

**Méthode d'analyse en physico-chimie**

**RÉFÉRENCE : ANSES / LSAiments / LSA/INS/0140 - version 04**

Novembre 2018

# Détermination de l'acide domoïque dans les mollusques, les échinodermes et les tuniciers par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la détection UV (CLHP-UV)

**Laboratoire de Sécurité des Aliments de Maisons-Alfort**

**Laboratoire National de Référence pour les Biotoxines Marines**

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis à la disposition des utilisateurs en tant que méthode d'analyse. Ce document est la propriété de l'Anses. Toute reproduction, qu'elle soit totale ou partielle, n'est autorisée qu'à la condition expresse que la source soit citée, par exemple en faisant mention de sa référence (incluant sa version et année) et de son titre.



## Historique de la méthode

Une méthode est mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

Une modification est qualifiée de majeure lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

Une modification est qualifiée de mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode, incluant la qualification des modifications.

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
V00	-		
V01	mineure		
V02	mineure		Nouvelle appellation LNRBM-ASP01
V03	mineure	31/10/2011	Détails sur l'interprétation des contrôles positifs MRC Utilisation de l'incertitude combinée élargie
V04	majeure		<ul style="list-style-type: none"><li>- Harmonisation au nouveau format de méthode ANSES (s'agissant d'une refonte complète, les modifications apportées ne sont pas apparentes dans le texte).</li><li>- Modification du domaine d'application de la méthode : extension aux coquillages du groupe 1 (échinodermes et tuniciers).</li><li>- Suppression de l'étape facultative de purification.</li><li>- Caractérisation / Validation intra-laboratoire de la méthode selon la norme NF V03-110 (2010).</li></ul>

## Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

**Anses - Laboratoire de Sécurité des Aliments de Maisons-Alfort**

Laboratoire National de Référence pour les Biotoxines Marines

Adresse : 14 rue Pierre et Marie Curie – 94701 Maisons-Alfort Cedex

Contact : [lnr.biotoxines.marines@anses.fr](mailto:lnr.biotoxines.marines@anses.fr)



## Sommaire

<b>Avant-propos</b> .....	<b>3</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>6</b>
<b>Avertissements et précautions de sécurité</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Objet et domaine d'application</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Documents de référence</b> .....	<b>8</b>
<b>3. Principe de la méthode</b> .....	<b>8</b>
<b>4. Réactifs</b> .....	<b>8</b>
<b>5. Appareillage et matériels</b> .....	<b>10</b>
<b>6. Échantillons</b> .....	<b>11</b>
6.1 Conditions d'acceptation des échantillons .....	11
6.2 Conservations des échantillons avant analyse.....	11
6.3 Conservations des échantillons ou reliquats après analyse .....	11
<b>7. Mode opératoire</b> .....	<b>12</b>
7.1 Préparation des échantillons pour analyse.....	12
7.2 Extraction, centrifugation, filtration .....	12
7.3 Analyse CLHP .....	13
<b>8. Résultats</b> .....	<b>13</b>
8.1 Contrôle de la validité des résultats .....	14
8.2 Calculs et expression des résultats.....	15
<b>9. Caractéristiques de performance de la méthode</b> .....	<b>16</b>
<b>Annexe A : Synthèse des performances de la méthode validée en intra-laboratoire</b> .....	<b>17</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>18</b>

## Table des tableaux

Tableau n° 1 : Exemple de préparation des solutions d'étalonnage.....	10
Tableau n° 2 : Contrôles qualité.....	14



## Introduction

L'acide domoïque (AD), toxine responsable de l'intoxication amnésiante liée à la consommation de coquillages (ASP, Amnesic Shellfish Poisoning), appartient au groupe d'acides aminés des kaïnoïdes.

Classés comme neuroexcitants ou excitotoxines, les kaïnoïdes interfèrent avec les mécanismes de neurotransmission dans le cerveau. La toxine peut s'accumuler dans les coquillages qui se nourrissent d'un certain nombre d'espèces *Pseudonitzschia* toxiques. L'ingestion de fruits de mer contaminés par l'acide domoïque peut entraîner une intoxication, qui se manifeste notamment par des symptômes gastro-intestinaux (crampes abdominales, vomissements, diarrhée) et/ou des symptômes neurologiques (confusion, désorientation, perte de mémoire (amnésie) ou autres signes graves tels que le coma) survenant dans les 24 à 48 heures après la consommation de coquillages contaminés. Cette famille de toxines est composée d'un analogue principal, l'acide domoïque, le plus toxique, et de plusieurs isomères : le diastéréoisomère acide épidoïque (épi-AD) et les acides isodomoïques (iso-AD),

La chromatographie liquide haute performance couplée à la détection UV (CLHP-UV) a été la toute première méthode employée pour analyser l'acide domoïque. Elle constitue encore aujourd'hui la technique la plus couramment employée pour surveiller les coquillages. La détection de l'acide domoïque est rendue possible par son absorbance élevée à 242 nm.

Cette famille de toxines est réglementée au niveau Européen ; le seuil réglementaire a été défini à 20 mg d'AD/kg de chair de coquillages et la méthode de référence est la chromatographie liquide haute performance avec détection par ultra-violet (CLHP/UV) (Règlements 853/2004/CE et 1244/2007/CE).

## **Avertissements et précautions de sécurité**

**Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation en vigueur.**

**Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutés par du personnel ayant reçu une formation appropriée.**

Les toxines amnésiantes (ASP) sont des neurotoxines qui peuvent être absorbées par voie d'inhalation ou par voie orale. Il convient de prendre des mesures de protection adéquates et notamment de:

- Porter une blouse, des lunettes de protection avec protections latérales et d'utiliser des gants adaptés à la manipulation de solvants.
- Manipuler sous une hotte ventilée. Les solvants utilisés sont toxiques et volatils.
- Bien informer le personnel ayant accès au laboratoire des risques et des précautions à prendre pour la manipulation des toxines.



## 1. Objet et domaine d'application

La présente méthode décrit un protocole de détermination de l'acide domoïque (AD) dans les mollusques bivalves (tels que les moules, huîtres, coquilles Saint-Jacques...), les échinodermes (oursins), les gastéropodes (bulots, bigorneaux), et les tuniciers (violets), qu'ils soient crus ou cuits. L'analyse peut être réalisée sur le corps entier de l'animal ou toute partie consommable séparément. Il s'agit d'une méthode quantitative par Chromatographie Liquide Haute Performance en phase inverse couplée à la détection UV (CLHP-UV).

Cette méthode est basée sur le Protocole Harmonisé du LRUE Biotoxines Marines [6] et sur la norme NF EN 14176 [7]

Pour être applicable à d'autres matrices ou à des produits transformés la méthode devra faire l'objet d'une validation intra-laboratoire.

## 2. Documents de référence

Sans objet

## 3. Principe de la méthode

L'acide domoïque (AD) et l'acide épidoïmoïque (épi-AD) sont extraits à partir d'un tissu homogénéisé par un mélange méthanol/eau (50/50). Après centrifugation, le surnageant est filtré sur un filtre à membrane et analysé par chromatographie liquide haute performance en élution isocratique avec détection UV (CLHP-UV).

La teneur en AD, exprimée comme la somme d'acide domoïque et d'acide épidoïmoïque, est calculée par étalonnage externe.

## 4. Réactifs

**Avertissement** : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

Utiliser seulement des réactifs de qualité analytique reconnue. Les solvants doivent être à minima de qualité appropriée pour l'analyse CLHP, sauf indication contraire.



#### **4.1 Eau ultra-pure (H<sub>2</sub>O, par exemple, Milli-Q®)**

#### **4.2 Méthanol (MeOH)**

#### **4.3 Acétonitrile (ACN)**

#### **4.4 Acide trifluoroacétique (TFA), de pureté ≥99%**

#### **4.5 Solvant d'extraction MeOH/H<sub>2</sub>O 50/50 v/v**

Par exemple, introduire dans une fiole jaugée de 100 ml, 50 ml MeOH (4.2) et compléter au volume avec de l'eau (4.1).

#### **4.6 Mélange ACN / H<sub>2</sub>O 10/90 v/v**

Par exemple, introduire dans une fiole jaugée de 100 ml, 10 ml ACN (4.3) et compléter au volume avec de l'eau (4.1).

#### **4.7 Phase mobile CLHP ACN 10 % avec 0,1% de TFA**

Par exemple, introduire dans une fiole jaugée de 1 000 ml, 100 ml d'ACN (4.3) et environ 400 ml d'eau (4.1), mélanger, ajouter 1 ml de TFA (4.4) et compléter au volume avec de l'eau (4.1).

#### **4.8 Etalons**

Les solutions étalons de référence peuvent être obtenues auprès de différents fournisseurs. Une liste mise à jour des matériaux de référence commercialisés est consultable sur le site internet du LRUE : [http://www.aecosan.msssi.gob.es/en/CRLMB/web/public\\_documents/seccion/materiales\\_referencia.htm](http://www.aecosan.msssi.gob.es/en/CRLMB/web/public_documents/seccion/materiales_referencia.htm).

##### **4.8.1 Acide domoïque, sous forme de solution d'étalonnage certifiée**

L'ampoule d'étalon d'acide domoïque est fournie avec une concentration certifiée. Elle est à conserver selon les spécifications du fournisseur.

■ **Note** : La solution d'étalonnage certifiée de l'Institut des biosciences marines du Conseil national de recherches du Canada (Halifax, Nouvelle-Écosse, Canada) contient, en tant que constituant mineur, de l'acide épidoïque.

##### **4.8.2 Acide domoïque, sous forme de poudre cristalline, pureté > 95 %.**

L'acide domoïque sous forme de poudre de pureté supérieure à 95% peut être utilisé pour compléter des échantillons. Dans ce cas la solution préparée doit être quantifiée par rapport à une solution étalon certifiée.

#### **4.9 Solutions étalons**

##### **4.9.1 Solution étalon de travail**

Une solution étalon de travail est préparée par dilution de la solution étalon certifiée (4.8.1). Cette solution étalon de travail permet de préparer les différents niveaux de la gamme d'étalonnage.

Par exemple, pour préparer une solution étalon de travail à 20,0 µg/ml à partir d'une solution étalon certifiée (4.8.1) à 103,3 µg/ml, diluer 40 µl de solution étalon certifiée avec 167 µl ACN 10 %

##### **4.9.2 Solutions d'étalonnage**

Préparer une série de solutions d'étalonnage, comprenant au moins 4 niveaux de concentration, en diluant la solution étalon de travail avec le mélange ACN/H<sub>2</sub>O 10/90 v/v (le tableau 1 donne un exemple de préparation des solutions d'étalonnage).

Conserver les solutions d'étalonnage à l'abri de la lumière à environ +4°C. Ne pas conserver les solutions plus de 3 mois. Ne pas les congeler.

**Tableau 1 - Exemple de préparation des solutions d'étalonnage**

Niveau	Concentration en AD (µg/ml)	Volume solution étalon de travail à 20,0 µg/ml (µl)	Volume mélange ACN/H2O 10/90 v/v (µl)	Volume solution étalonnage (µl)
0	0	0	300	300
1	0,25	15,0	1185,0	1 200,0
2	0,5	15,0	585,0	600,0
3	1,0	15,0	285,0	300,0
4	2,5	25,0	175,0	200,0
5	5,0	45,0	135,0	180,0

#### 4.10 Matériau de référence

Les matériaux de référence peuvent être obtenus auprès de différents fournisseurs. Une liste mise à jour des matériaux de référence commercialisés est consultable sur le site internet du LRUE : [http://www.aecosan.msssi.gob.es/en/CRLMB/web/public\\_documents/seccion/materiales\\_referencia.htm](http://www.aecosan.msssi.gob.es/en/CRLMB/web/public_documents/seccion/materiales_referencia.htm)

Ils sont à conserver et à utiliser conformément aux spécifications des fabricants.

## 5. Appareillage et matériels

**Avertissement :** Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

- 5.1 **Balance analytique**, capable de peser avec une précision de 0,1 mg
- 5.2 **Broyeur ménager ou homogénéiseur à couteaux** (type Grindomix GM 200<sup>®</sup>)
- 5.3 **Balance analytique**, capable de peser avec une précision de 0,01 g
- 5.4 **Homogénéisateur** (type Ultra Turrax<sup>®</sup> ou Polytron<sup>®</sup>) atteignant au moins une vitesse de 10000 tours/min)
- 5.5 **Centrifugeuse**, capable d'atteindre au moins 3000g
- 5.6 **Seringue**, de 5 ml ou 10 ml

- 5.7 Epruvettes graduées**
- 5.8 Pipettes de précision**, pour des volumes de 10 µl à 5 000 µl
- 5.9 Tubes à centrifuger en polypropylène**, d'une capacité de 50 ml
- 5.10 Flacons en verre ambré**, de volume inférieur ou égal à 2 ml, munis par exemple de bouchons sertis (pour le stockage des solutions d'étalonnage d'acide domoïque)
- 5.11 Filtres pour seringue** de porosité 0,2 µm ou 0,45 µm, compatibles avec le méthanol, par exemple en PTFE, avec préfiltres
- 5.12 Vial pour passeur automatique d'échantillons CLHP**
- 5.13 Inserts**, de 300 µl pour vials (5.12)
- 5.14 Colonne analytique en silice greffée octadecyle (C18)**, par exemple 250 mm (longueur) x 4,6 mm (diamètre interne), taille des particules 5 µm, ou toute autre colonne donnant un profil chromatographique équivalent
  - **Note** : L'utilisation d'une colonne de garde de même nature est recommandée
- 5.15 Système de Chromatographie Liquide Haute Performance**, équipé d'une pompe permettant une élution isocratique, d'un four pour colonne capable de chauffer à  $40 \pm 2$  °C, d'un injecteur et d'un détecteur UV
  - **Note** : un injecteur réfrigéré peut prévenir du risque de détérioration de l'AD

## 6. Échantillons

### 6.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon représentatif, non endommagé ou altéré lors du transport ou de l'entreposage.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode décrite dans ce protocole.

### 6.2 Conservations des échantillons avant analyse

Si le début d'analyse est prévu dans les 48h, les échantillons frais ou congelés doivent être conservés à  $5 \pm 3$ °C. Dans le cas contraire, les échantillons doivent être conservés à une température  $\leq -18$ °C.

### 6.3 Conservations des échantillons ou reliquats après analyse

Les échantillons après analyse doivent être conservés à une température  $\leq -18$ °C.



## 7. Mode opératoire

### 7.1 Préparation des échantillons pour analyse

#### 7.1.1 Coquillages entiers

Les coquillages doivent être soigneusement nettoyés en rinçant la coquille à l'eau fraîche. Les muscles adducteurs sont ensuite sectionnés. L'intérieur des coquillages est rincé à l'eau fraîche pour éliminer le sable et/ou tout corps étranger. La chair est alors séparée de la coquille. Les tissus sont déposés au fur et à mesure dans une passoire afin de les laisser s'égoutter et ainsi éliminer l'eau salée. Pour un échantillonnage représentatif, au moins 100 g de tissus doivent être recueillis. Les tissus sont ensuite homogénéisés dans un broyeur ménager ou homogénéisateur à couteaux (5.2).

■ **Note** : Dans le cadre du contrôle officiel, pour les coquilles Saint-Jacques, il convient d'utiliser au moins 10 spécimens conformément à [2].

#### 7.1.2 Coquillages décoquillés (corps entier ou toutes parties comestibles)

Les coquillages décoquillés doivent être rincés à l'eau fraîche pour éliminer le sable et/ou tout corps étranger. Les tissus sont déposés au fur et à mesure dans une passoire afin de les laisser s'égoutter et ainsi éliminer l'eau salée. Pour un échantillonnage représentatif, au moins 100 g de tissus doivent être recueillis. Les tissus sont ensuite homogénéisés dans un broyeur ménager ou homogénéisateur à couteaux (5.2).

■ **Note** : Dans le cadre du contrôle officiel, pour les coquilles Saint-Jacques, il convient d'utiliser au moins 10 spécimens ou parties comestibles individuelles (muscle, muscle + gonades) conformément à [2].

### 7.2 Extraction, centrifugation, filtration

Peser  $4,0 \pm 0,1$  g d'homogénat de tissus dans un tube à centrifuger (5.9). Ajouter 16 ml de solvant d'extraction (4.5) et homogénéiser l'échantillon à l'aide d'un homogénéisateur (5.4) pendant 3 min à environ 10 000 tours/min. Centrifuger à 3 000 g ou plus (5.5) pendant 10 min à environ 20°C et filtrer une partie du surnageant à l'aide d'un filtre seringue 0,45 ou 0,2µm (5.11).

■ **Note** : Si les extraits ne sont pas injectés le jour même, ils peuvent être conservés à une température d'au moins -12°C, dans des flacons fermés hermétiquement (5.10) pendant 4 semaines.

## 7.3 Analyse CLHP

### 7.3.1 Conditions de la chromatographie liquide

La détermination de la teneur en acide domoïque d'un échantillon est réalisée après séparation chromatographique sur une colonne en phase inverse dans des conditions isocratiques avec l'éluant (4.7)

A titre d'exemple, les conditions CLHP suivantes donnent des résultats satisfaisants :

Colonne : Phase inverse C18, 5  $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm

Température four : 40°C

Débit : 1 ml/min

Volume d'injection : 20  $\mu$ l

Détection UV :  $\lambda = 242$  nm

Si une colonne différente est utilisée, il peut être nécessaire d'ajuster les conditions chromatographiques.

Laisser le système s'équilibrer jusqu'à obtention de la stabilité des différents paramètres analytiques (pression, température, signal UV).

### 7.3.2 Courbe d'étalonnage

Préparer une courbe d'étalonnage chaque jour d'analyse en injectant les solutions d'étalonnage (4.9.2). Tracer la courbe des aires des pics en fonction de la concentration des solutions d'acide domoïque et d'acide épidoïdomeïque injectées pour l'étalonnage. Vérifier que le coefficient de détermination,  $R^2$ , de la courbe d'étalonnage est  $\geq 0,98$ .

### 7.3.3 Injection des échantillons

Pour vérifier la stabilité du système, injecter à intervalles réguliers, par exemple tous les 10 échantillons, la gamme d'étalonnage.

## 8. Résultats

### 8.1 Contrôle de la validité des résultats

Le tableau 2 regroupe l'ensemble des contrôles qualité permettant de garantir la validité des résultats.


**Tableau 2 - Contrôles Qualité**

Critères de contrôle de la validité des résultats		Description et critères d'acceptation
Courbe d'étalonnage	Coefficient de détermination	Le coefficient de détermination, $R^2$ , de chacune des 2 droites d'étalonnage (bracketing) et de la droite d'étalonnage moyenne doit être supérieur ou égal à 0,98.
	Variation de la réponse	<p>La dérive de la réponse au sein d'une même séquence est définie ici comme l'écart des pentes des courbes d'étalonnage, résultant de l'injection de 2 gammes successives (bracketing).</p> <p>L'écart entre 2 pentes est calculé de la manière suivante :</p> $\text{Écart des pentes} = \frac{ pente(n+1) - pente(n) }{\left(\frac{pente(n+1) + pente(n)}{2}\right)}$ <p>La variation des pentes de 2 gammes d'étalonnage successives ainsi que la variation des pentes entre la première et la dernière gamme de la série doit être <math>\leq 10\%</math>.</p>
	Variation du temps de rétention	<p>L'écart entre 2 temps de rétention est calculé de la manière suivante :</p> $\text{Variation } Tr = \frac{ Tr(n+1) - Tr(n) }{\left(\frac{Tr(n+1) + Tr(n)}{2}\right)}$ <p>La variation du temps de rétention entre 2 gammes successives et entre la première et la dernière gamme doit être <math>\leq 5\%</math>.</p>
Absence de pics interférents		Pic inférieur à la Limite de Détection au temps de rétention de la toxine lors de l'injection du mélange ACN/H <sub>2</sub> O 10/90 v/v
Contrôles qualité (CQ)	Contrôle qualité négatif (CQ négatif)	<p>Le CQ négatif, inclus dans chaque série, est soit un matériau de référence interne négatif (MRI), soit un matériau de référence externe négatif (MRE), soit un matériau de référence certifié négatif (MRC) ou à défaut un CQ solvant (4 ml d'eau) ayant suivi l'ensemble des étapes de l'analyse.</p> <p>Absence de pic au temps de rétention de la toxine (aire donnant un résultat inférieur à la limite de détection)</p>
	Contrôle qualité positif (CQ positif)	<p>Le CQ positif, inclus dans chaque série, est soit un échantillon supplémenté, soit un matériau de référence interne (MRI), soit un matériau de référence externe (MRE), soit un matériau de référence certifié (MRC).</p> <p>Pour les échantillons supplémentés et les matériaux de référence interne, les critères d'acceptation doivent être spécifiés dans un document interne du laboratoire. Pour les MRE et les MRC, les critères d'acceptation sont spécifiés par le fabricant.</p>

■ **Note** : Le MRI est une matrice naturellement contaminée dont la teneur en acide domoïque a été évaluée préalablement au laboratoire.

## 8.2 Calculs et expression des résultats

### 8.2.1 Identification

Identifier l'acide domoïque et l'acide épidoïque en comparant les temps de rétention de l'échantillon avec ceux des étalons.

■ **Note** : L'acide domoïque pur en solution subit une isomérisation progressive, en particulier vers le diastéréoisomère C5', c'est-à-dire l'acide épidoïque ; pour cette raison, tout étalon conservé trop longtemps produit inévitablement un mélange. Le spectre UV de l'acide épidoïque étant identique à celui de l'acide domoïque, les facteurs de réponse molaires relatifs obtenus par chromatographie liquide avec détection UV sont également identiques et les proportions relatives peuvent être recalculées à un temps donné. Certaines conditions de chromatographie liquide ne permettent pas la résolution de l'acide domoïque et de l'acide épidoïque ; cela ne constitue pas un problème (ceci facilite même l'analyse). Il convient que la somme des aires de l'acide domoïque et de l'acide épidoïque soit prise en compte aussi bien pour l'étalonnage des instruments que pour la quantification de l'acide domoïque dans les échantillons.

### 8.2.2 Quantification

Après intégration des aires des pics chromatographiques (AD+epi-AD), déterminer la teneur en AD+epi-AD par la méthode de l'étalonnage externe en bracketing.

Il convient que la somme des aires de l'acide domoïque et de l'acide épidoïque soit prise en compte pour l'étalonnage ainsi que pour la quantification de l'acide domoïque dans les échantillons.

Lorsque la somme des aires de l'acide domoïque et de l'acide épidoïque dans l'échantillon analysé est supérieure à l'aire (AD+epi-AD) de l'étalon ayant la concentration la plus élevée, l'extrait doit être dilué avec le solvant d'extraction (4.5) pour obtenir une aire qui rentre dans la courbe d'étalonnage et le facteur de dilution (D) doit être pris en compte dans les calculs.

Calculer la teneur en acide domoïque dans l'échantillon en utilisant la formule suivante :

$$\text{Teneur AD (mg/kg)} = \left( \frac{y-b}{a} \right) \times \frac{V_T}{p} \times D$$

Où :  $y$  = aire du pic chromatographique

$b$  = ordonnée à l'origine de la courbe d'étalonnage (en bracketing)

$a$  = pente de la courbe d'étalonnage

$V_T$  = volume total de l'homogénat et du solvant d'extraction en millilitres (20 ml)

$p$  = prise d'essai (g)

$D$  = facteur de dilution (si l'extrait a été dilué)



## 9. Caractéristiques de performance de la méthode

La méthode d'analyse de l'acide domoïque a fait l'objet d'une caractérisation/validation intra-laboratoire par le LNR. Lors de cette validation, ont été étudiées les matrices huîtres, moules, coquilles Saint-Jacques, bulots, oursins et violets.

La synthèse des résultats obtenus est présentée ci-dessous :

Domaine validation (mg/kg)	Limites		Exactitude				Incertitude U
	LD (mg/kg)	LQ (mg/kg)	Domaine (mg/kg)	Taux de récupération	Répétabilité CV <sub>r</sub>	Fidélité intermédiaire CV <sub>FI</sub>	
1,0 – 25,0	0,3	1,0	1,0 ≤ x < 2,0	100,0 %	3,9 %	13,7 %	30 %
			2,0 ≤ x < 10,0	93,9 %	2,3 %	11,5 %	25%
			10,0 ≤ x ≤ 25,0	92,3 %	2,5 %	6,5 %	14 %

**Note :** Lors de la validation intra-laboratoire du LNR une colonne Lichrospher 100RP18, 5µm, 125mm x 4mm a été utilisée.



## Annexe A

Les données du tableau ci-dessous ont été obtenues lors de l' « Etude de validation UE de la détermination de l'acide domoïque par CLHP-UV » organisée par le Laboratoire de Référence de l'Union Européenne pour les Biotoxines Marines (EURLMB), et utilisant différentes matrices et différents niveaux de contamination en doubles aveugles.

Échantillon	Palourde dopée	Palourde cn <sup>a</sup>	Moule dopée	Corail de coquille Saint-Jacques cn <sup>a</sup>	Coquille Saint-Jacques entière cn <sup>a</sup>	Anchois cn <sup>a</sup>
Année	2003	2003	2003	2003	2003	2003
Nombre de laboratoires	12	12	12	13	13	12
Nombre de laboratoires retenus après élimination des valeurs aberrantes	12	12	11	13	13	11
Nombre de valeurs aberrantes (laboratoires)	0	0	1	0	0	1
Nombre de résultats acceptés	12	12	11	13	13	11
Valeur moyenne $\bar{x}$ , mg/kg	3,38	17,7	11,6	2,72	9,63	85,1
Écart-type de répétabilité $s_r$ , mg/kg	0,28	0,40	0,37	0,12	0,18	1,1
Coefficient de variation de la répétabilité $CV_r$ , %	8,3	2,3	3,2	4,4	1,9	1,3
Limite de répétabilité $r'$ [ $r = 2,8 \times s_r$ ], mg/kg	0,78	1,12	1,04	0,34	0,50	3,08
Écart-type de reproductibilité $s_R$ , mg/kg	0,51	1,6	2,0	0,62	1,2	6,6
Coefficient de variation de la reproductibilité $CV_R$ , %	15	9,0	17	23	12	7,8
Limite de reproductibilité $R$ [ $r = 2,8 \times s_R$ ], mg/kg	1,43	4,48	5,60	1,74	3,36	18,5
HorRat	1,1	0,87	1,6	1,7	1,0	0,94
Taux de récupération, en %	79		84			
a : contaminé naturellement (cn)						



## Bibliographie

- [1] Règlement (CE) N°853/2004 du parlement européen et du conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale.
- [2] Décision 2002/226 de la commission du 15 mars 2002 instaurant des contrôles sanitaires spéciaux pour la récolte et le traitement de certains mollusques bivalves présentant un taux de toxine ASP (Amnesic Shellfish Poison) supérieur à la limite fixée par la directive 91/492/CEE du Conseil.
- [3] Règlement (CE) No 2074/2005 de la commission du 5 décembre 2005 établissant les mesures d'application relatives à certains produits régis par le règlement (CE) no 853/2004 du Parlement européen et du Conseil et à l'organisation des contrôles officiels prévus par les règlements (CE) no 854/2004 du Parlement européen et du Conseil et (CE) no 882/2004 du Parlement européen et du Conseil, portant dérogation au règlement (CE) no 852/2004 du Parlement européen et du Conseil et modifiant les règlements (CE) no 853/2004 et (CE) no 854/2004.
- [4] Règlement (CE) No 1244/2007 de la commission du 24 octobre 2007 modifiant le règlement (CE) no 2074/2005 en ce qui concerne les mesures d'application relatives à certains produits d'origine animale destinés à la consommation humaine.
- [5] Règlement (CE) N°854/2004 du parlement européen et du conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine Journal officiel de l'Union européenne L 139.
- [6] EU-RL-MB: EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of domoic acid in shellfish and finfish by RP-HPLC using UV detection, 2008, version 1  
[http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/laboratorios/LNRBM/archivo4\\_EU-Harmonised-SOP-ASP-HPLC-UV\\_Version1.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/laboratorios/LNRBM/archivo4_EU-Harmonised-SOP-ASP-HPLC-UV_Version1.pdf)
- [7] NF EN 14176 1<sup>er</sup> Mars 2017 Dosage de l'acide domoïque dans les coquillages crus, les poissons crus et les moules cuites par CLHP en phase inverse couplée à la détection UV.
- [8] Quilliam MA, Xie M., Hardstaff WR., 1995; Rapid extraction and cleanup for Liquid Chromatography determination of Domoic Acid in unsalted seafood; Journal of AOAC International, vol 78, N°2, 543-554