivene *Nitzschia navis-varingica*, sad pripadaju rodu rod *Pseudo-nitzschia* (Bates, 2000). Trenutno se zbog naprednih molekularnih tehnika vrste roda *Pseudo-nitzschia* reklasificiraju (Lundholm i sur., 2003).

Pseudo-nitzschia je prvi rod dijatomeja za koje je poznato da proizvode spoj toksičan za ljude i životinje, a to je domoična kiselina. Iako je rod *Pseudo-nitzschia* vrlo rasprostranjen, u Mediteranu i stalna komponenta fitoplanktona duž Jadranske obale te dominantan rod u razredu dijatomeja, točan taksonomski sastav još nije poznat. Do sada je u svjetskim morima determinirano više vrsta: *Pseudo-nitzschia australis* (Cusack i sur., 2002), *P. calliantha* (Besiktepe i sur., 2008), *P. pseudodelicatissima* (Pan i sur., 2001), *P. multiseries* (Baugh i sur., 2006), *P. seriata* (Fehling i sur., 2004), *P. fraudulenta* (Cusack i sur., 2002) te *P. pungens* (Trainer, 2002).

Dijatomeje roda *Pseudo-nitzschia* su karakteristične za obalne i otvorene vode. Dobro su prilagođene na različite uvjete okoliša, pa su tako prisutne pri širokom rasponu temperatura (Dortch i sur., 1997), saliniteta (Thessen i sur., 2005) i količine svjetla (Rines i sur., 2002). Vrste se mogu determinirati na osnovu detaljnijih morfoloških obilježja, odnosno broja strija i fibula, strukture areola, postojanja ili izostanka središnje pore, obliku i dužini valve (Slika 4). Većinu morfoloških obilježja možemo prepoznati samo elektronskim mikroskopom (Lelong i sur., 2012).

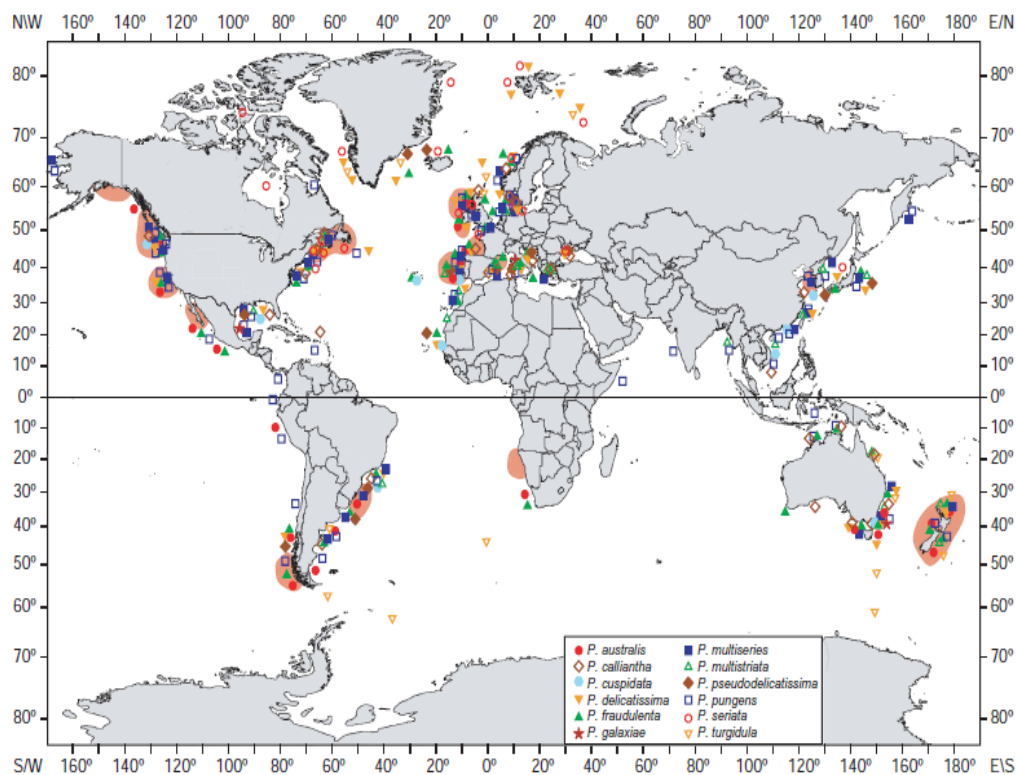


Slika 4. Ultrastruktura (SEM) različitih vrsta roda *Pseudo-nitzschia*: **(a)** lanac stanica *Pseudo-nitzschia pungens*; **(b,f)** *Pseudo-nitzschia multiseries*; **(c,g)** *Pseudo-nitzschia pungens*; **(d,h)** *Pseudo-nitzschia calliantha*; **(e,i)** *Pseudo-nitzschia seriata* (izvor: Trainer i sur., 2008).

1.5. Geografska rasprostranjenost toksičnih vrsta roda *Pseudo-nitzschia*

Ubrzo nakon trovanja 1987. godine u Kanadi, koje je prouzrokovala *Pseudo-nitzschia pungens multiseriis* i za druge vrste roda *Pseudo-nitzschia* diljem svijeta ustanovljeno je da proizvode toksine. Nakon provedenih istraživanja u danskim vodama utvrđeno je da dijatomeja *Pseudo-nitzschia seriata* Peragallo, koja je široko rasprostranjena u hladnim područjima sjeverne hemisfere, sintetizira domoičnu kiselinu sličnu onima nađenima u *Pseudo-nitzschia pungens multiseriis* u Kanadi (Hasle i sur., 1996). To je bio prvi dokaz da je DK prisutna u fitoplanktonu izvan Sjeverne Amerike i da ima ozbiljne posljedice nakon konzumacije školjkaša (Lundholm i sur., 1994).

Na Slici 5 su prikazana mjesta u svijetu gdje su identificirane toksične vrste roda *Pseudo-nitzschia*.



Slika 5. Geografska rasprostranjenost toksičnih vrsta roda *Pseudo-nitzschia*

(izvor: Trainer i sur., 2008).

Unatoč brojnim prikazanim lokacijama, samo nekoliko njih je prijavilo probleme (crvena područja na Slici 5) uzrokovane s domoičnom kiselinom (DK), pronađenom u

morskim školjkašima, pticama, sisavcima i drugim organizmima. Razlog tome je što neke vrste *Pseudo-nitzschia* ne mogu proizvesti DK na razinama koje se mogu detektirati, stanična koncentracija DK može biti niska, a i sami školjkaši zadržavaju ili eliminiraju DK u različitim stopama. Na nekim lokacijama (npr. priobalni Meksiko, Namibija, Aljaska), vrsta *Pseudo-nitzschia* koja je izvor DK kontaminacije još nije sa sigurnošću identificirana. Zanimljivo je da se toksične vrste nalaze najviše u obalnim vodama, gdje je visoka koncentracija hranjivih tvari. Povećani unos hranjivih tvari s kopna ili pojava izdizanja voda tzv. *upwelling* (engl.) mogu potaknuti opasne cvatnje mora tzv. *Harmful Algal Bloom* – HAB (engl.) (Trainer i sur., 2008). Vrste roda *Pseudo-nitzschia*, uključujući i poznate toksične vrste, pronađene su i u antarktičkim vodama, ali testiranje na sadržaj DK u školjkašima ili fitoplanktonu u tim područjima se nije istraživalo. S obzirom na prisutnost *Pseudo-nitzschia* spp. u priobalnim vodama, mnoge zemlje su uspostavile programe za praćenje prisutnosti fitotoksina u jestivom tkivu školjkaša i riba namijenjenima ljudskoj prehrani (Trainer i sur., 2008).

1.6. Ekologija i dinamika cvatnje

Fitotoksini su toksični spojevi koje proizvode alge i jedna su od najvećih prijetnji štetnih fitoplanktonskih cvatnji, poznatih kao „cvjetanje mora“, odnosno engl. *Harmful Algae Bloom* - HAB, jer mogu naštetiti ljudima i morskim organizmima (Anonimus, 2015). Cvjetanje mora, odnosno pojačano razmnožavanje određene alge može promijeniti boju površine mora u zeleno, a u posebnim slučajevima u plavo ili crveno (Slika 6), pa tako morska voda postaje mutna i puna „oblaka“. Razlog je najčešće povećana količina hranjivih tvari u moru, najčešće u obliku fosfata. Smatra se da alge toksine proizvode radi borbe protiv predatora i obrastanja drugim organizmima. Toksine najčešće proizvode dinoflagelati, dok domoćnu kiselinu proizvode dijatomeje, odnosno alge kremenjašice (Anonimus, 2015).

Hoće li se cvjetanje mora razviti, ovisi o nizu čimbenika kao što su: temperatura, slanost, jačina morskih struja, količina svjetlosti, organskog otpada, itd. Na jedan od razloga, koncentraciju hranjivih soli, utjecaj imaju dotoci sjevernojadranskih rijeka, od kojih rijeka Po unosi više od polovine ukupnog fosfora i dušika, odnosno oko 75% anorganskih oblika hranjivih soli. Najveći dio toga unosa antropogenog je podrijetla. Povišenje bilo kojeg od ovih čimbenika vodi u povećanje produktivnosti - proces poznat kao eutrofikacija. Smatra se da biotoksini nisu štetni za same školjkaše, ali njihove visoke koncentracije u tkivu školjkaša povremeno dovode do pomora predatorskih riba i ptica koje se hrane ribama, a mogu biti

uzrokom trovanja ljudi, odnosno zdravstvene neispravnosti školjkaša na tržištu (Steidinger i Tangen, 1996).

Cvjetanje toksičnih vrsta fitoplanktona u Jadranu je prvi put zabilježeno 1989. godine uz sjeverozapadnu obalu, kada je visoka koncentracija DSP toksina u mekom tkivu školjkaša prouzročila trovanje velikih razmjera kod ljudi (Ciminello i sur., 2005). Toksična cvatnja može nastati pod različitim oceanskim okolnostima i treba znati koji čimbenici su najvažniji. Toksična vrsta dijatomeje *Pseudo-nitzschia multiseriis* raste i postaje dominantna u određenom vremenu i području radi određenih bioloških čimbenika kao što su zajednica zooplanktona, mekušci filtratori, infekcije virusima i gljivicama, te neka fiziološka svojstva (Trainer i sur., 2008). *Pseudo-nitzschia* spp. također mogu imati jedinstvenu sposobnost nakupljanja tragova metala kao što je željezo i bakar dajući im konkurentnu prednost rasta nad ostalim fitoplanktonom (Trainer i sur., 2008). Okolna cirkulacija i svojstva morske vode vrše važan utjecaj na proizvodnju toksičnih tvari tijekom dijatomskog cvjetanja (Trainer i sur., 2008).



Slika 6. Cvjetanje mora (izvor:

<https://ip.index.hr/remote/indexnew.s3.index.hr/images2/crvenaplma-625calgov.jpg>).

1.7. Domoićna kiselina u hranidbenom lancu

Jedan od istaknutijih problema morskih hranidbenih mreža je kontaminacija na svim trofičkim razinama jer se toksini mogu prenositi od organizama koji se hrane filtriranjem mora na više trofičke razine. Poznati vektori prijenosa toksina osim školjkaša su: račići

veslonošci, kril *Euphausia pacifica*, rak *Cancer magister*, plaštenjaci, glavonošci, lignja *Loligo opalescens* i veliki predatori kao što je glavata uljarka, morski lavovi i morske ptice. Mogući vektori prijenosa domoične kiseline su i ribe koje se hrane filtriranjem jer predstavljaju direktnu vezu između primarnih proizvođača i sekundarnih konzumenata na višim trofičkim razinama. One su važan vektor jer im manjak akutnih simptoma tijekom otrovnih cvatnji omogućava nastavak hranjenja i nakupljanja toksina koji kasnije prelaze kroz hranidbenu mrežu na osjetljive organizme (Lefebvre i sur., 2007). Ribe imaju sposobnost aktivnog traženja hrane i potencijalno mogu ingestirati veću količinu toksičnog fitoplanktona od školjkaša. Lefebvre i sur. (2007) su odredili DK u tkivu bentičkog predatora ribe *Citharichthys sordidus* i potvrdili prisutnost DK u bentičkim hranidbenim mrežama. Zbog tako velikog broja organizama koji su potencijalno vektori prijenosa DK, ali su i uobičajeni plijen za velike predatore, domoična kiselina predstavlja opasnost za konzumente na višim trofičkim razinama (Žure, 2010).

1.8. Trovanje domoičnom kiselinom

Prvi dokumentirani slučaj trovanja školjkašima (ASP trovanje) dogodio se 1987. godine na istočnoj obali otoka Prince Edward u Kanadi. Tada se nakon konzumiranja plave dagnje *Mytilus edulis*, kontaminirane s neurotoksinom, domoičnom kiselinom, otrovalo 107 ljudi, a četiri starije osobe su preminule (Quilliam i Wright, 1989). Simptomi trovanja kod većine ljudi bili su povraćanje, grčevi, dijareja, glavobolja, vrtoglavica, dezorijentacija i gubitak kratkoročnog pamćenja (Trainer i sur., 2008). Uzrok trovanja povezan je sa sintezom domoične kiseline u dijatomeji roda *Pseudo-nitzschia pungens forma multiseriis* (Hasle, 2002). DK se akumulira kao sekundarni metabolit dijatomeja.

Pseudo-nitzschia australis Frenguelli je prouzročila masovno ugibanje organizama u zaljevu Monterey u Kaliforniji, gdje je ustanovljeno kako je sjeverni incun (*Engraulis mordax*) bio prijenosnik domoične kiseline koja je uzrokovala masovno ugibanje smeđih pelikana (*Pelecanus occidentalis*), Brantovih kormorana (*Phalacrocorax penicillatus*) i kalifornijskih morskih lavova (*Zalophus californianus*) (Žure, 2010). Ubrzo nakon slučaja tih trovanja, kanadske vlasti su donijele odredbu o maksimalnoj dozvoljenoj koncentraciji DK u tkivu školjkaša. Maksimalna dozvoljena koncentracija (MDK) je izvedena iz procijenjene količine domoične kiseline u tkivu školjkaša koje su uzrokovale trovanje i iznosi 20 µg DK/g

tkiva. MDK domoične kiseline u tkivu školjkaša od 20 µg/g, propisana je zakonskim odredbama i u drugim zemljama (Žure, 2010).

1.9. Određivanje domoične kiseline

Domoična kiselina je prvo izolirana iz kontaminiranih školjkaša pomoću standardnog biološkog testa na miševima koji se primjenjivao za određivanje PSP toksina (PSP – engl. *paralytic shellfish poisoning*) koji uzrokuje paralitičko trovanje školjkašima (AOAC, 2000). Nakon toga razvila se kvalitativna i kvantitativna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti - HPLC (engl. *High Performance Liquid Chromatography*) analiza domoične kiseline, zbog incidenta u Kanadi 1987. godine (Wright i sur., 1989). Nedavna otkrića vektora u hranidbenom lancu ističu potrebu za proučavanjem prisutnosti i kretanja DK kroz razne organizme koji su hrana iz mora. Nekoliko kromatografskih metoda uključujući fotodiode ultraljubičaste detekcije i detektor s nizom dioda (HPLC-UV-DAD) te masene spektrometrije (MS), su razvijene za kvantitativno određivanje DK u školjkama i morskom fitoplanktonu (James i sur., 2000; Lopez-Rivera i sur., 2005). Postupak HPLC-UV-DAD analize razvio je Quilliam i sur. (1995). Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s UV detekcijom (HPLC-UV) je relativno jednostavna, brza i precizna metoda. Primjenjuju se i druge analitičke metode kao što su tankoslojna kromatografija (TLC), kapilarna elektroforeza (CE) i tekućinska kromatografija s masenom spektroskopijom (LC-MS).

HPLC-UV metoda, koja je korištena od 1987. godine u regulatornim laboratorijima, je poželjna analitička tehnika za određivanje domoične kiseline u školjkama (Quilliam i sur. 1989a; Lawrence i sur., 1989). Dokazano je da HPLC-UV metoda s reverznom fazom daje najbrže i najučinkovitije određivanje domoične kiseline. Maksimum apsorbanije DA je pri 242 nm. Detekcijski limit HPLC-UV za domoičnu kiselinu je oko 10-80 ng mL⁻¹, te ovisi o osjetljivosti UV detektora. Detekcijski limit u tkivu ovisi o načinu ekstrakcije i pročišćavanja. Ako se sirovi ekstrakti školjkaša analiziraju bez pročišćavanja detekcijski limit je oko 1 µg/g. Međutim, uobičajene su smetnje koje mogu dati lažno pozitivne rezultate sa sirovim ekstraktima. Kao na primjer, triptofan i njegovi derivati koji su često prisutni u značajnim koncentracijama u tkivu školjkaša i ti se spojevi eluiraju blizu domoične kiseline (Quilliam i sur., 1989a).

Masena spektrometrija je precizna metoda koja se koristi za kvantitativno i kvalitativno određivanje domoične kiseline. Razvijeno je nekoliko metoda za određivanje DK koje kombiniraju masenu spektrometriju s tekućinskom kromatografijom (LC/MS) (Quilliam i

sur., 1989b; Thibault i sur., 1989; Lawrence i sur., 1994; Hess i sur., 2001). Najpogodnija tehnika za povezivanje tekućinske kromatografije s masenom spektrometrijom se pokazala elektrosprej ionizacija (Quilliam i sur., 1989b; Lawrence i sur., 1994). HPLC-UV metoda je najčešće korištena za rutinske regulatorne svrhe (monitoringe), a kombinacija LC-MS metode je najpoželjnija za potvrdu rezultata (Quilliam, 2003). U raznim istraživanjima, pokazalo se da je elektrosprej LC-MS vrlo obećavajuća metoda za analizu ASP toksina, kao i drugih morskih toksina (Quilliam i sur., 1989b; Lawrence i sur., 1994; Quilliam, 1996). Detekcijski limit LC-MS i HPLC-UV metoda su slični.

1.10. Dosadašnja istraživanja

Domoična kiselina se sastoji od prolinskog prstena, tri karboksilne skupine i amino skupine kojih može biti pet, zavisi od pH otopine (Falk i sur., 1989; Walter i sur., 1992). Molekula DK kiseline sadrži dvije konjugirane dvostruke veze i geometrija tih veza izravno je povezana sa interakcijom na receptoru glutamata i toksičnosti molekule (Quilliam, 2003). Prisutnost tih stabilnih diena omogućuju DK da apsorbira UV svjetlo i ima neutralni pH maksimum emisije od 242 nm koji se koristi u detekciji DK pomoću tekućinske kromatografije (Takemoto i Daigo, 1958; Falk i sur., 1989; Walter i sur., 1992, 1994; Quilliam, 2003). Domoična kiselina je relativno stabilna i ne degradira se pri sobnoj temperaturi (Johanesson, 2000; Quilliam, 2003). Međutim, zabilježena je znatna razgradnja nakon izlaganja visokim temperaturama ($>50^{\circ}\text{C}$) kao i pri izuzetno kiselim (pH 2) ili alkalnim (pH 12) uvjetima (Quilliam, 2003). Unutar tkiva školjkaša situacija je malo drugačija. McCarron i Hess (2006) su dokazali da pri konvencionalnom kuhanju u pari i autoklaviranju na 121°C tkivo dagnji je smanjilo samo ukupnu koncentraciju DK (uključujući epi-DA) za oko 3%. Bazirajući se na ovim podacima, jasno je da kuhanje neće povećati sigurnost proizvoda školjkaša ako je onečišćen s DK (Bouillon i sur., 2006). Nadalje, naboj DK se mijenja ovisno o pH mediju. U Jadranskom moru, DK je prvi put otkrivena u siječnju 2006. godine s najvećom vrijednošću od $6,5486\ \mu\text{g g}^{-1}$ u tkivu školjkaša *Mytilus galloprovincialis*, ali to je maseni udio ispod regularnih granica ($20\ \mu\text{g g}^{-1}$) i nije utvrđeno da je konzumacija školjaka ugrozila ljudsko zdravlje (Ljubešić i sur., 2011).

1.11. Svrha i ciljevi rada

Svrha ovog diplomskog rada je ispitati stabilnost domoične kiseline pri temperaturama od 37°C i 90°C i pH vrijednostima od pH ~ 3 i pH ~1.

Ciljevi diplomskog rada su:

- ustanoviti utjecaj temperature na masene udjele domoične kiseline u metanolskim ekstraktima mekog tkiva dagnji te
- ustanoviti utjecaj pH vrijednosti na masene udjele domoične kiseline u metanolskim ekstraktima mekog tkiva dagnji.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Područje sakupljanja uzoraka

Uzorci dagnje *Mytilus galloprovincialis* su prikupljeni na području južnog Jadrana, na sjevernoj obali poluotoka Pelješca u uvali Sutvid, koja je jedna od šest postaja nacionalnog monitoringa biotoksina u školjkašima u Malostonskom zaljevu (NN 12/2013).

Malostonski zaljev je zbog svojih geomorfoloških karakteristika i položaja u Jadranskom moru jedinstven s obzirom na hidrografske prilike. S jedne strane utjecaj otvorenog mora, s druge strane utjecaj rijeke Neretve, brojnih podvodnih izvora (vrulja) i oborina koje ispiru strme obale, donoseći sa sobom mineralne tvari i organski detritus i na taj način utječu na relativno uzak i plitak zaljev. Ekološke prilike u Malostonskom zaljevu najviše ovise o utjecajima s kopna, a manjim dijelom s otvorenog mora; odnosno o morskim strujama koje pokreću i miješaju vodene mase različitog porijekla i prirodnih svojstava. Unutrašnji dio Malostonskog zaljeva pruža izrazito povoljne uvjete za razvoj odraslih i ličinačkih stadija školjkaša, koji se tamo uzgajaju (Radetić, 2010). Koordinate geografske širine uvale Sutvid su 42,916014 N, 17,473249 E (Anonimus, 2018b) (Slika 7).

Dagnje su uzorkovane dana 24. travnja 2017. godine. Prikupljeni uzorak dagnji (~ 2 kg) je u laboratoriju zamrznut na temperaturi od -20°C. Nakon dva tjedna u zamrzivaču, dagnje su odleđene i započela je priprema uzoraka tkiva.



Slika 7. Uvala Sutvid (izvor: <http://www.janjina.croatia1.com/uvod-hr.htm>).

2.2. Obrada uzoraka

Za pripremu uzoraka dagnji i analizu na tekućinskom kromatografu s masenim spektrometrom LC-MS (Agilent Technologies 6410 Triple Quad) korištena je Radna uputa za određivanje masenog udjela ASP i lipofilnih toksina u mekom tkivu školjkaša LC-MS/MS metodom (Ujević, 2017) u Laboratoriju za plankton i toksičnost školjkaša Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu. Za statističku obradu podataka korišten je t-test i Wilcoxon test.

Za pripremu i obradu uzoraka korištena je sljedeća oprema:

- blender za homogeniziranje,
- analitička vaga,
- epruvete,
- vorteks,
- boca štrcaljka,
- centrifuga,
- viali, V = 2 mL,
- vodena kupelj,
- pH metar.

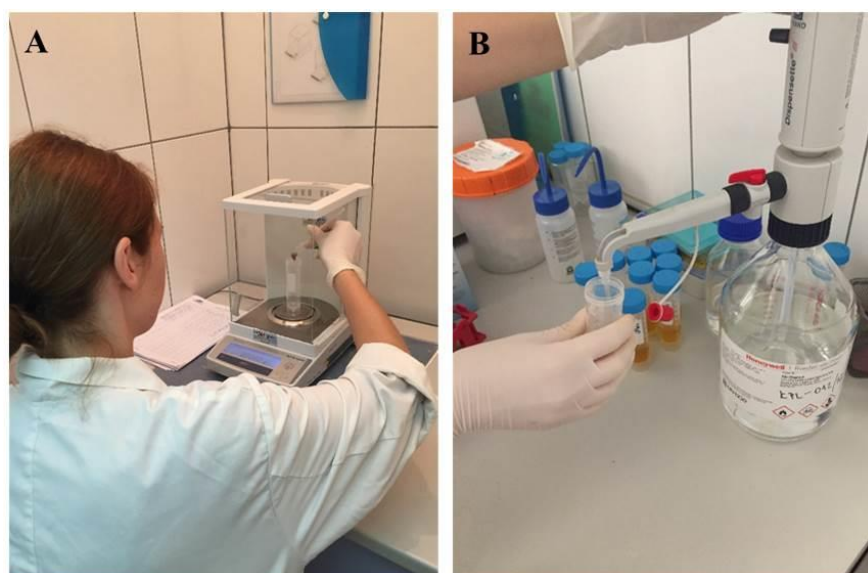
Od kemikalija su korištene:

- deionizirana destilirana voda ili HPLC voda,
- acetonitril, 99,93%, HPLC grade ili za LCMS,
- metanol, 99,93%, HPLC grade,
- mravlja kiselina, za LC-MS
- amonijev formijat, za LC-MS,
- standardna kalibracijska otopina za analizu domoične kiseline: NRC-CRM-DA za ASP toksine.

Meko tkivo dagnje se odvojilo od ljušture uz uklanjanje morske vode prema Radnoj uputi za određivanje masenog udjela ASP i lipofilnih toksina u mekom tkivu školjkaša LC-MS/MS metodom (Ujević, 2017), nakon čega je izvagano 100 g tkiva koje se homogeniziralo u blenderu na 3 minute pri brzini od 22 000 okretaja u minuti. Zatim se homogenizirano tkivo prenijelo u plastičnu posudu i stavilo u zamrzivač na 2 tjedna na temperaturu od -20°C.

Za potrebe eksperimenta, na analitičkoj vagi odvagano je $2,00 \pm 0,05$ g odmrznutog homogeniziranog tkiva dagnji u šest epruveta volumena 50 mL (Slika 8A) te je dodano 9 mL otopine metanola za ekstrakciju (Slika 8B). U metanolski ekstrakt dagnji (šest uzoraka: D1 –

D6) dodana je standardna otopina domoične kiseline prema Tablici 1. Nakon dodavanja standardne otopine domoične kiseline metanolski ekstrakti su se vorteksirali 2 min na 2500 okretaja u minuti (Slika 9A), a nakon vorteksiranja centrifugirali 10 minuta pri 3000 okretaja u minuti (Slika 9B). Poslije centrifugiranja, tekućina se od taloga odvojila u odgovarajuće epruvete volumena 50 mL.



Slika 8. Vaganje homogeniziranog uzorka dagnje na analitičkoj vagi (A) i dodavanje metanola u epruvete s odvaganim homogeniziranim tkivom (B).

Tablica 1. Priprema uzoraka tkiva dagnje nakon odmrzavanja za eksperiment.

Domoična kiselina, maseni udio ($\mu\text{g/mL}$)	Masa uzorka (g)	V (μL) otopine standarda domoične kiseline	Konačni maseni udio DK u uzorku ($\mu\text{g/g}$)	Izmjerena masa uzorka (dagnje) (g)	Oznaka uzorka
103,3	2,0	290,0	15,0	2,0023	D1
103,3	2,0	387,0	20,0	2,0224	D2
103,3	2,0	484,0	25,0	2,0005	D3
103,3	2,0	581,0	30,0	2,0556	D4
103,3	2,0	290,0	15,0	2,0991	D5
103,3	2,0	387,0	20,0	2,0187	D6



Slika 9. Vorteksiranje uzorka dagnje pri maksimalnoj brzini (A) i stavljanje uzoraka u centrifugu s istim brojem epruveta na svakoj strani (B).

U zaostali talog se ponovno dodalo 9 mL metanola za ekstrakciju te su se ponovile aktivnosti pripreme: vorteksiranje 2 minute na 2500 okretaja u minuti i centrifugiranje 10 minuta pri 3000 okretaja u minuti. Nakon centrifugiranja, tekući dio iznad taloga se dodao u otopinu metanolskog ekstrakta koji je dobiven nakon prve ekstrakcije. Konačni volumen do 20 mL je po potrebi korigiran dolijevanjem otopine metanola.

Dvije od šest epruveta (uzorci D5 i D6) prenesene su u vodenu kupelj pri 90°C tijekom 30 minuta (Slika 10). Preostale četiri (D1 – D4) epruvete koje su predstavljale kontrolnu skupinu su ostavljene na sobnoj temperaturi od 23°C.

Metanolskim ekstraktima uzoraka D5 i D6, nakon grijanja na 90°C, 30 minuta, i uzorcima kontrolne skupine na sobnoj temperaturi (23°C), izmjerena je pH vrijednost s pH-metrom da bi provjerili eventualnu promjenu pH vrijednosti s povećanjem temperature. Obzirom da je svrha ovog diplomskog ustanoviti stabilnost domoične kiseline pri promjenama temperature znači da se pri tom pH ne mijenja, bilo je potrebno ustanoviti da promjena temperature (90°C) ne utječe na promjenu pH. U Tablici 2 navedene su pH vrijednosti u metanolskim ekstraktima na temperaturama od 23°C i 90°C.

Tablica 2. pH vrijednosti u metanolskim ekstraktima kontrolne skupine (D1 – D4) i eksperimentalne skupine (D5 i D6).

Oznaka uzorka	Temperatura	pH
D1	23°C	6,18
D2	23°C	6,22
D3	23°C	6,22

D4	23°C	6,25
D5	90°C	6,12
D6	90°C	5,96



Slika 10. Ampula domoične kiseline (A) i mjerenje temperature u vodenoj kupelji (B).

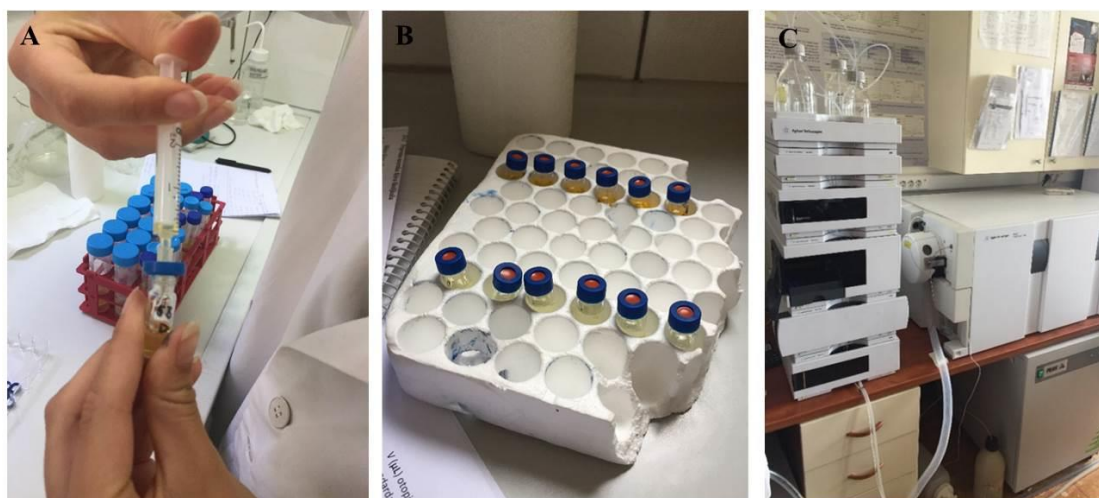
Nakon provjere pH vrijednosti (Tablica 2) uzorcima metanolskog ekstrakta promijenjen je pH dodatkom otopine HCl, da bi se dobila vrijednost pH približno 3 ili 1. Odabrane pH vrijednosti odgovaraju vrijednostima pH u želucu čovjeka, a to je između 1,5 i 3. Za promjenu pH metanolskog ekstrakta s približno 6 na približno 3, u epruvete je dodano 150-200 μ L HCl-a. Nakon dodavanja HCl-a, slijedilo je grijanje uzoraka u vodenoj kupelji 30 minuta na temperaturi od 37°C, a nakon grijanja, uzorci su izvađeni iz kupelji i ostavljeni da se ohlade. Ohlađenim metanolskim ekstraktima se ponovno izmjerila pH vrijednost zbog mogućeg utjecaja temperature na pH (Tablica 3). Zabilježene su neznatne promjene pH, moguće zbog isparavanja otapala.

Tablica 3. pH vrijednosti u metanolskim ekstraktima nakon dodavanja otopine HCl-a i nakon tretiranja u vodenoj kupelji na 37°C.

Oznaka uzorka	pH (nakon dodavanja HCl)	Temperatura	pH
D7	2,85	37°C	2,20
D8	2,22	37°C	1,87
D9	2,78	37°C	2,35
D10	2,65	37°C	2,24
D11	3,22	37°C	2,81
D12	3,22	37°C	2,84

Tako pripremljeni metanolski ekstrakti su filtrirani u viala volumena 1,5 mL (Slika 11A), a ostatku metanolskog ekstrakta koji je ostao u plastičnim epruvetama ponovno se snizila vrijednost pH na približno 1. Za promjenu pH metanolskog ekstrakta s približno 3 na približno 1 u epruvete je dodano 150-200 μ L HCl-a. Slijedila je provjera vrijednosti pH uz ponovno grijanje uzoraka na temperaturi od 37°C na 30 minuta u vodenoj kupelji (Tablica 4).

Nakon hlađenja uzoraka, provjerena je pH vrijednost, a uzorci su filtrirani u viala. Epruvete su vraćene u hladnjak na pohranu pri temperaturi od 4°C, a viali su postavljeni u tekućinski kromatograf s masenim spektrometrom za daljnu obradu (Slika 11B, C).



Slika 11. Filtriranje otopine u viala (A) i viali (B) s metanolskim ekstraktom spremni za tekućinski kromatograf s masenim spektrometrom (C).

Tablica 4. Najniže pH vrijednosti u metanolskim ekstraktima nakon dodavanja otopine HCl-a i nakon tretiranja u vodenoj kupelji na 37°C.

Oznaka uzorka	pH (nakon dodavanja HCl)	Temperatura	pH
D13	1,56	37°C	1,35
D14	1,51	37°C	1,30
D15	1,58	37°C	1,35
D16	1,56	37°C	1,33
D17	1,43	37°C	1,16
D18	1,55	37°C	1,28

Skupni prikaz svih prethodno opisanih pripremljenih uzoraka (D1 – D18) pri različitim pH vrijednostima (pH 6, 3 i 1) koji su korišteni za obradu u tekućinskom kromatografu s masenim spektrometrom su dani u Tablici 5.

Tablica 5. Volumen standardne otopine domoične kiseline (DK) dodan u metanolski ekstrakt dagnji za mjerenje pri različitim pH vrijednostima metanolskih ekstrakata i njihove oznake.

Standardna otopina DK maseni udio ($\mu\text{g/mL}$)	m uzorka (g)	V otopine standarda DK (μL)	maseni udio DK u uzorku ($\mu\text{g/g}$)	masa dagnje (g)	Oznaka uzoraka		
					pH 6	pH 3	pH 1
103,3	2,0	290,0	15,0	2,0023	D1	D7	D13
103,3	2,0	387,0	20,0	2,0224	D2	D8	D14
103,3	2,0	484,0	25,0	2,0005	D3	D9	D15
103,3	2,0	581,0	30,0	2,0556	D4	D10	D16
103,3	2,0	290,0	15,0	2,0991	D5	D11	D17
103,3	2,0	387,0	20,0	2,0187	D6	D12	D18

2.3. Određivanje domoične kiseline na LC-MS/MS

Vezani sustav tekućinske kromatografije i maseni spektrometar korišten je za kvalitativno i kvantitativno određivanje domoične kiseline u metanolskom ekstraktu mekog tkiva školjkaša. Ovim sustavom moguće je domoičnu kiselinu odjeliti iz ekstrakta tekućinskom kromatografijom i detektirati na masenom spektrometru. Mjerenjima na LC-MS/MS sustavu prethodi optimizacija uvjeta rada za pojedini analit, a u ovom radu analit je domoična kiselina. Parametri koji se određuju tijekom optimizacije su: prekursor ion, produkt ion, polaritet, fragmentor i energija kolizije.

Metodom kromatografije odjeljuju se komponente (spojevi) koji se nalaze u pripremljenom uzorku između dvije faze: pokretne i nepokretne. Kod tekućinske kromatografije pokretna ili mobilna faza je tekuća, a nepokretna ili stacionarna je kruta i to je kromatografska kolona. Odjeljivanje komponenti iz uzorka koji mobilnom fazom dolazi na stacionarnu fazu moguće je temeljem različitog vremena zadržavanja na stacionarnoj fazi, tzv. retencijsko vrijeme ili vrijeme zadržavanja komponente. Retencijsko vrijeme ovisi o trajanju interakcije komponente sa stacionarnom fazom. U ovom radu korišten je Agilent HPLC koji se sastoji od sljedećih dijelova: odzračivač - Degasser 1200, kvaterna pumpa - Quaternary Pump 1200, automatski uzorkivač - Auto sampler 1290, termostat za kolonu i termostatirano kućište kolone - Thermostatted Column Compartment 1290.

Uvjeti rada na tekućinskom kromatografu su:

- C18 kolona za kromatografiju na reverznoj fazi 50 x 2,1 mm, veličine čestica 2,7 μm , (Poroshell C18),

- temperatura kolone: 30°C,
- brzina protoka: 0,3 mL/min,
- volumen injektiranja: 5 μ L (pozitivan polaritet), volumni udjeli mobilnih faza za mjerenja (Tablica 6).

Uvjeti rada na masenom spektrometru su određeni tijekom optimizacije, a navedeni su u Tablici 7.

Tablica 6. Udjeli mobilnih faza A i B u kromatografskom sustavu vezanom na maseni spektrometar tijekom mjerenja domoične kiseline.

Udio A	Udio B	Vrijeme
90 %	10 %	0 min
20 %	80 %	4 min
20 %	80 %	6 min
90 %	10 %	6,5 min
90 %	10 %	11 min

Tablica 7. Parametri mjerenja u masenom spektrometru: prekursor ioni, produkt ioni, polaritet, vrijednosti fragmentora i energije kolizije za DK.

Analit	prekursor ion	produkt ion	polaritet	fragmentor	Energija kolizije
Domoična kiselina	312,0	266	poz.	110	12
		248			14

Molekule analita, domoične kiseline se ioniziraju djelovanjem snopa elektrona te prelaze u pozitivno nabijene ione. Tako nastali ioni nazivaju se molekulski ioni ili prekursor ioni. Zatim se molekulski ioni pod djelovanjem energije kolizije fragmentiraju (cijepaju) na dva ili više fragmenata od kojih se mjere oni čija je brojnost najveća i koji su specifični za domoičnu kiselinu. Tako nastali ioni nazivaju se produkt ioni. Mjerenja molekulskog iona i produkt iona u masenom spektrometru temelje se na omjeru mase i naboja (m/z). U ovom radu korišten je Agilent Triple Quad LC-MM/MS 6410 koji se sastoji od 4 osnovna dijela:

- sustava za unošenje uzorka (iz tekućinskog kromatografa),
- ionskog izvora koji stvara ione i ubrzava ih u električnom polju.
- analizatora (najčešće magnetsko polje) koji savija putanje različitih iona i tako ih razdvaja ovisno o omjeru njihove mase i naboja (m/z),
- detektora u kojem se razdvojeni ioni skupljaju i karakteriziraju.

Masene koncentracije su izračunate primjenom metode kalibracijskog pravca. Izmjerene su standardne otopine poznatih masenih koncentracija te je dobiven kalibracijski

pravac (Slika 12) koji se primjenjuje za određivanje masene koncentracije u nepoznatom uzorku.

Maseni udio (γ) domoične kiseline u svakom uzorku izračunat je prema sljedećoj formuli:

$$\gamma (\mu\text{g/kg}) = (A_u - a) / b \times V_t \times R \text{ gdje je:}$$

A_u – površina pika izmjerena za toksin u uzorku

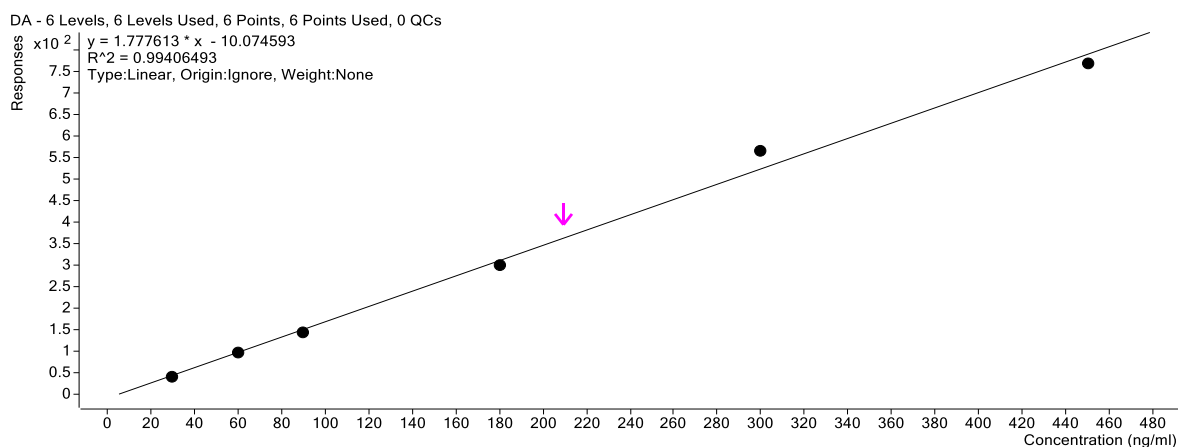
b – nagib kalibracijskog pravca

a – odsječak na osi x

m – masa uzorka (cca 2 g)

V_t – ukupni volumen metanolskog ekstrakta (20 mL)

R – faktor razrijeđenja, ako je metanolski ekstrakt razrijeđen



Slika 12. Kalibracijski pravac domoične kiseline, linearni odnos masene koncentracije standardnih otopina domoične kiseline (30, 60, 90, 180, 300 i 450 ng/mL) i odgovora instrumenta.

3. REZULTATI

Rezultati masene koncentracije i masenog udjela domoične kiseline u uzorcima tkiva dagnji dobiveni analizom na LC-MS/MS sustavu su prikazani u Tablici 8.

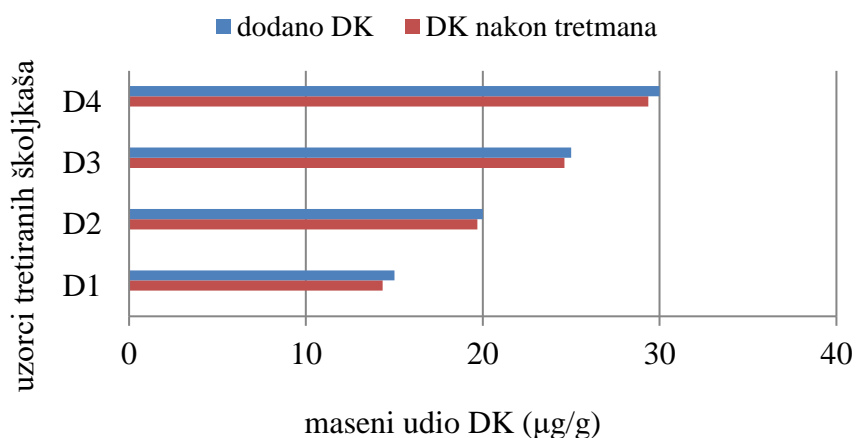
Tablica 8. Masena koncentracija domoične kiseline (ng/mL) i izračunati maseni udjeli ($\mu\text{g/g}$) u uzorcima dagnji iz eksperimenta.

Oznaka uzoraka	masa uzorka (g)	Masena koncentracija DK (ng/mL)	Maseni udio DK ($\mu\text{g/g}$)	Srednja vrijednost masenog udjela DK ($\mu\text{g/g}$)
D 1	2,0023	1389,9979	13,8840	14,3451
		1368,9698	13,6740	
		1512,9527	15,1121	
		1472,7327	14,7104	
D 2	2,0224	1965,4593	19,4369	19,6872
		1918,7097	18,9746	
		2030,7204	20,0823	
		2048,1932	20,2551	
D 3	2,0005	2441,3960	24,4079	24,6127
		2406,3725	24,0577	
		2577,6632	25,7702	
		2422,1215	24,2152	
D 4	2,0556	3101,3403	30,1746	29,3572
		2874,7148	27,9696	
		3037,5937	29,5543	
		3055,6747	29,7302	
D 5	2,0991	1194,5108	11,3812	11,9867
		1173,0077	11,1763	
		1305,1722	12,4355	
		1359,5620	12,9538	
D 6	2,0187	1825,1769	18,0827	18,1367
		1731,1602	17,1512	
		1905,0487	18,8740	
		1861,1148	18,4387	
D 7	2,0023	1373,6531	13,7208	14,3015
		1402,2538	14,0064	
		1465,9248	14,6424	
		1485,3495	14,8364	
D 8	2,0224	1635,9171	16,1780	17,4154
		1683,9438	16,6529	
		1922,6483	19,0135	
		1801,6733	17,8172	

D 9	2,0005	2446,5041	24,4589	24,7144
		2450,4269	24,4981	
		2493,2704	24,9265	
		2498,0251	24,9740	
D 10	2,0556	2903,5220	28,2499	29,5762
		3032,5364	29,5051	
		3132,5642	30,4783	
		3090,7379	30,0714	
D 11	2,0991	1181,0917	11,2533	11,9011
		1207,3055	11,5031	
		1300,9966	12,3958	
		1306,9185	12,4522	
D 12	2,0187	1846,7572	18,2965	19,4696
		1958,8954	19,4075	
		1986,5192	19,6812	
		2068,5002	20,4934	
D 13	2,0023	955,7073	9,5461	9,6714
		914,4027	9,1335	
		1027,8454	10,2666	
		975,0612	9,7394	
D 14	2,0224	1133,7581	11,2120	12,0737
		1222,4429	12,0890	
		1212,9946	11,9956	
		1314,3590	12,9980	
D 15	2,0005	1651,4287	16,5102	17,0527
		1637,7758	16,3737	
		1773,7852	17,7334	
		1759,8073	17,5937	
D 16	2,0556	1950,5659	18,9781	19,9966
		1994,6973	19,4074	
		2098,8133	20,4204	
		2176,9337	21,1805	
D 17	2,0991	670,0989	6,3846	6,6480
		675,6136	6,4372	
		712,2703	6,7864	
		732,9980	6,9839	
D 18	2,0187	1135,9646	11,2544	12,0321
		1210,1112	11,9890	
		1216,2257	12,0496	
		1295,5426	12,8354	

Kontrolnu skupinu su činili uzorci u koje je dodan određeni volumen standardne otopine domoične kiseline pri sobnoj temperaturi, kako bi maseni udjeli iznosili 15, 20, 25 i 30 µg/g (Tablica 5). Analiza ovih uzoraka na LC-MS/MS sustavu je pokazala da su izmjereni

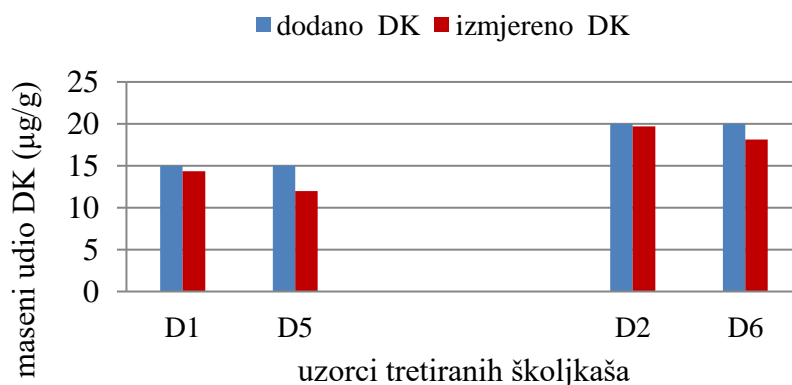
maseni udjeli domoične kiseline neznatno manji od očekivanog rezultata i iznose 95,6 – 98,5 % od teoretske (dodane) vrijednosti (Slika 13). Takavi rezultati potvrđuju uspješnu optimiziranost pripreme uzoraka i metode analize na LC-MS/MS te pokazuju reproducibilnosti i stabilnost DK u metanolskom ekstraktu prije termičke obrade i promjene pH.



Slika 13. Maseni udjeli domoične kiseline (DK) u uzorcima dagnji nakon tretmana standardnom otopinom domoične kiseline, kontrolna skupina (na sobnoj temperaturi i bez promjene pH vrijednosti otopine ekstrakta).

3.1. Domoična kiselina u metanolskim ekstraktima dagnji pri temperaturi od 90°C

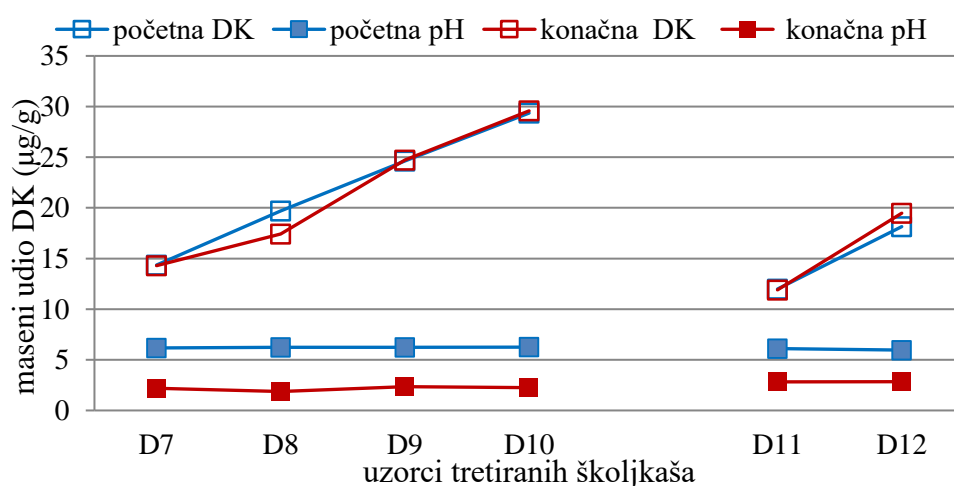
Utjecaj temperature na stabilnost domoične kiseline ispitan je mjerenjem domoične kiseline u uzorcima D5 i D6 koji su 30 min bili na 90°C, tako da je srednja vrijednost masenog udjela DK u uzorku D5 iznosila 11,9867 µg/g, a u uzorku D6 18,1367 µg/g. Rezultati mjerenja DK u uzorcima D5 i D6 su uspoređeni s rezultatima mjerenja uzoraka istih teoretskih masenih udjela (D1 i D2) pri temperaturi od 23°C. Rezultati su pokazali (Slika 14) da su maseni udjeli DK nešto niži nakon tretiranja temperaturom na 90°C (79,9% i 90,7% teoretske ili dodane vrijednosti) u odnosu na uzorke tretirane temperaturom od 23°C (95,9% i 98,4% teoretske ili dodane vrijednosti).



Slika 14. Maseni udjeli domoične kiseline (DK) u kontrolnim uzorcima dagnji D1 i D2 pripremljenih na sobnoj temperaturi (23°C) i u uzorcima D5 i D6 nakon tretmana na temperaturi od 90°C.

3.2. Domoična kiselina u metanolskim ekstraktima dagnji pri pH ~ 3

Na slici 15 prikazani su rezultati mjerenja DK pri pH 6 i pH 3 i može se vidjeti da je stabilnost DK vrlo visoka i maseni se udjeli ne mijenjaju značajno pri pH 3. Maseni udjeli domoične kiseline izmjereni u ekstraktima pri pH ~ 3 iznose 88,5 – 107,3 % početne vrijednosti (iskorištenje), izmjerene u ekstraktima prije promijene pH, odnosno pri pH ~ 6 (Tablica 9).



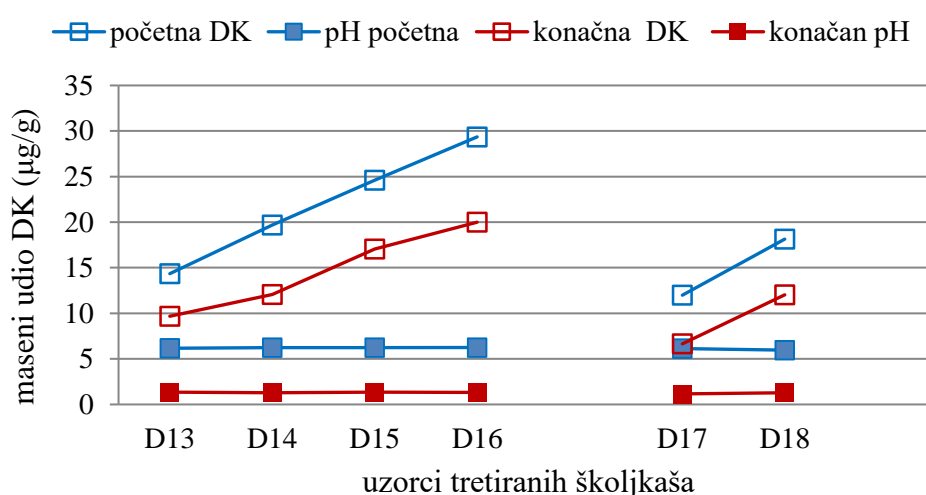
Slika 15. Maseni udjeli domoične kiseline (DK) u uzorcima dagnji prije snižavanja pH vrijednosti (~ 6) i nakon snižavanja na ~ 3.

Tablica 9. Iskorištenje (I) domoične kiseline u metanolskim ekstraktima tkiva dagnji pri pH ~ 1, 3 i 6.

	pH ~ 3	I (%)	pH ~ 1	I (%)
	2,20	99,7	1,35	67,4
	1,87	88,5	1,3	61,3
	2,35	100,4	1,35	69,3
	2,24	100,7	1,33	68,1
	2,81	99,3	1,16	55,5
	2,84	107,3	1,28	66,3
najniža vrijednost		88,5		55,5
najviša vrijednost		107,3		69,3
srednja vrijednost		99,3		64,7

3.3. Domoična kiselina u metanolskim ekstraktima dagnji pri pH ~ 1

U uzorcima metanolskih ekstrakta dagnji pri pH ~ 1 izmjerni su maseni udjeli domoične kiseline niži nego u metanolskim izorcima pri pH ~ 6 (Slika 16). Dakle, ustanovljeno je da vrijednost pH ~ 1 utječe na stabilnost domoične kiseline. Maseni udjeli domoične kiseline izmjereni u ekstraktima pri pH ~ 1 iznose 55,5 – 69,3 % početne vrijednosti (iskorištenje), izmjerene u ekstraktima prije promijene pH, odnosno pri pH ~ 6 (Tablica 9).



Slika 16. Maseni udjeli domoične kiseline (DK) u uzorcima dagnji prije snižavanja pH vrijednosti (~ 6) i nakon snižavanja na ~ 1.

Dakle, nakon snižavanja pH na 1 ustanovljen je značajniji utjecaj pH na stabilnost domoične kiseline. U prilog tome su rezultati statističkih testova: t-test i Wilcoxon test. Značajne razlike su ustanovljene za masene udjele DK u uzorcima pri pH 1 i 3 (t-test: $p=0,00004$ i Wilcoxon test: $p=0,0277$), kao i za masene udjele DK u uzorcima pri pH 1 i 6 (t-test: $p=0,0006$ i Wilcoxon test: $p=0,0277$). Maseni udjeli DK u uzorcima pri pH 3 i 6 nisu statistički značajno različiti (t-test: $p=0,9402$ i Wilcoxon test: $p=0,7531$).

4. RASPRAVA

U ovom diplomskom radu korištene su dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) s područja Sutvid (Malostonski zaljev) u svrhu određivanja stabilnosti domoične kiseline pri promjenama temperature i pH vrijednosti. Domoična kiselina je dodana u količini koja je rezultirala masenim udjelima 15, 20, 25, 30 $\mu\text{g DK/g}$ tkiva dagnje. Odabrani maseni udjeli čine 75%, 100%, 125%, i 150% od maksimalne dozvoljene količine DK u jestivom tkivu školjkaša (NN 82/2013). Nakon tretiranja temperaturom na 90°C iskorištenje je iznosilo 79,9% i 90,7% teoretske ili dodane vrijednosti, dok je za netretirane uzorke (sobna temperatura, 23°C) iznosilo 95,9% i 98,4% teoretske ili dodane vrijednosti. Najniže iskorištenje je dobiveno za uzorak najnižeg teoretskog masenog udjela 15 $\mu\text{g/g}$, kod kojeg gubitak analita prilikom pripreme uzorka značajnije utječe na rezultat, osim toga manja je preciznost instrumenta kod nižih količina analita. Niži masni udjeli DK u kuhanim uzorcima mogu biti i rezultat većeg udjela tkiva hepatopankreasa u uzorcima (McCarron i Hess, 2006). Autori McCarron i Hess (2006), također su ustanovili smanjenje količine DK (3%) nakon kuhanja uzoraka dagnji u pari kao i pri temperaturama višim od 100 °C kod autoklaviranja. Oni su ispitali utjecaj temperature na udio DK u cijelom tkivu te hepatopankreasu i ostatku tkiva mjerenjem DK u svježem i kuhanom uzorku. Iako su ustanovili da je ukupni rezultat pokazao naznatno smanjenje DK, maseni udjeli DK nakon kuhanja smanjeni su u hepatopankreasu, a povećani u ostatku tkiva što upućuje na različitu promjenu organa dagnji tijekom toplinske obrade, na različit sadržaj vode u tkivima i na utjecaj udjela pojedinog tkiva na konačan rezultat. Rezultati istraživanja koje su proveli McCarron i Hess (2006) pokazuju slaganje s ovim radom, tj. toplinska obrada uzorka ne može značajno smanjiti sadržaj DK u dagnjama. Ovo je važno zbog rutinskih programa praćenja s obzirom na potencijalni utjecaj obrade uzorka (ako uključuje zagrijavanje uzoraka) na rezultate. Također su važne informacije za komercijalnu obradu školjaka jer rezultati upućuju na to da tehnike prerade koje uključuju toplinsku obradu vjerojatno neće biti korisne u smanjenju sadržaja DK. Međutim, rezultati također upućuju na to da postupci komercijalne obrade vjerojatno neće dovesti do povećanja sadržaja DK u školjkašima.

Istraživanje utjecaja pH vrijednosti, od pH 6 do pH 3 i 1 na temperaturi 37°C pokazalo je utjecaj niskih pH vrijednosti na stabilnost DK. Iskorištenja za DK nakon snižavanja pH metanolskih ekstrakta s 6 na 3 su bila od 88,5 – 107,3 %, a pri snižavanju pH s 3 na 1 od 55,5 – 69,3 %, dok je iskorištenje za kontrolnu skupinu iznosilo 95,6 – 98,5 %. Rezultati su pokazali značajniji utjecaj pH na stabilnost domoične kiseline, pri čemu su značajne razlike

ustanovljene za masene udjele DK u uzorcima pri pH 1 i 3, kao i za masene udjele DK u uzorcima pri pH 1 i 6, dok se maseni udjeli DK u uzorcima pri pH 3 i 6 nisu statistički značajno razlikovali. Najniže iskorištenje za DK (55,5 %) evidentirano je za uzorak u kojem je izmjeren najniži pH (1,16). Domoična kiselina je aminokiselina koja sadrži tri karboksilne skupine i jednu amino skupinu te njena topljivost i struktura ovisi o različitim pH vrijednostima (mijenja se protoniranost molekule). Osim smanjenja sadržaja DK u uzorcima s niskim pH smanjuje su i toksičnosti DK (Nijjar i Madhyastha, 1997). Autori Nijjar i Madhyastha (1997) istraživali su toksičnost DK na eksperimentalnim životinjama (miševima) nakon intraperitonealne aplikacije DK različitih pH vrijednosti. Ustanovili su da je toksičnost bila najniža kod najniže ispitivane pH vrijednosti 3,7 dok je najviša bila kod najviše ispitivane pH vrijednosti 7,4. Kako konzumacija školjkaša zahtjeva samo higijenski i zdravstveno ispravne školjkaše, prilikom konzerviranja ili obrade potrebno je paziti na promjenu pH jer može utjecati na sadržaj i toksičnost DK. Zbog istih razloga važno je kontrolirati pH uzoraka prilikom priprema za analize na LC-MS/MS sustavu.

Prisutnost domoične kiseline u školjkašima koji su namijenjeni za prehranu povod je za istraživanja utjecaja temperature i pH na stabilnost domoične kiseline. Neka područja proizvodnje školjkaša često su zatvorena zbog prisutnosti visokih razina DK u različitim vrstama. Tako je prisutnost DK je dokumentirana u Australiji, Novom Zelandu, ali uglavnom je prisutna u sjevernoameričkom obalnom području i zapadnoj Europi (Saeed i sur., 2017; Rodriguez i sur., 2018). U Europi je zabilježena prevalencija DK u divljim i kultiviranim školjkašima na obali Portugala, mediteranskim područjima Francuske, Italije, otoka Man (Irsko more), Galicije (sjeverozapadna Španjolska) i Grčke (Saeed i sur., 2017).

5. ZAKLJUČAK

Povišena temperatura otopine ne utječe na stabilnost domoične kiseline. Promjena pH otopine u kojoj se nalazi domoična kiselina utječe značajno na stabilnost jedino kod niskih pH, približno 1. Srednja vrijednost iskorištenja DK u uzorcima u kojima je pH snižen na približno 1 iznosi 69,3%. Domoična kiselina je neurotoksin koji uzrokuje trovanje ljudi nakon konzumacije toksičnih školjkaša. Trovanje se očituje u gastrointestinalnim i neurološkim smetnjama od blažih do izrazito jakih simptoma. Obzirom da temperatura pripremanja i približno neutralna pH otopina u kojima se nalazi ne mijenja količinu domoične kiseline, potrebno je stalno praćenje sadržaja domoične kiseline u tkivu školjkaša koji su namijenjeni za ljudsku prehranu.

6. LITERATURA

- Anonimus 2015. Cvjetanje mora. Dostupno sa: https://hr.wikipedia.org/wiki/Cvjetanje_mora, pristupljeno ožujak, 2018.
- Anonimus 2016. Mediteranska dagnja. Dostupno sa: https://hr.wikipedia.org/wiki/Mediteranska_dagnja, pristupljeno: ožujak, 2018.
- Anonimus 2017. Ministarstvo Poljoprivrede, Uprava Ribarstva. Dostupno sa: <https://ribarstvo.mps.hr/default.aspx?id=14>, pristupljeno srpanj, 2018.
- Anonimus 2018a. Pelješac. Dostupno sa: <https://hr.wikipedia.org/wiki/Pelješac>, pristupljeno: lipanj, 2018.
- Anonimus 2018b. Uvala Sutvid na google map karti. Dostupno sa: <http://www.map.com.hr/uvala-sutvid>, pristupljeno: lipanj, 2018.
- AOAC. 2000. Official Method 959.08. Paralytic shellfish poison, biological method. AOAC International 42, USA.
- Bates SS. 2000. Domoic-acid-producing diatoms: another genus added! *Journal of Phycology*, 36: 978-983.
- Bates SS, Garrison DL, Horner RA. 1998. Bloom Dynamics and Physiology of Domoic Acid – Producing *Pseudo-nitzschia* Species. U: Anderson DM, Cembella AD, Hallegraeff GM (ur.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Heidelberg, Springer-Verlag, str. 267-292.
- Baugh KA, Bush JM, Bill BD, Lefebvre KA, Trainer VL. 2006. Estimates of specific toxicity in several *Pseudo-nitzschia* species from the Washington coast, based on culture and field studies. *African Journal of Marine Science*, 28: 403-407.
- Besiktepe S, Ryabushko L, Ediger D, Yilmaz D, Zenginer A, Ryabushko V, Lee R. 2008. Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup at Hastle (baccilariophyta) isolated from the Black Sea. *Harmful Algae*, 7: 438-442.
- Bouillon RC, Knierim TL, Kieber RJ, Skrabal SA, Wright JLC. 2006. Photodegradation of the algal toxin domoic acid in natural water matrices. *Limnology and Oceanography*, 51: 321-330.
- Ciminello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Magano SG, Tartaglione L, Quilliam AM, Tubaro A, Polletti R. 2005. Hydrophilic interaction liquid chromatography/mass spectrometry for determination of domoic acid in Adriatic shellfish. *Rapid communications in Mass Spectrometry*, 19: 2030-2038.

- Cusack CK, Bates SS, Quilliam MA, Patching JW, Raine R. 2002. Confirmation of domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) isolated from Irish waters. *Journal of Phycology*, 38: 1106-1112.
- Dortch Q, Pool S, Mire G, Soniat TM, Turner RE, Robichaux R, Milsted D, Rabalais NN, Fryxell GA, Parsons ML. 1997. Abundance and vertical flux of *Pseudo-nitzschia* in the northern Gulf of Mexico. *Marine Ecology Progress Series*, 146: 249-264.
- EU (2002/226/EC). 2002. EU law and publications. Access to European Union law, EUR-Lex.
- Falk M, Walter JA, Wiseman PW. 1989. Ultraviolet spectrum of domoic acid. *Canadian Journal of Chemistry*, 67: 1421-1425.
- Fehling J, Green DH, Davison K, Bolch CJ, Bates SS. 2004. Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia seriata* (Bacillariophyceae) in Scottish waters. *Journal of Phycology*, 40: 622-630.
- Fiorentin C. 2016. Ovisnost odgovora biomarkera o morfološkim karakteristikama bioindikatora (*Mytilus galloprovincialis*) kvalitete mora. Završni rad, Sveučilište u Puli, 28 str.
- Gosling E. 2003. *Bivalve Molluscs, Biology, Ecology and Culture*. Blackwell Publishing, Oxford, 131 str.
- Hasle RG. 2002. Are most of the domoic acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* cosmopolites? *Harmful Algae*, 1: 137-146.
- Hasle RG, Syvertsen EE, Steidinger AK, Tangen K, Tomas RC. 1996. *Identifying marine diatoms and dinoflagellates*. Academic Press Inc. San Diego, California, 385 str.
- Hess P, Gallacher S, Bates LA, Brown N, Quilliam MA. 2001. Determination and confirmation of the amnesic shellfish poisoning toxin, domoic acid in shellfish from Scotland by liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 84: 1657-1667.
- Impellizzeri G, Oriente G, Mangiafico S, Sica D, Piattelli M, Fattorusso E, Santacroce C, Magno S. 1975. Constituents of red algae. 1. Amino-acid and low-molecular-weight carbohydrates of some marine red algae. *Phytochemistry*, 14: 1549-1557.
- James KJ, Gillman M, Amandi MF, Lopez-Rivera A, Puente PF, Lehane M, Mitrović S, Furey A. 2005. Amnesic shellfish poisoning toxin in bivalve molluscs in Ireland. *Toxicon*, 46: 852-858.
- Jeffery B, Barlow T, Moizer K, Paul S, Boyle C. 2004. Amnesic shellfish poison. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 545-557.

- Johanesson JN. 2000. Stability of domoic acid in saline dosing solutions. *Journal of AOAC International*, 83: 411-412.
- Lawrence JF, Charbonneau CF, Menard C, Quilliam MA, Sim PG. 1989. Liquid Chromatographic determination of domoic acid in shellfish products using the paralytic shellfish poison extraction procedure of the association of official analytical chemists. *Journal of Chromatography*. 462: 349-356.
- Lawrence JF, Maher M, Watston-Wright W. 1994. Effect of cooking on the concentration of toxins associated with paralytic shellfish poison in lobster hepatopancreas. *Toxicon*, 32: 57-64.
- Lefebvre KA, Noren DP, Schultz IR, Bogard SM, Wilson J, Eberhart BTL. 2007. Uptake, tissue distribution and excretion of domoic acid after oral exposure in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquatic Toxicology*, 81: 266-274.
- Lelong A, Hegaret H, Soudant P, Bates SS. 2012. *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigm. *Phycologia*, 51: 168-216.
- Lopez-Rivera A, Pinto M, Insinilla A, Isla BS, Uribe E, Alvarez G, Lehane M, Furey A, James KJ. 2009. The occurrence of domoic acid linked to a toxic diatom bloom in a new potential vector: The tunicate *Pyura chilensis* (Piere). *Toxicon*, 54: 754-762.
- Lundholm N, Skoj J, Pocklington R, Moestrup Ø. 1994. Domoic acid, the toxic amino acid responsible for amnesic shellfish poisoning, now in *Pseudo-nitzschia seriata* (Bacillariophyceae) in Europe. *Phycology*, 33: 475-478.
- Lundholm N, Moestrup Ø. 2000. Morphology of the marine diatom *Nitzschia navis-varingica* sp. nov. (Bacillariophyceae), another producer of the neurotoxin domoic acid. *Journal of Phycology*, 36: 1162-1174.
- Lundholm N, Moestrup Ø, Hasle GR, Hoef-Emden K. 2003. A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima/cuspidata* complex (Bacillariophyceae): what is *P. pseudodelicatissima*? *Journal of Phycology*, 39: 797-813.
- Lundholm N, Moestrup Ø. 2007. Intergovernmental Oceanographic Commission Taxonomic Reference List of Toxic Plankton Algae. www.bi.ku.dk/ioc/group1.asp.
- Ljubešić Z, Bosak S, Viličić D, Borojević KK, Marić D, Godričan J, Ujević I, Peharac P, Đakovac T. 2011. Ecology and taxonomy of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* species in Lim Bay (north-eastern Adriatic sea). *Harmful Algae*, 10: 713-722.
- Mačefat MR, Rogić M, Barišić D, Benedik Lj, Štrok M. 2013. Sustavno praćenje radioaktivnosti priobalnih voda Jadrana korištenjem dagnji (*Mytilus galloprovincialis*)

- kao bioindikatora. Zbornik radova Devetog simpozija Hrvatskog društva za zaštitu od zračenja, Knežević Ž, Majer M, Krajcar BI (ur.), Printing House, Zagreb, 361-366 str.
- McCarron P, Hess P. 2006. Tissue distribution and effects of heat treatments on the content of domoic acid in blue mussels, *Mytilus edulis*. *Toxicon*, 47: 473-479.
- Meda M, Kodama T, Tanaka T, Yoshizumi H, Takemoto T, Nomoto K, Fujita T. 1986. Structures of isodomoic acids A, B, and C, novel insecticidal amino acids from the red alga, *Chondria armata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 34: 4892-4895.
- Murakami S, Takemoto T, Shimizu Z. 1953. Studies on the effective principles of *Digenea simplex* aq. 1. separation of the effective fraction by liquid chromatography. *Yakugaku Zasshi-Journal of the pharmaceutical society of Japan*, 73(9): 1026-1028.
- Nijjar MS, Madhyastha MS. 1997. Effect of pH on domoic acid toxicity in mice. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 167 (1-2): 179-185.
- NN 13/2013. Plan praćenja kakvoće mora i školjkaša na proizvodnim područjima i područjima za ponovno polaganje živih školjkaša. *Narodne novine 13*, Zagreb.
- NN 82/2013. Zakon o veterinarstvu. 2013. *Narodne novine 82*, Zagreb.
- Pan Y, Parsons ML, Busman M, Moeller PDR, Dortch Q, Powell CL, Doucette GJ. 2001. *Pseudo-nitzschia* sp. Cf. *Pseudodelicatissima*-a confirmed producer of domoic acid from the northern Gulf of Mexico. *Marine Ecology Progress Series*, 220: 83-92.
- Račić V. 2013. Toksične vrste dinoflagelata i njihov potencijalni utjecaj na školjkarstvo u Malostonskom zaljevu. *Diplomski rad, Sveučilište u Dubrovniku*, 61 str.
- Radetić A. 2010. Utjecaj nekih ekoloških čimbenika na sezonske promjene indeksa kondicije uzgojnih populacija europske plosnate kamenice *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758) u Malostonskom zaljevu. *Diplomski rad, Sveučilište u Dubrovniku*, 54 str.
- Ravn H. 1995. Amnesic shellfish poison (ASP), HAB publication series. *IOC Manuals and Guides, UNESCO*, 31: 1-15.
- Ribarić B, Kozačinski L, Njari B, Cvrtila Ž. 2012. Toksini školjkaša. *Meso*, 14: 145-151.
- Rines JEB, Donaghay PL, Dekshenieks MM, Sullivan JM, Twardowski MS. 2002. Thin layers and camouflage: hidden *Pseudo-nitzschia* spp. (Bacillariophyceae) populations in fjord in the San Juan Islands, Washington, USA. *Marine Ecology Progress Series*, 225: 123-137.
- Rodriguez LP, Vieites JM, Cabado AG. 2018. Biotoxins in seafood. U: Rai VR, Bai JA (ur.) *Food Safety and Protection*. CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, str. 97-156.
- Quilliam MA. 1996. Liquid chromatography-mass spectrometry of seafood toxins. U: Barcelo

- D (ur.). Applications of LC-MS in Environmental Chemistry. Elsevier, Amsterdam, str. 415-444.
- Quilliam MA. 2001. Analytical chemistry of phycotoxins in seafood and drinking water. *Journal of AOAC International*, 84: 1615.
- Quilliam MA. 2003. Chemical methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin. U: Hallegraeff GM, Anderson DM, Cambella AD (ur.), *Manual of Harmful Marine Microalgae, Monographs on Oceanographic Methodology*. Intergovernmental Oceanographic Commission (UNESCO), Paris, 11: 247-266
- Quilliam MA, Wright JLC. 1989. The amnesic shellfish poisoning mystery. *Analytical Chemistry*, 61: 1053-1060.
- Quilliam MA, Sim PG, McCulloch AW, McInnes AG. 1989a. High performance liquid chromatography of domoic acid, a marine neurotoxin, with application to shellfish and plankton. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 36: 139-154.
- Quilliam MA, Thomson BA, Scott GJ, Siu KWM. 1989b. Ion-spray mass spectrometry of marine neurotoxins. *Rapid communications in Mass Spectrometry*, 3: 145-150.
- Quilliam MA, Xie M, Hardstaff WR. 1995. Rapid Extraction and Cleanup for Liquid Chromatographic Determination of Domoic Acid in Unsalted Seafood. *Journal of AOAC International*, 78: 543-554.
- Saeed AF, Awan SA, Ling S, Wang R, Wang S. 2017. Domoic acid: Attributes, exposure risks, innovative detection techniques and therapeutics. *Algal Research*: 24, 97-110.
- Steidinger KA, Tangen K. 1996. Dinoflagellates. U: Tomas CR (ur.), *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*. Academic press, New York: 387-598.
- Takemoto T, Daigo K. 1958. Constituents of *Chondria armata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 6: 578-580.
- Thessen AE, Dortch Q, Parsons ML, Morrison W. 2005. Effect of salinity on *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) growth and distribution. *Journal of Phycology*, 41: 21-29.
- Thibault P, Quilliam MA, Jameison WD, Boyd RK. 1989. Mass spectrometry of domoic acid, a marine neurotoxin. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*, 18: 373-386.
- Trainer VL. 2002. Harmful algal blooms on the U.S. west coast. U: Taylor FJ, Trainer VL (ur.), *Harmful Algal Blooms in the PICES region of the North Pacific*; PICES Scientific Report No. 23. North Pacific Marine Science Organization (PICES), Sidney Australia, str. 89-118.

- Trainer VL, Hickey BM, Bates SS. 2008. Toxic Diatoms. Elsevier Science Publishers, New York, 219-237.
- Ujević I, Ninčević-Gladan Ž, Roje R, Skejić S, Akrapov J, Marasović I. 2010. Domoic Acid – A New Toxin in the Croatian Adriatic Shellfish Toxin Profile. *Molecules*, 15: 6835-6849.
- Ujević I. 2017. Određivanje masenog udjela ASP i lipofilnih toksina u mekom tkivu školjkaša LC-MS/MS metodom. Radna uputa, Institut za oceanografiju i ribarstvo, str. 2-9.
- Walter JA, Leek DM, Falk M. 1992. NMR-study of the protonation of domoic acid. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie*, 70: 1156-1161.
- Walter JA, Falk M, Wright JLC. 1994. Chemistry of the shellfish toxin domoic acid: characterization of related compounds. *Canadian Journal of Chemistry*, 72: 430-436.
- Wright JLC, Boyd RK, de Freitas ASW, Falk M, Foxall RA, Jamieson WD, Laycock MV, McCulloch AW, McInes AG, Odense P, Pathak VP, Quilliam MA, Ragan MA, Sim PG, Thibault P, Walter JA, Gilgan M, Richard DJA, Dewar D. 1989. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussel from eastern Prince Edward Island. *Canadian Journal of Chemistry*, 67: 481-490.
- Wright JLC, Falk M, McInes AG, Walter JA. 1990. Identification of isodomoic acid D and two new geometrical isomers of domoic acid in toxic mussels. *Canadian Journal of Chemistry*, 68: 22-25.
- Wright JLC, Quilliam MA. 1995. 7. Methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisons. U: Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD (ur.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC Manuals and Guides. UNESCO, str. 113-133.
- Zaman L, Arakawa O, Shimosu A, Onoue Y, Nishio S, Shida Y, Noguchi T. 1997. Two new isomers of domoic acid from a red alga, *Chondria armata*. *Toxicon*, 35: 205-212.
- Zhao JY, Thibault P, Quilliam MA. 1997. Analysis of domoic acid and isomers in seafood by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 18: 268-276.
- Žure M. 2010. Određivanje domoične kiseline u školjkašima *Callista chione* (Linnaeus, 1758) i *Acanthocardia tuberculata* (Linnaeus, 1758). Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, 30 str.