

2022  
Informe de  
**ASESORAMIENTO  
y TRANSFERENCIA**

**066-22**

NO-2022-60184878-APN-DNI#INIDEP  
ACEPTADO 14/06/22

## **Recomendaciones y metodología para el análisis de Toxina Amnésica de Moluscos**

Nora G. Montoya y M. Belen Mattera

Citar como:

Montoya NG y Mattera MB. 2022. Recomendaciones y metodología para el análisis de Toxina Amnésica de Moluscos. Inf Ases y Transf N.º 066/22, 21 pp.



# Recomendaciones y metodología para el análisis de Toxina Amnésica de Moluscos <sup>1</sup>

Nora G. Montoya y M. Belen Mattera

INIDEP, Programa Química Marina y Marea Roja

## Resumen

En el presente informe se incluyen sugerencias y recomendaciones para la implementación del monitoreo de toxinas amnésicas de moluscos en la Provincia de Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sur (TdF). Es un informe descriptivo, con la técnica, los antecedentes y bibliografía actualizada sobre la detección de ácido domoico. Además, se incluye el método propuesto por la Unión Europea y la adaptación del mismo que se sigue en el INIDEP, de acuerdo al instrumental con que cuenta el Laboratorio. Este informe constituye una herramienta de capacitación previa a la pasantía que personal de TdF realizará en el INIDEP.

## Palabras Clave

Ácido domoico, HPLC, detección toxinas, Ushuaia, monitoreo

## Introducción

En este informe, se busca realizar un asesoramiento sobre la detección de toxinas amnésicas de moluscos en el marco de un acuerdo preexistente, el Acta Acuerdo N°14 entre el Gobierno de la Provincia de Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sur (TdF) y el INIDEP, firmado en el año 2013, cuyo objetivo fue realizar estudios conjuntos sobre la ocurrencia de florecimientos de microalgas nocivas, y especialmente de eventos tóxicos en moluscos bivalvos en el área del Canal Beagle; complementando la capacidad técnica y operativa de ambas partes. En esta oportunidad, el objetivo es realizar la capacitación y asesoramiento para el análisis de ácido domoico, por parte del personal del INIDEP, a personal de la Provincia de TdF que llevará a cabo estos análisis en su jurisdicción. Para ello, se realiza en una primera etapa este informe descriptivo, con la técnica, los antecedentes y bibliografía actualizada y, en una segunda etapa, las pasantías de capacitación con una orientación práctica.

## Intoxicación amnésica de moluscos (Montoya y col. 2020)

La intoxicación amnésica de moluscos es causada por un potente neurotóxico: el ácido domoico (AD). El primer evento de intoxicación humana por consumo de moluscos ocasionado por AD, ocurrió en 1987 en Prince Edward Island, Canadá, asociado al crecimiento extraordinario de una diatomea, *Pseudo-nitzschia multiseries* (Wright et al. 1989). El género de diatomeas marinas *Pseudo-nitzschia* tiene una amplia distribución en todo el mundo, y comprende 48 especies reconocidas; entre ellas al menos 23 han sido mencionados como posibles productores de AD (Bates et al. 2018). Esta neurotoxina se puede acumular en la red alimentaria marina, provocando la Intoxicación Amnésica de Moluscos, un síndrome neurológico con efectos letales en aves marinas, mamíferos marinos y humanos (Geraci et al. 1989; Sierra Beltran et al. 1997; Lefebvre y Robertson 2010). El AD es estructuralmente similar al ácido glutámico (Figura 1) y actúa como agonista. Esta toxina se fija fuertemente en los receptores del glutamato presentes en el tejido cerebral de la región del hipocampo evitando una sinapsis normal y produciendo la apertura del canal de calcio, lo que lleva a la necrosis neuronal por el exceso de este ion. Los síntomas de la intoxicación amnésica de moluscos aparecen aproximadamente a las 48 hs de la ingesta: náuseas, vómitos, dolor estomacal y diarrea, seguidos por confusión, mareos, desvanecimiento, somnolencia, letargia, coma, arritmias cardíacas y pérdida permanente de la memoria (Alvarez-Falconí 2009). Esta toxina, de acuerdo a la dosis puede ser letal, no posee antídoto y el tratamiento es sintomático. Debido al riesgo de convulsiones, el vómito no debe ser inducido y en casos severos y si la ingestión fue reciente, se recomienda el lavado gástrico.

Aunque el programa de monitoreo actual parece eficaz para prevenir el envenenamiento agudo en los humanos, se desconoce los efectos debidos a la exposición de largo plazo a concentraciones bajas de AD. En esta línea, se ha caracterizado un síndrome de toxicosis crónica en leones marinos que ha llevado a evaluar los potenciales efectos de exposición crónica en humanos (Lefebvre y Robertson 2010, Petroff et al. 2021). El mayor riesgo de exposición a AD para humanos y la vida silvestre marina proviene del consumo de organismos marinos que se alimentan por filtración, tales como mariscos y peces planctónicos (Kvitek et al. 2008). Los mejillones y los peces planctívoros como la anchoíta, tienen una rápida velocidad de acumulación y depuración de AD. Se demostró que acumulan en sincronía con las floraciones tóxicas de *Pseudo-nitzschia* con niveles de AD que decrecen a niveles indetectables dentro de una semana de finalizada la floración (Ferdin et al. 2002; Lefebvre y Robertson 2010). Contrariamente, algunos bivalvos como almejas y vieiras pueden retener AD en sus tejidos durante meses (Bogan et al. 2006).

En Argentina no han ocurrido intoxicaciones humanas por TAM, aunque se han reportado nueve especies toxigénicas del género *Pseudo-nitzschia* (*P. australis*, *P. brasiliiana*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, *P. multiseriata*, *P. pseudodelicatissima*, *P. pungens*, *P. seriata*, y *P. turgidula*) (Almandoz et al. 2017). La presencia de AD se ha confirmado en algunos sectores del litoral argentino durante los últimos años, pero en general los registros son escasos (Figura 2). El primer registro de AD en Argentina fue en el año 2000, frente a Mar del Plata asociado a la diatomea *Pseudo-nitzschia australis*. En ese evento, el máximo contenido de AD ( $76,6 \mu\text{g g}^{-1}$ ) se detectó en muestras de tejido de vísceras de anchoíta (*Engraulis anchoíta*) mientras que en mejillones (*Mytilus edulis platensis*) fue menor ( $7,7 \mu\text{g g}^{-1}$ ) (Montoya et al. 2000; Negri et al. 2002). En el año 2005, se detectó AD en muestras de plancton de Punta Pardelas y Bahía Camarones (Figura 2) (Sastre et al. 2007) y más recientemente en muestras de plancton en distintos sectores de la plataforma (Krock et al. 2018). La detección de AD en las heces de la ballena franca austral *Eubalaena australis* (Wilson et al. 2016; D'Agostino et al. 2017) en la región de Península Valdés, proporciona evidencia del riesgo no solo para los humanos sino también para la fauna marina.

Para proteger a los consumidores, la legislación argentina al igual que la internacional, establece un límite apto para el consumo de  $20 \text{ mg AD kg}^{-1}$  de tejido de molusco (FAO/WHO 2006). Cuando el nivel excede este límite se clausura la zona de producción y se prohíbe la extracción y comercialización. Tradicionalmente, el Bioensayo con ratón se utilizaba para determinación de toxicidad en moluscos para el consumo humano. Sin embargo, este método es altamente insensible y no proporciona una estimación confiable, por lo tanto, la legislación establece la utilización de métodos basados en HPLC (FAO/WHO 2006 y Reglamento N° 853/2004 UE).

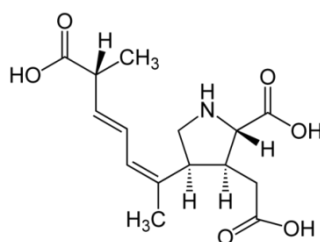


Figura 1: Estructura química del ácido domoico, toxina amnésica de moluscos.

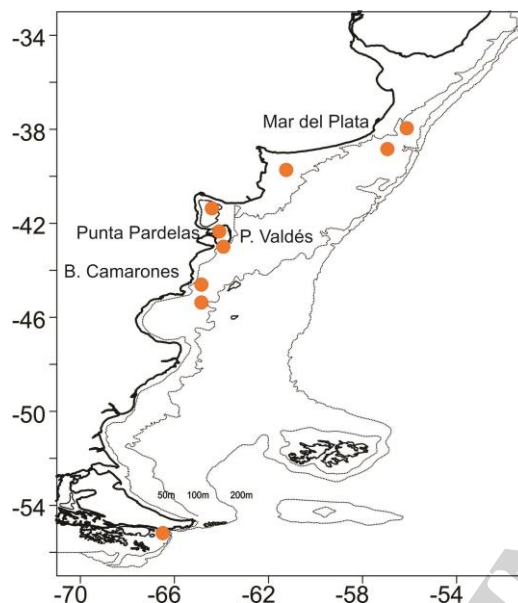


Figura 2: Distribución geográfica de plancton y/u organismos marinos con ácido domoico. (de Montoya et al. 2020)

## Materiales y métodos

A continuación, se describe el método analítico utilizado en el laboratorio del Programa Química Marina y Marea Roja, INIDEP, para el análisis de AD, el cual es una adaptación del método de Quilliam M.A, 2003. Detalles de este método y los procedimientos de calibración se encuentran en el ANEXO I: *EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of domoic acid in shellfish and finfish by RP-HPLC using UV detection.*

### Estándar:

El AD puro es viable en Sigma Chemical Company. Además, material de referencia, mejillones contaminados y estándar certificados de AD son comercializados por CNRC-NRC National Research Council Canadá, Institute for Marine Biosciences, los cuales son ampliamente utilizados para el análisis de AD internacionalmente. Es recomendable realizar la calibración del método con estándar certificado (CNRC-NRC), y luego usar como subestándar el preparado a partir de la droga sólida que comercializa Sigma.

### Estabilidad del ácido domoico:

Se ha llevado a cabo un estudio detallado sobre la estabilidad del AD (Thomas et al., 2001). Se observó una descomposición extensa cuando las soluciones acuosas se almacenaron a temperaturas altas (50 °C) o pH extremos (2 o 12), o cuando se expusieron a la luz o al oxígeno. Para lograr la máxima estabilidad, las soluciones de AD deben almacenarse a un pH de 5 a 7, bajo argón o nitrógeno y en la oscuridad. Para almacenamiento de hasta un año, se aceptan +4 °C, pero para almacenamiento a largo plazo, es mejor almacenar a -80 °C. También se ha investigado el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre el AD en un material de referencia de tejido de mejillón certificado. Los tejidos de mejillón que contengan AD deben conservarse a -80 °C para almacenamiento a largo plazo, pero parecen ser estables a -12 °C durante varios meses. Si los tejidos han sido esterilizados, se pueden conservar a +4 °C durante varios meses.

## Equipos

El INIDEP cuenta con dos equipos HPLC, equipados con diferentes módulos. El HPLC#1, se utiliza para la detección de Toxinas Paralizantes de Moluscos con detección de fluorescencia y módulo de oxidación post-columna con un reactor marca Eppendorff FH40, según el método de Oshima (1995) modificado con columna marca Inertsil C8 y horno a 25 °C. El equipo HPLC#1 es modelo Shimadzu LC 10A que posee dos bombas LC10AT y una LC20 AT, con cámara de mezcla de alta presión, horno CTO-10 AC (Shimadzu), inyector automático Sil 10Ax1 (Shimadzu) y equipado con un detector de fluorescencia RF10AXL (Shimadzu) y un detector de arreglo de diodos SPD-M10Avp (Shimadzu) como puede observarse en la Figura 3.



Figura 3: Equipo HPLC#1 Shimadzu LC10A con los módulos utilizados para el análisis de Toxinas paralizantes de moluscos.

Para el análisis de AD y de toxinas lipofílicas se utiliza e HPLC#2. Es un equipo modelo Shimadzu LC20 A que posee una bomba LC20AT cuaternaria que trabaja con mezcla a baja presión, horno CTO-20 AC (Shimadzu), un inyector automático refrigerado SIL20 AC HT y equipado con un detector de arreglo de diodos SPD-M10Avp (Shimadzu) y un detector de espectrometría de masas Bruker Esquire 6000, que permite MS<sup>n</sup> (Figura 4).



Figura 4: Equipo HPLC#2 Shimadzu LC20AT con los módulos utilizados para el análisis de Toxinas amnésicas y toxinas lipofílicas de moluscos.

Para el análisis de AD se utiliza el detector de arreglo de diodos. La característica de este detector es que el haz de radiación es dispersado por medio de una red de difracción fija, siendo recogidas simultáneamente todas las longitudes mediante una matriz de fotodiodos, que permite obtener el espectro de absorción de cada compuesto a medida que salen de la columna cromatográfica.

Para la determinación de AD es necesario contar con un equipo:

- a) Cromatógrafo líquido: equipado con un detector UV capaz de medir a 242nm, que provea una relación señal /ruido (S/N) de 10:1 para una inyección de 0.2 µg/l.
- b) Columnas de HPLC de 250 x 4.6 mm, empacadas con 5µm de fase polimérica de C18 (Vydac 201TP) es altamente recomendable usar una precolumna o *guard column* con características similares a la columna para proteger y extender la vida útil de la misma.
- c) Condiciones de operación:
  - Temperatura de la columna 40°C, a partir de un horno de columnas.
  - Flujo de la fase móvil: 1 ml/min
  - Volumen de inyección: 5-20 µl
  - Tiempo de retención: 7-15 min

Reactivos:

- a) Agua destilada y tratada por un sistema de purificación equipado con resinas de intercambio iónico y filtros de carbón que asegure calidad de agua ultrapura tipo 1.
- b) Solventes: Acetonitrilo y metanol grado LC y trifluoracético (TFA) grado espectrofotométrico (>99%de pureza).
- c) Fase móvil de HPLC: Mezclar 100 ml de acetonitrilo con 400 ml de agua, adicionar 1.0 ml de TFA y diluir a 1 l con agua. Desgasear con ultrasonido u otro método viable. El método utiliza una sola fase móvil sistema isocrático.
- d) Eluyente de lavado de la columna cromatográfica: Se utiliza metanol o acetonitrilo 50 %.
- e) Diluyente de inyección: Acetonitrilo al 10 %
- f) Solvente de extracción: Metanol 50 %.

Preparación de las muestras:

Lavar los mariscos con el fin de eliminar la arena. Remover toda la carne y dejar escurrir. Para tomar muestras representativas es conveniente homogeneizar 100 g de muestra. El tejido homogeneizado debe ser guardado a -10°C.

Extracción: Pesar exactamente 4g del tejido homogeneizado en el paso anterior en un tubo de centrifuga graduado. Agregar 16 ml de solvente de extracción (f) metanol-agua 50% y homogeneizar completamente, preferiblemente con un homogeneizador por ultrasonido. Centrifugar a 3000g por 10 min. Filtrar un volumen del sobrenadante (entre 5-15 ml) con un filtro compatible con el metanol y con un tamaño de poro de 0.45 µm (filtro de jeringa), en INIDEP utilizamos filtros Whatman Puradisc de fibra de vidrio GF/F de 25 mm de diámetro, tamaño de poro nominal 0.7 µm. Los extractos deben analizarse rápidamente o de lo contrario guardar apropiadamente cerrados a -12°C. Es conveniente llevar a sequedad una alícuota exacta del extracto (en condiciones cuidadas de temperatura) y luego diluir en el diluyente de inyección e) antes de inyectar la muestra.

Determinación por HPLC

Realizar una curva de calibración inyectando soluciones de estándar en el rango de 1 a 50 µg/ml. Si se obtiene una buena respuesta lineal e intersección con el 0 puede utilizarse un solo

punto de calibración (por ejemplo 8 µg/ml) para análisis rutinarios. Inyectar extractos de la muestra por duplicado. Enjuagar el inyector entre distintas muestras para evitar contaminaciones. El cálculo de la concentración, se realiza automáticamente a través del software del programa donde debe incluirse el factor de dilución de la muestra. De requerir un cálculo manual ver la descripción en el ANEXO I. Repetir la inyección del estándar al principio y al final de la tanda de muestras y calcular la concentración teniendo en cuenta la estabilidad de la señal a lo largo del análisis.

## Discusión

Dado que el nivel regulatorio es de 20 mg AD/kg y que el bioensayo en ratones solo detecta una concentración mayor de 40 mg/kg, no puede usarse para el monitoreo de rutina. La cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC-UV) fue el primer método analítico químico para la cuantificación de AD y sigue siendo el más utilizado en el monitoreo. Este método tiene la ventaja de ser relativamente simple, rápido, reproducible y preciso. También ha sido validado a través del Programa de Métodos Oficiales Internacionales de la AOAC (AOAC, 2000b) y es el método sugerido por la Unión Europea (ANEXO I), lo que le otorga una mayor aceptación por parte de la comunidad reguladora. Un número de otros enfoques analíticos han sido también desarrollados, incluida la cromatografía en capa fina (TLC), la electroforesis capilar (CE) y la cromatografía líquida con detección de fluorescencia. Dado que la sensibilidad del método HPLC-UV era inadecuada para el análisis de la mayoría de las muestras de plancton y agua de mar, se requerían técnicas más sensibles para los experimentos con dichos componentes (Pocklington et al., 1990). Por lo tanto, los métodos basados en la derivatización con reactivos de fluorescencia, como el 9-luorenilmetilcloroformiato, y el posterior análisis por HPLC con detección de fluorescencia (FD) son importantes para el análisis cuantitativo del AD en los estudios de producción de toxinas. Sin embargo, la tendencia actual es la utilización de HPLC con detección por espectrometría de masas (Peteva et al. 2018). Este último método ha sido probado en el INIDEP (Carignan y Montoya 2008), siendo utilizado solo para experiencias de diatomeas *in vivo*, dada, la complejidad y el costo del análisis. La utilización del detector de masas también ha permitido el desarrollo de métodos para la detección de AD en fluidos corporales en caso de intoxicaciones humanas (Sum et al. 2018)

## Agradecimientos

Agradecemos particularmente al personal de la gobernación de la Provincia de TdF por la colaboración y predisposición para el personal del INIDEP en las campañas y estudios desarrollados en la Provincia.

## Bibliografía

- Almandoz G.O., Fabro E., Ferrario M.E., Tillmann U., Cembella A.D., Krock B. Species occurrence of the potentially toxigenic diatom genus *Pseudo-nitzschia* and the associated neurotoxin domoic acid in the Argentine Sea. *Harmful Algae* 2017;63:45–55. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.01.007>
- Alvarez-Falconí P. P. Ácido domoico e intoxicación amnésica por moluscos en salud pública. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2009; 26(4):505-516.
- Bates, S.S., Hubbard K.A., Lundholm N., Montresor M., Leaw C.P. *Pseudo-nitzschia*, *Nitzschia*, and domoic acid: new research since 2011. *Harmful Algae* 2018;79:3-43

- Bogan Y.M., Kennedy D., Harkin A.L., Gillespie J., Hess P., Slater J.W. Comparison of domoic acid concentration in king scallops, *Pecten maximus* from seabed and suspended culture systems. *J Shellfish Res.* 2006; 25:129–135.
- Carignan MO, Montoya, NG(2008). Implementación del análisis de toxina amnésica de moluscos con detección por espectrometría de masas : *Inf. Inv* 07/2008 INIDEP
- D'Agostino V.C., Degradi M., Sastre A.V., Santinelli N.H., Krock B., Krohn T., Dans S.L., Hoffmeyer M.S. Domoic acid in marine food web: Exposure of southern right whales *Eubalaena australis* in Península Valdés, Argentina. *Harmful Algae* 2017; 68:248–257, <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.09.001>
- EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of domoic acid in shellfish and finfish by RP-HPLC using UV detection. [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/laboratorios/LNRBM/archivo4\\_EU-Harmonised-SOP-ASP-HPLC-UV\\_Version1.pdf](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/laboratorios/LNRBM/archivo4_EU-Harmonised-SOP-ASP-HPLC-UV_Version1.pdf)
- FAO/WHO 2006. Joint FAO/WHO Food Standards Programme CODEX Committee on Fish and Fishery Products. CX/FFP 06/28/6-Add.1. Circular Letter CL 2006/45-FFP; FAO: Rome, Italy, 2006.
- Ferdin M.E., Kvitek R.G., Bretz C.K., Powell C.L., Doucette G.J., Lefebvre K.A., Coale S., Silver M.W. *Emerita analoga* (Stimpson) possible new indicator species for the phycotoxin domoic acid in California coastal waters. *Toxicon* 2002; 40:1259–1265.
- Geraci J.R., Anderson D.M., Timperi R.J., St. Aubin D.J., Earj Y., Prescott J.L., Mayo C.A. Humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) fatally poisoned by dinoflagellate toxin. *Can J Fish Aquat Sci.* 1989;46:1895-1898
- Krock B., Ferrario M.E., Akselman R., Montoya N.G. Occurrence of marine biotoxins and shellfish poisoning events and their causative organisms in Argentine marine waters. *Oceanography* 2018;31:132-134. <https://doi.org/10.5670/oceanog.2018.403>
- Kvitek R.G., Goldberg J.D., Smith G.J., Doucette G.J., Silver M.W. Domoic acid contamination within eight representative species from the benthic food web of Monterey Bay, California, USA. *Mar Ecol Progr Series* 2008; 367:35–47.
- Lefebvre K. A., Robertson A. Domoic acid and human exposure risks: A review. *Toxicon* 2010; 56:218–230.
- Montoya NG, Carignan MO, Mattera Coy MB Toxinas Algales en el Mar Argentino: nuevos hallazgos, nuevos desafíos. (2021).. *Acta Toxicológica Argentina* 28 (3): 92-107.
- Montoya, N.G., Negri R.M., Carreto J.I. 2000. Primera detección de toxina amnésica de moluscos en el Mar Argentino asociado a un florecimiento de la diatomea *Pseudo-nitzschia australis* en la Zona Común de Pesca Argentino-Uruguay. XV Simposio Científico Tecnológico de la Comisión Técnica Mixta del Frente Marítimo Argentino-Uruguay. p. 67, Montevideo, Uruguay.
- Negri, R.M., Montoya N.G., Carreto J.I., Akselman R., Inza D. *Pseudo-nitzschia australis*, *Mytilus edulis*, *Engraulis anchoita*, and domoic acid in the Argentine Sea. En: Steidinger K.A., Landsberg J.H., Tomas C.R., Vargo G.A., editores. *Harmful Algae* 2002. St. Petersburg, Florida, USA: Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO; 2004. p. 139–141.



- Petroff R, Hendrix A, Shum S, Grant KS, Lefebvre KA, Burbacher TM. (2021) Public health risks associated with chronic, low-level domoic acid exposure: A review of the evidence, *Pharmacology & Therapeutics*, Volume 227, 2021,107865, ISSN 0163-7258
- Peteva, Zlatina V., Georgieva, Stanislava K., & Stancheva, Mona D. (2018). Recent Updates of HPLC-UV and LC-MS Methods for Domoic Acid Detection: a Comparison Review. *Journal of International Scientific Publications: Ecology and Safety (Online)*, 227-237
- Pocklington, R., Milley, J. E., Bates, S. S., Bird, C. J., de Freitas, A. S. W., Quilliam, M. A.(1990). Trace determination of domoic acid in seawater and phytoplankton by highperformance liquid chromatography of the fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC)derivative. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 38: 351-368
- Quilliam M. 2003 Chemical methods for domoic acid, the amnesic shellfish toxins. In Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M. & Cembella, A.D. *Manual on Harmful Marine Microalgae. Monographs on oceanographic methodology 11. IOC UNESCO.*pp800
- Sastre, A.V., Santinelli N.H., Marino G., Solís M., Pujato L., Ferrario M.E. First detection of domoic acid produced by *Pseudo-nitzschia* species, Chubut coastal waters, Patagonia, Argentina. *Harmful Algae News* 2007.34:12.
- Sierra Beltran A.P., Palafox-Uribe A., Grajales-Montiel J., Cruz-Villacorta A., Ochoa J.L.. Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: evidence that toxic diatom blooms are spreading. *Toxicon* 1997; 35: 447–453.
- Shum S, Kirkwood JS, Rebekah JJ, Petroff C, Crouthamel B, Grant KS, Burbacher TM, Nelson WL, Isoherrane N. Validated HPLC-MS/MS Method To Quantify Low Levels of Domoic Acid in Plasma and Urine after Subacute Exposure (2018)*ACS Omega* 2018, 3, 9, 12079–12088.
- Thomas, K.M., LeBlanc, D.M., Quilliam, M.A. (2001). A stability study on the amnesic shellfish poisoning toxin, domoic acid. *J. AOAC*
- Wilson A. C, Sastre V., Hoffmeyer M., Rowntree V.J, Fire S., Santinelli N.H, Díaz Ovejero S., D'Agostino V., Marón C.F, Doucette J.C., Broadwater M.H, Wang W.Z., Montoya N.G., Seger J., Adler F.R., Sironi M. Uhart M.M. Southern right whale (*Eubalaena australis*) calf mortality at Peninsula Valdes, Argentina: are harmful algal blooms to blame? *Mar Mam Sci.* 2016; 32(2);423-451.
- Wright J.L.C., Boyd R.K., de Freitas A.S.W., Falk M., Foxall R.A., Jamieson W.D., Laycock M.V., McCulloch A.W., McInnes A.G., Odense P. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Can J Chem.* 1989; 67:481–490. <https://doi.org/10.1139/v89-075>



**EUROPEAN UNION REFERENCE  
LABORATORY FOR MARINE  
BIOTOXINS**

**EU-Harmonised Standard Operating  
Procedure for determination of domoic  
acid in shellfish and finfish by RP-HPLC  
using UV detection**

---

**Version 1, June 2008**

**Coordination:**

European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins (EU-RL-MB) Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) Estación Marítima S/N  
36200 Vigo, Spain  
E-mail: [eurlmb@mspsi.es](mailto:eurlmb@mspsi.es)  
<http://www.aesan.msps.es/en/CRLMB/web/home.shtml>

## Contents

Introduction .....	3
1 Scope.....	3
2 Normative references .....	4
3 Principle .....	4
4 Reagents .....	4
5 Apparatus.....	5
6 Procedure.....	6
7 Evaluation of results .....	8
8 Test report.....	9
Annex A (informative) Precision data.....	11
Bibliography .....	12

## Introduction

The amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin, domoic acid, belongs to a group of amino acids, called the kainoids, which are classed as neuroexcitants or excitoxins that interfere with the neurotransmission mechanisms in the brain. The toxin can be accumulated in shellfish feeding on a number of toxic *Pseudonitzschia* species. Ingestion of seafood contaminated with domoic acid can lead to an intoxication which symptoms include (among others) abdominal cramps, vomiting, disorientation and memory loss (amnesia) and can become severe in certain cases.

High performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV) was the first chemical analytical method for domoic acid and is still the most commonly used for monitoring shellfish. Domoic acid detection is facilitated by its strong absorbance at 242 nm [1].

This Standard Operating Procedure (SOP) is based on a procedure described by Quilliam, Xie and Hardstaff (1995) for the quantitative determination of domoic acid (DA) in unsalted seafood [2]. In this procedure, a single-step extraction with 50% aqueous methanol and a selective clean-up and preconcentration with strong anion exchange solid phase extraction are used. Determination is performed by high performance liquid chromatography with isocratic condition and ultraviolet absorbance detection. The method described in this SOP allows elimination, in view of results obtained in the validation procedure, of the clean-up step.

## 1 Scope

This Standard Operating Procedure specifies a method for the quantitative determination of domoic acid in bivalve molluscs and finfish. The limit of detection is about 10-80 ng/ml (0,05-4,0 mg/kg), depending on the UV detector sensitivity. The quantitation limit for domoic acid by this method is, at least, 2,7 mg/kg (or µg/kg). The method has been tested for domoic acid determination in different matrices such as mussels, clams, scallops and anchovies, spiked and/or naturally contaminated at levels ranging from 2,7 to 85,1 mg/kg (or µg/kg).

This Standard Operating Procedure furthermore specifies in Annex B a method for the quantitative determination of domoic acid in mussels and mussel products. This method works without halogenated solvent. After successful testing it may also be applicable to other shellfish, for example scallops. The limit of quantification of domoic acid by this method is 1,0

mg/kg. The method has been tested for domoic acid determination at levels ranging from 5 mg/kg to 12,9 mg/kg

## 2 Normative references

The following referenced documents are indispensable for the application of this document. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

EN ISO 3696, *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods (ISO 3696:1987)*.

## 3 Principle

Domoic acid is extracted from bivalve tissue with a mixture of methanol and water. The extract is filtered through a membrane filter and measured using HPLC equipment with isocratic elution and UV detection. The amount of domoic acid is calculated by the external standard method.

## 4 Reagents

During the analysis, unless otherwise stated, use only water according to grade 1 of EN ISO 3696.

All chemicals shall be of pro analysis (p. a.) quality, unless otherwise indicated.

Reference material originating from other sources than indicated may also be used if well-characterised and with a well-defined mass concentration.

**4.1 Methanol**, HPLC quality

**4.2 Acetonitrile**, HPLC quality

**4.3 Extraction solvent**, Methanol/water 50:50, v/v

**4.4 Acetonitrile/water**, 1:9 v/v

**4.5 Trifluoroacetic acid (TFA)**, spectrophotometric grade ( $\geq 99\%$ )

**4.6 Eluent**

Aqueous 10 % acetonitrile (4.2) with 0,1 % TFA (4.5). For single pump systems, mix 100 ml acetonitrile with ca 400 ml water, add 1,0 ml TFA, and dilute to 1 l with water. Other mobile phases could be used.

#### 4.7 Standard substance

Domoic acid, e.g. available from the Institute for Marine Biosciences, National Research Council of Canada, Halifax, Nova Scotia-Canada <sup>1</sup>. Sealed ampoules should be stored in the dark in a refrigerator (at approximately +4°C). Do not freeze the solution. Prior to opening, each ampoule should be allowed to warm to room temperature. Once the ampoule has been opened, accurate aliquots should be removed using calibrated volumetric equipment and transferred to other amber containers for dilution and/or analysis as soon as possible. Closed vials should be stored in the dark in a refrigerator (at approximately +4°C) for no more than 3 months.

#### 4.8 Standard solutions

##### 4.8.1 Calibration solutions

Prepare a series of calibration working solutions with increasing concentration of DA + epi-DA, within the mass range of e.g. 0,2 to 24,85 µg/ml, by accurately diluting the certified calibration solution with acetonitrile:water, 1:9 v/v (4.4). Keep solutions in the dark and refrigerated (at approximately 4°C) when not in use. Do not store them for more than 3 months. Do not freeze the solutions. Warm up solutions to room temperature before use.

#### 4.9 Reference material

Mussel tissue reference material for domoic acid, e.g. available from the Institute for Marine Biosciences, National Research Council of Canada, Halifax, Nova Scotia-Canada Mussel homogenate should be stored in the freezer (at -12 °C or lower). When a bottle is opened the entire contents should be used immediately. If sub sampling is necessary, a thorough blending of the bottle contents is required before a sub sample is removed, as some sedimentation occurs over long-term storage. The reference material may be used to test the accuracy of an existing analytical procedure.

## 5 Apparatus

### 5.1 General

Use usual laboratory apparatus and, in particular, the following:

**5.2 Analytical balance**, capable of weighing to the nearest of 0,1 g

---

### 5.3 Grinder or mixer

**5.4 Centrifuge**, capable to reach 3 000 g (refrigerated at 4°C, if possible)

**5.5 Centrifuge tubes**, nominal volume 30-50 ml, with crew tops

**5.6 Membrane filter**, methanol compatible with a pore size 0,2 µm or 0,45 µm

**5.7 Adjustable automatic pipettes**, cover in the range from 20 µl to 1000 µl

**5.8 HPLC instrumentation**, comprising the following

#### 5.8.1 Injection system

**5.8.2 Pump**, capable of isocratic elution

**5.8.3 Column oven**, able to reach 40°C ± 2°C

**5.8.4 Analytical column**, for example C18 reverse phase, 250 mm x 4.6mm i.d. packed with 5 µm

NOTE Other LC column and dimensions may be suitable if mobile phase flow and/or injection volumes are adjusted. The use of a guard column is recommended. If the HPLC is millibore compatible, a 250 mm x 2,1 mm i.d. column packed with the same stationary phase can be used with a 5 µl injection volume and a mobile phase flow rate of 0,2-0,3 ml/min.

**5.8.5 UV-spectrophotometric detector**, set to a wavelength of 242 nm, providing a S/N of 10:1 on injection of a 0,2 µg/ml domoic acid solution using the conditions given in 6.3

#### 5.8.6 Data system

#### 5.8.7 HPLC vials

**5.8.8 Glass amber vials**, 2 ml or less, with crimp caps (to store domoic acid working calibration solutions)

## 6 Procedure

### 6.1 Sample Preparation

**Bivalves with shell:** Thoroughly clean outside of the shellfish with fresh water. Open by cutting adductor muscle. Rinse inside with fresh water to remove sand and foreign material. Remove meat from shell by separating adductor muscles and tissue connecting at hinge. Do not use heat or

anaesthetics to open the shell. After removal from shellfish, drain tissues 5 min in a sieve to remove salt water. For representative sampling, at least 100-150 g of pooled tissue should be homogenized in a grinder or blender [4]. Sub samples from this homogenate can be taken immediately after blending, while still well mixed, or after mixing again. In the case of scallops, at least 10 specimens should be taken (Commission Decision 2002/226/CE) [5].

**Bivalves without shell (whole body or any edible part separately):** If needed, clean outside with fresh water and allow it to drain. For representative sampling, at least 100-150 g of pooled tissue should be homogenized in a grinder or blender. Sub samples from this homogenate can be taken immediately after blending, while still well-mixed, or after mixing again. In the case of scallops, at least 10 specimens or individual edible parts (muscle, muscle + gonad) should be taken (Commission Decision 2002/226/CE) [5].

**Fish:** clean, scale and eviscerate fish. In case of small fish  $\leq 15$  cm, use 5-10 fish. For intermediate-size fish, remove and discard heads, scales, tails, fins, guts, and inedible bones: fillet fish to obtain all flesh and skin from head to tail and from top of back to belly on both sides [4]. For representative sampling, at least 100-150 g of pooled tissue should be homogenized in a grinder or blender. Sub samples from this homogenate can be taken immediately after blending, while still well-mixed, or after mixing again.

## 6.2 Extraction procedure

Accurately weigh  $4 \text{ g} \pm 0.1 \text{ g}$  of tissue homogenate into a graduate centrifuge tube (5.4) or a stainless steel micro-blender cup. Add 16 ml of extraction solvent (methanol:water) 50:50, 4.3) and homogenize the sample extensively (3 min. at 10000 rpm). Do not try to recover all the tissue remaining in the homogenizer probe or blender cup, but wash them thoroughly afterwards to prevent contamination of the next sample.

If a blender has been used for homogenization, pour the resulting slurry into a centrifuge tube.

Centrifuge at  $3\ 000 \text{ g}$  or higher for 10 min. Filter a portion of the supernatant through a dry methanol-compatible  $0,45 \mu\text{m}$  or  $0,2 \mu\text{m}$  filter. Sample extracts should be analyzed as soon as possible. If analysis is not performed immediately, the extract may be stored in a tightly sealed screw-capped storage container in a freezer at c.a.  $-12^\circ\text{C}$ .

Extraction blank: perform the extraction procedure (see above) except substitute water in place of sample tissue (chromatograms should be free of peaks eluting near domoic acid or causing excessive baseline slope).

For screening samples with a known or suspected high level of contamination, a measured aliquot of the extract can be dilute to a fixed



volume with water, using a calibrated volumetric flask, graduated pipette or micropipettes, mix and analyze. For salted samples, deliver 1.0 ml of extract into a volumetric flask or graduated cylinder, dilute to 5 ml with water, mix and analyze.

### 6.3 HPLC measurement

Determination of the domoic acid content in a sample is performed after chromatographic separation on a reversed phase column using isocratic conditions (4.6).

The following HPLC conditions led to satisfying results:

Isocratic conditions

Column:	C18 reversed phase, 5 $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm
Temperature:	40°C
Flow:	1 ml/min
Injection volume:	20 $\mu$ l
UV detector:	242 nm

NOTE High injection volumes may require diluting the extract with water to avoid broadening of the domoic acid peak associated with injecting a solvent of stronger elution power than the mobile phase ("solvent wash-out" effect).

### 6.4 Calibration graph

Prepare a calibration graph, with at least four points, each day of the analysis and/or whenever the chromatographic conditions change. Plot the peak area against the concentration of the injected DA+ epi-DA calibration solutions. Ensure that the coefficient of correlation of calibration curve shows a linear regression ( $r \geq 0,99$ ; %  $Y_i/X_i$  100 %  $\pm$  10 %).

### 6.5 Sample injection

Inject samples in duplicate. Replicate single injections should have a coefficient of variation (CV) < 5 %. Avoid carry-over between injections of different samples by washing the injector loop.

## 7 Evaluation of results

### 7.1 Identification

Identify domoic acid and epi-domoic acid by comparing the retention times of the sample with that of the standards. DA identity should be confirmed

(e.g. co-chromatography, spectral analysis, monitoring the column eluent at two different wavelengths).

NOTE Pure domoic acid in solution has been found to gradually isomerise, especially to the C5'-diastereomer, epi-domoic acid (epi-DA); therefore, a mixture will inevitably result on long-term storage of any standard. Since epi-DA has a UV spectrum identical with that of DA, the relative molar response factors in LC with UV detection are identical and relative proportions can be recalculated at a time. Under some LC conditions, DA and epi-DA do not resolve; this does not present a problem and in fact makes analysis simpler. Analysts should base their instrument calibration and quantification on the sum of both DA and epi-DA areas [3].

## 7.2 Quantification

After determining each sample concentration (DA+epi-DA), (external standard method) with the calibration graph, calculate the level of domoic acid + epidomoic acid in the sample using the following formula:

$$\text{concentration } (\mu\text{g DA+ epi-DA/g}) = \frac{\mu\text{gDA} + \text{epiDA} / \text{ml injected extract}}{W} \times D \times Vt$$

- Vt - total volume of homogenate and extracting solvent in mlW  
 - sample tissue weigh (usually 4 g)  
 D - dilution factor (if extract has been diluted)

## 7.3 Precision

The method has been validated in a formal collaborative study with 13 participating laboratories. Details of the interlaboratory test on the precision of the method are given in annex A. The values derived from this interlaboratory test may not be applicable to concentration ranges and matrices other than those given in annex A.

## 8 Test report

The test report shall contain the following data:

- all information necessary for the identification of the sample (kind of sample, origin of sample, designation);
- all information necessary for the identification of the calibrant;
- a reference to this Standard Operating Procedure or to the test method used;
- the date and type of sampling procedure (if known);

- the date of receipt of the sample;
- the date of test;
- the test results and the units in which they have been expressed;
- any particular points observed in the course of the test;
- any operations not specified in the method or regarded as optional, which might have affected the results.

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP

## Annex A (informative)

### Precision data

The following data were obtained from the “EU validation study of domoic acid determination by HPLC-UV”, organised by the EU Reference Laboratory for Marine Biotoxins according to the Guidelines of Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of the Method of Analysis (AOAC, 2002) and using different matrices and contamination levels with blind duplicates.

**Table A.1 — Precision data**

Sample	1	2	3	4	5	6
Matrix	Clam spiked	Clam naturally contaminated	Mussel spiked	Gonad scallop naturally contaminated	Whole body scallop naturally contaminated	Anchovy naturally contaminated
Year	2003	2003	2003	2003	2003	2003
Number of laboratories	12	12	12	13	13	12
Number of laboratories retained after eliminating outliers	12	12	11	13	13	11
Number of outliers (laboratories)	0	0	1	0	0	1
Number of accepted results	12	12	11	13	13	11
Mean value, µg/g	3,38	17,7	11,6	2,72	9,63	85,1
Repeatability standard deviation $s_r$ , µg/g	0,28	0,40	0,37	0,12	0,18	1,1
Repeatability limit $r$ [ $r = 2,8 \times s_r$ ], µg/g	8,3	2,3	3,2	4,3	1,9	1,3
Reproducibility standard deviation $s_R$ , µg/g	0,51	1,6	2,0	0,62	1,2	6,6
Reproducibility limit $R$ [ $R = 2,8 \times s_R$ ], µg/g	15	9,0	17	23	12	7,7
Horrat	1,1	0,87	1,6	1,7	1,0	0,94
Recovery, %	79		84			

## Bibliography

- [1] Quilliam, M.A. "Chemical methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin". In *Manual on harmful marine microalgae*, ch. 9, 247-265 (2004). Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., and Cembella, A.D., Eds.
- [2] Quilliam, M.A., Xie, M., and Hardstaff, W.R. "Rapid extraction and cleanup for liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood". *Journal of AOAC International*, 78(2), 543-554 (1995).
- [3] Quilliam, M. A., Sim, P. G.; McCulloch, A.W. and McInness, A. G. "High performance liquid chromatography of domoic acid, a marine neurotoxin, with application to shellfish and plankton" *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 36, 139-154 (1989).
- [4] Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15<sup>th</sup> ED, sec 959.08 and 937.07, Volume II. AOAC, Arlington, VA, U.S.A. 1990.
- [5] Commission Decision of 15 March 2002 establishing special health checks for the harvesting of certain bivalve molluscs with a level of amnesic shellfish poison (ASP) exceeding the limit laid down by Council Directive 91/492/EEC (2002/226/EC). O.J.E.C. L75 of 16.3.2002, 65-66.