

**MINISTERO DELLA SALUTE**  
**DECRETO 16 maggio 2002**

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

**IL MINISTRO DELLA SALUTE**

*Visto il decreto legislativo 30 dicembre 1992, n. 530, concernente attuazione della direttiva 91/492/CEE, che stabilisce norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi;*

*Vista la legge 20 novembre 1995, n. 490, recante conversione in legge, con modificazioni, del decreto-legge 20 settembre 1995, n. 390, concernente provvedimenti urgenti in materia di prezzi di specialità medicinali, nonché in materia sanitaria;*

*Visto il decreto legislativo 15 marzo 1996, n. 249, recante modificazioni al decreto legislativo 30 dicembre 1992, n. 530, concernente attuazione della direttiva 91/492/CEE che stabilisce norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi;*

*Visto il decreto del Ministero della sanità 31 luglio 1995 concernente metodiche di analisi per la determinazione dei coliformi fecali, di Escherichia coli, delle salmonelle, delle biotossine PSP (Paralytic Shellfish Poison), delle tossine DSP (Diarrhetic Shellfish Poison), del mercurio e del piombo nei molluschi bivalvi (pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana n. 279 del 29 novembre 1995);*

*Visto il decreto ministeriale 14 ottobre 1998 recante modificazioni all'allegato al decreto legislativo 30 dicembre 1992, n. 530, e successive modifiche, in attuazione della direttiva 97/61/CE;*

*Vista la direttiva del Consiglio 91/492/CEE del 15 luglio 1991 che stabilisce norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi;*

*Vista la direttiva del Consiglio 97/61/CE del 20 ottobre 1997 che modifica l'allegato alla direttiva 91/492/CEE, che stabilisce norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi;*

*Vista la decisione della Commissione 2002/225/CE del 15 marzo 2002 che fissa norme specifiche per l'attuazione della direttiva 91/492/CEE del Consiglio per quanto concerne i tenori massimi e i metodi d'analisi di talune biotossine marine in molluschi bivalvi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini;*

*Vista la decisione del Consiglio 93/383/CEE del 14 luglio 1993 in materia di laboratori di riferimento per il monitoraggio delle biotossine marine;*

*Considerato che le decisioni sopracitate apportano modifiche tecniche alla direttiva 91/492/CEE;*

*Visto l'art. 17 del decreto legislativo 30 dicembre 1992, n. 530;*

*Visto l'art. 20 della legge 16 aprile 1987, n. 183, concernente il coordinamento delle politiche riguardanti l'appartenenza dell'Italia alle Comunità europee e l'adeguamento dell'ordinamento interno agli atti normativi comunitari;*

**Decreta:**

**Art. 1.**

Il presente decreto stabilisce il tenore massimo di biotossine algali del complesso DSP (acido okadaico, dinophysitossine), yessotossine, pectonotossine e azaspiracidi, nonché i metodi d'analisi da impiegare per la determinazione delle sopracitate biotossine e delle biotossine PSP e ASP, e si applica a molluschi bivalvi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini destinati al consumo immediato o ad ulteriore lavorazione prima del consumo.

**Art. 2.**

Il tenore massimo complessivo di acido okadaico, dinophysitossine e pectonotossine negli animali di cui all'art. 1 (corpo intero o parti consumabili separatamente) è fissato a 160 µg di equivalente acido okadaico/kg. I metodi d'analisi sono riportati nell'allegato.

**Art. 3.**

Il tenore massimo complessivo di yessotossine negli animali di cui all'art. 1 (corpo intero o parti consumabili separatamente) è fissato a 1 mg di equivalente yessotossine/kg. I metodi d'analisi sono riportati nell'allegato.

**Art. 4.**

Il tenore massimo complessivo di azaspiracidi negli animali di cui all'art. 1 (corpo intero o parti consumabili separatamente) è fissato a 160 µg di equivalente azaspiracido/kg. I metodi d'analisi sono riportati nell'allegato.

**Art. 5.**

Per il complesso DSP (acido okadaico, dinophysitossine), yessotossine, pectonotossine e azaspiracidi nel caso in cui i risultati delle analisi condotte dimostrino discrepanze tra i diversi metodi, il metodo di riferimento è il test sui topi.

**Art. 6.**

Il tenore massimo complessivo di ASP (Amnesic Shellfish Poison) nelle parti commestibili degli animali di cui all'art. 1 (corpo intero o parti commestibili separatamente) è fissato in 20 mg/kg di acido domoico secondo il metodo di analisi HPLC riportato in allegato.

**Art. 7.**

Il tenore massimo complessivo di veleno paralizzante (PSP) nelle parti commestibili degli animali di cui all'art. 1 (corpo intero o parti consumabili separatamente) è fissato a 800 microgrammi di equivalente Saxitossina/Kg, utilizzando il metodo di analisi biologico - se del caso associato ad un metodo chimico di ricerca delle saxitossine - o qualsiasi altro metodo riconosciuto secondo la procedura comunitaria. Il metodo di analisi è riportato in allegato.

In caso di contestazione dei risultati, il metodo di riferimento deve essere il test sul topo.

Il presente decreto e' trasmesso alla Corte dei conti per la registrazione ed entra in vigore il giorno dopo la sua pubblicazione nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana.

Roma, 16 maggio 2002

Il Ministro: Sirchia

*Registrato alla Corte dei conti il 12 giugno 2002*

*Ufficio di controllo preventivo sui Ministeri dei servizi alla persona e dei beni culturali, registro n. 3 Salute, foglio n. 314*

### **Allegato**

## **METODI DI DETERMINAZIONE**

### **Metodi biologici.**

Una serie di procedure per il test sui topi, che differiscono nel materiale di prova (epatopancreas o corpo intero) e nei solventi utilizzati per le fasi di estrazione e purificazione, puo' essere utilizzata per la determinazione delle tossine di cui all'art. 1.

Sensibilità e selettività dipendono dalla scelta dei solventi utilizzati per le fasi di estrazione e purificazione e di ciò occorre tenere conto in sede di decisione del metodo da utilizzare al fine di coprire l'intera gamma di tossine.

Un unico test sui topi, che comporta estrazione con acetone, può essere utilizzato per individuare acido okadaico, dinophysitossine, pectenotossine e yessotossine. Il test può essere, se necessario, completato mediante fasi di separazione liquido/liquido con acetato d'etile/acqua o diclorometano/acqua per eliminare potenziali interferenze. Per l'individuazione di azaspiracidi il test deve essere condotto sul corpo intero.

Per ogni test occorre utilizzare tre topi. La morte di due topi su tre entro 24 ore dall'inoculazione di un estratto equivalente a 5 gr di epatopancreas o 25 gr del corpo intero (in ciascun topo) deve essere considerato un risultato positivo per la presenza di una o più tossine di cui all'art. 1 a livelli superiori a quelli fissati dagli articoli 2, 3 e 4.

Il test sul topo condotto con estrazione del materiale di prova con acetone mediante separazione liquido/liquido con etere etilico può essere utilizzato per individuare acido okadaico, tossine da dinoflagellate e pectenotossine. Tale metodo non consente la determinazione completa di yessotossine e azaspiracidi in quanto perdite di tali tossine possono verificarsi nella fase di separazione. Per ogni test occorre utilizzare tre topi. La morte di due topi su tre entro 24 ore dall'inoculazione di un estratto equivalente a 5 gr di epatopancreas o 25 gr del corpo intero (in ciascun topo) deve essere considerato un risultato positivo della presenza di acido okadaico, tossine da dinoflagellate e pectenotossine a livelli superiori a quelli di cui all'art. 2.

Il test sui ratti può individuare acido okadaico, tossine da dinoflagellate e azaspiracidi. Per ogni test occorre utilizzare tre ratti. Una reazione diarrogena dei tre ratti è considerata risultato positivo della presenza di acido okadaico, tossine da dinoflagellate e azaspiracidi a livelli superiori a quelli di cui all'art. 2 e all'art. 4.

## **Metodi alternativi di determinazione.**

Una serie di metodi quali la cromatografia liquida ad alto rendimento (HPLC con determinazione fluorimetrica, la cromatografia liquida (LC-spettrometria di massa (MS) immunosaggi, e test funzionali quali il test di inibizione della fosfatasi possono essere utilizzati come metodi alternativi o complementari ai metodi di prova biologici a condizione che, da soli o in combinazione, siano in grado di determinare almeno i seguenti analoghi:

acido okadaico e tossine da dinoflagellate: può risultare necessaria una fase idrolitica per individuare la presenza di DTX3;

pectenotossine: PTX1 e PTX2;

yessotossine: YTX, 45 OH YTX, Homo YTX, e 45 OH Homo YTX;

azaspiracidi: AZA1, AZA2 e AZA3.

Se vengono scoperti nuovi analoghi che rivestono importanza per la sanità pubblica, occorre includerli nell'analisi.

Dovranno essere disponibili degli standard ai fini dell'analisi chimica. La tossicità complessiva e' calcolata avvalendosi di fattori di conversione basati sui dati di tossicità disponibili per ciascuna tossina.

Le caratteristiche di rendimento di tali metodi devono essere definite e convalidate da un protocollo concordato a livello internazionale.

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

### **1. Scopo e applicazione.**

Questa procedura ha lo scopo di determinare le tossine liposolubili AOs, DTXs, PTXs, YTXs e AZAs nei molluschi bivalvi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini. Il metodo e' semiquantitativo. La quantità minima di tossina capace di uccidere un topo di 20 g entro le 24 ore, dopo iniezione intraperitoneo, è definita unità topo (UT). Questa corrisponde, ad esempio, a circa 4 µg di acido okadaico (AOs) o a circa 3,6 µg di DTX1.

### **2. Specificità.**

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

Sono inoltre rilevate con lo stesso metodo: brevitossine; gymnodimine, spiroliidi, pinnatossine, ciguatossine, palytossine, aplysiatossine e lyngyatossine.

La presenza di alcune di queste tossine liposolubili, non riferibili all'AOs e DTXs, può essere sospettata osservando attentamente i sintomi nel topo dopo iniezione intraperitoneale.

### **3. Precauzioni.**

Devono essere adoperati i guanti per manipolare sia il materiale che può contenere le tossine che gli animali.

#### **4. Interferenze.**

Gli acidi grassi liberi possono produrre interferenze.

#### **5. Principio.**

5.1 Il metodo si basa sull'effetto della tossicità acuta provocata in topi adulti dopo una inoculazione intraperitoneale di un estratto di corpo intero edibile di molluschi bivalvi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini.

#### **La procedura include:**

prelievo della parte edibile;  
omogeneizzazione;  
estrazione delle tossine con acetone e con metanolo;  
evaporazione degli estratti;  
estrazione con dietilere del residuo risospeso con acqua;  
evaporazione dell'estratto in dietilere;  
risospensione del residuo lipidico in una soluzione acquosa all'1% di Tween 60 (emulsionante);  
inoculazione intraperitoneale in un topo dell'estratto lipidico emulsionato;  
determinazione del tempo di morte del topo e valutazione della tossicità.

#### **6. Apparecchiatura.**

6.1 Stabulario o armadio stabulario opportunamente climatizzati per il benessere dei topi e relativi box per gli animali.

6.2 Cappa chimica.

6.3 Bilancia tecnica con sensibilità di 0,1 g.

6.4 Omogenizzatore a lame rotanti.

6.5 Omogenizzatore ad immersione ad alta velocità.

6.6 Agitatore magnetico.

6.7 Strumento ad ultrasuoni.

6.8 Centrifuga in grado di operare a 3000 r.p.m.

6.9 Essiccatore a vuoto rotante.

6.10 Bagnomaria in grado di operare tra 40 °C e 70 °C.

6.11 Pompa per vuoto meccanica o ad acqua.

6.12 Cronometro.

6.13 Forbici, pinze, coltelli, cucchiari, retina, propipette, guanti monouso.

## **7. Vetreria.**

7.1 Palloni in vetro da 1 o 2 l e 100 ml con relativi raccordi.

7.2 Imbuti separatori da 250 ml.

7.3 Cilindri da 50 mL e 100 ml.

7.4 Pipette graduate e Pasteur.

7.5 Bacinelle, portaprovette, contenitori vari, siringhe monouso con ago da insulina.

7.6 Provettoni in vetro o di altro materiale resistente ai solventi impiegati, da circa 500 ml.

7.7 Provette graduate con tappo.

## **8. Reagenti.**

8.1 Tutti i reagenti devono essere di qualità analitica.

8.1.2 Acqua distillata.

8.1.3 Acetone.

8.1.4 Metanolo.

8.1.5 Dietiletere.

8.1.6 Butanolo.

8.1.7 Tween 60.

## **9. Soluzioni.**

9.1 Tween 60 all'1%: 1g di Tween 60 e' disciolto in 100 ml di acqua distillata

## **10. Animali per il test.**

10.1 Utilizzare topi albini di razza Swiss di peso compreso fra 18-20g.

Gli animali devono essere tenuti nelle strutture di stabulazione (6.1) per almeno cinque giorni prima del saggio.

## **11. Procedimento.**

11.1 Preparazione del campione.

11.1.1 Pulire esternamente con acqua una quantità opportuna del campione di prova. Prelevare il

corpo intero edibile di ciascun individuo ponendo la massima attenzione a non danneggiare le parti molli. Risciacquare con acqua distillata, qualora ce ne fosse bisogno, la parte intera edibile del campione da provare per rimuovere eventuale materiale estraneo. Non si devono usare fonti di calore o anestetici per prelevare il materiale edibile.

11.1.2 Prelevare circa 150 g del campione così ottenuto e trasferirli su una retina dove vengono lasciati sgocciolare per circa 5 minuti.

11.1.3 Omogeneizzare finemente.

11.2 Estrazione.

11.2.1 Effettuare le fasi di estrazione con solventi organici sotto cappa chimica.

11.2.2 Pesare  $100 \pm 0,2$  g di omogenato (11.1.3).

11.2.3 Aggiungere all'omogenato (11.2.2) 300 ml di acetone ed estrarre con omogenizzatore ad immersione per 2 minuti.

11.2.4 Filtrare sotto pressione ridotta o centrifugare il materiale (11.2.3) a 3000 rpm per 5 minuti e raccogliere il filtrato o il surnatante in un pallone da 1000 ml.

11.2.5 Riprendere il residuo, riestrarlo con metanolo (300 ml) con omogenizzatore ad immersione per 2 minuti e ripetere l'operazione come descritta nel punto 11.2.4.

11.2.6 Evaporare sotto pressione ridotta l'estratto acetone e metanolico riuniti fino ad un volume di circa 50 ml (preferibilmente in un pallone da 1 o 2 l). Può essere aggiunto del butanolo (non più di 50 ml) per evitare la formazione di eccessiva schiuma.

11.2.7 Trasferire la soluzione condensata in un imbuto separatore.

11.2.8 Sciacquare il pallone utilizzato per l'evaporazione con un piccolo volume di acqua (minore di 5 ml) e dietilere (100 ml). Aggiungere questa miscela nell'imbuto separatore e agitare delicatamente.

11.2.9 Terminata la separazione delle due fasi, allontanare la fase acquosa e conservarla.

11.2.10 Sciacquare ancora due volte la fase di dietilere con circa 50 ml acqua. A causa dell'emulsione, parte delle tossine potrebbe rimanere nella fase acquosa. Sciacquare la fase acquosa con 20 ml di dietilere e aggiungerlo all'estratto iniziale di dietilere.

11.2.11 Ridurre per evaporazione il volume di dietilere in un pallone.

11.2.12 Trasferire e completare l'evaporazione del solvente (estratto lipidico) in una provetta graduata con tappo.

## **12. Preparazione dell'inoculo.**

12.1 Portare il residuo lipidico (11.2.12) ad un volume finale di 4 ml con Tween 60 all'1% (9.1).

12.2 Curare la formazione di un'emulsione omogenea e senza grumi eventualmente con l'uso di

ultrasuoni o con ancoretta magnetica.

### **13. Inoculazione degli animali.**

13.1 Pesare tre topi di 18-20 g.

13.2 Iniettare intraperitoneo a ciascuno dei tre topi pesati (13.1) 1 ml dell'emulsione (12.2), equivalente a 25 g di tessuto di parte edibile, utilizzando una siringa monouso con ago da insulina.

13.3 Tenere gli animali in osservazione per 24 ore.

### **14. Interpretazione dei risultati.**

14.1 La morte di due dei tre topi entro le 24 ore indica la presenza di una o più tossine appartenenti ai seguenti gruppi: AOs, DTXs, PTXs, YTXs e AZAs, a livelli superiori a quelli stabiliti nella decisione della Commissione 2002/225/CE del 15 marzo 2002 ed il test è considerato positivo.

La sopravvivenza di almeno due topi oltre le 24 ore indica l'assenza delle tossine sopra menzionate o la loro presenza a livelli inferiori a quelli stabiliti nella decisione della Commissione 2002/225/CE del 15 marzo 2002; il test è considerato negativo. In caso di test positivo i molluschi non sono idonei al consumo umano.

### **15. Note.**

15.1 La soluzione di acetone e metanolo sviluppa molta schiuma, pertanto si consiglia l'utilizzo di grandi palloni per l'evaporazione (1-2 l). L'aggiunta di circa 50 ml di butanolo evita la formazione di schiuma e accelera il processo di evaporazione dell'acqua formando una miscela azeotropica. Non aggiungere un volume eccessivo di butanolo, poiché esso potrebbe rimanere nel condensato.

15.2 Le YTXs portano alla morte del topo persino anche a livelli inferiori a 1 mg/Kg di parte edibile. Se i topi muoiono con spasmi e convulsioni, è sospetta la presenza di tali tossine, sebbene i sintomi delle PTXs e delle AZAs ad alte concentrazioni siano molto simili. Nel caso sia sospetta la presenza di YTXs deve essere usato il protocollo 2.

15.3 Quando i solventi utilizzati per la prova (acetone, metanolo, dietilere e butanolo) non sono usati da lungo tempo è opportuno verificare la loro idoneità al test con una prova in bianco.

### **16. Bibliografia.**

*16.1 Metodo sviluppato dal Prof. Yasumoto T., JPRL, basato sul metodo: Yasumoto T., Murata M., Oshima Y., Matsumoto G.K., and Clardy J. (1984) - Diarrhetic Shellfish Poisoning. In: "E.P. Ragelis (Ed): Seafood Toxins, p 207-214. American Chemical Society.*

## **DETERMINAZIONE DI TOSSINE LIPOSOLUBILI (AOs, DTXs, PTXs, AZAs e YTXs)**

### **Protocollo 2.**

#### **1. Scopo e applicazione.**



Questa procedura ha lo scopo di determinare le tossine liposolubili AOs, DTXs, PTXs, YTXs e AZAs ai molluschi bivalvi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini. Il metodo è semiquantitativo. La quantità minima di tossina capace di uccidere un topo di 20 g entro le 24 ore, dopo iniezione intraperitoneo, è definita unità topo (UT). Questa corrisponde, ad esempio, a circa 4 µg di acido okadaico (AOs) o a circa 3,6 µg di DTX1.

## **2. Specificità.**

Il metodo rileva tutte le componenti storicamente incluse nel gruppo delle DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning): acido okadaico ed analoghi (AOs), dinophysitossine (DTXs), pectenotossine (PTXs), yessotossine (YTXs); tossine liposolubili diarretiche identificate recentemente come azaspiracid (AZAs).

Sono inoltre rilevate con lo stesso metodo: brevitossine; gymnodimine, spirolidi, pinnatossine, ciguatossine, palytossine, aplysiatossine e lyngyatossine.

La presenza di alcune di queste tossine liposolubili, non riferibili all'AOs e DTXs, può essere sospettata osservando attentamente i sintomi sul topo dopo iniezione intraperitoneale.

## **3. Precauzioni.**

Devono essere adoperati i guanti per manipolare sia il materiale che può contenere le tossine che gli animali.

## **4. Interferenze.**

Gli acidi grassi liberi possono produrre interferenze.

## **5. Principio.**

5.1 Il metodo si basa sull'effetto della tossicità acuta provocata in topi adulti dopo una inoculazione intraperitoneale di un estratto di corpo intero edibile di molluschi bivalvi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini. La procedura include:

- prelievo della parte edibile;
- omogeneizzazione;
- estrazione delle tossine con acetone e con metanolo;
- evaporazione degli estratti;
- risospensione del residuo con diclorometano: metanolo 60% (1:2);
- evaporazione dell'estratto in diclorometano (Step 1);
- risospensione del residuo lipidico in una soluzione acquosa all'1% di Tween 60 (emulsionante);
- inoculazione intraperitoneale in un topo dell'estratto lipidico emulsionato;
- determinazione del tempo di morte del topo e valutazione della tossicità;
- evaporazione di una aliquota dell'estratto metanolico (Step 2);
- risospensione del residuo metanolico in una soluzione acquosa all'1% di Tween 60 (emulsionante);
- inoculazione intraperitoneale in un topo dell'estratto lipidico emulsionato;
- determinazione del tempo di morte del topo e valutazione della tossicità.

## **6. Apparecchiatura.**

6.1 Stabulario o armadio stabulario opportunamente climatizzati per il benessere dei topi e relativi Box per gli animali.

- 6.2 Cappa chimica.
- 6.3 Bilancia tecnica con sensibilita' di 0,1 g.
- 6.4 Omogenizzatore a lame rotanti.
- 6.5 Omogenizzatore ad immersione ad alta velocita'.
- 6.6 Agitatore magnetico.
- 6.7 Strumento ad ultrasuoni.
- 6.8 Centrifuga in grado di operare a 3000 r.p.m.
- 6.9 Essiccatore a vuoto rotante.
- 6.10 Bagnomaria in grado di operare tra 40 oC e 70 oC.
- 6.11 Pompa per vuoto meccanica o ad acqua.
- 6.12 Cronometro.
- 6.13 Forbici, pinze, coltelli, cucchiari, retina, propipette, guanti monouso.

## **7. Vetreria.**

- 7.1 Palloni in vetro da 1 o 2 l e 100 ml con relativi raccordi.
- 7.2 Imbuti separatori da 250 ml.
- 7.3 Cilindri da 50 ml e 100 ml.
- 7.4 Pipette graduate e Pasteur.
- 7.5 Bacinelle, portaprovette, contenitori vari, siringhe monouso con ago da insulina.
- 7.6 Provettoni in vetro o di altro materiale resistente ai solventi impiegati, da circa 500 ml.
- 7.7 Provette graduate con tappo.

## **8. Reagenti.**

- 8.1 Tutti i reagenti devono essere di qualità analitica.
  - 8.1.1 Acqua distillata.
  - 8.1.2 Acetone.
  - 8.1.3 Diclorometano.
  - 8.1.4 Metanolo.

8.1.5 Butanolo.

8.1.6 Tween 60.

## **9. Soluzioni.**

9.1 Tween 60 all'1%: 1g di Tween 60 e' disciolto in 100 ml di acqua distillata.

9.2 Metanolo al 60% (metanolo: acqua 6:4).

9.3 Diclorometano-metanolo presaturati (diclorometano: metanolo 60% 1 : 2).

## **10. Animali per il test.**

10.1 Utilizzare topi albinici di razza Swiss di peso compreso fra 18-20 g.

Gli animali devono essere tenuti nelle strutture di stabulazione (6.1) per almeno 5 giorni prima del saggio.

## **11. Procedimento.**

11.1 Preparazione del campione.

11.1.1 Pulire esternamente con acqua una quantità opportuna del campione di prova. Prelevare il corpo intero edibile di ciascun individuo ponendo la massima attenzione a non danneggiare le parti molli. Risciacquare con acqua distillata, qualora ce ne fosse bisogno, la parte intera edibile del campione da provare per rimuovere eventuale materiale estraneo. Non si devono usare fonti di calore o anestetici per prelevare il materiale edibile.

11.1.2 Prelevare circa 150 g di corpo intero edibile del campione e trasferirli su una retina dove sono lasciati sgocciolare per circa 5 minuti.

11.1.3 Omogeneizzare finemente.

11.2 Estrazione.

11.2.1 Effettuare le fasi di estrazione con solventi organici sotto cappa chimica.

11.2.2 Pesare  $100 \pm 0,2$  g di omogenato (11.1.3) in un tubo da centrifuga.

11.2.3 Aggiungere all'omogenato (11.2.2) 300 ml di acetone ed estrarre con omogenizzatore ad immersione per 2 minuti.

11.2.4 Filtrare sotto pressione ridotta o centrifugare il materiale (11.2.3) a 3000 rpm per 5 minuti e raccogliere il filtrato od il surnatante in un pallone da 1000 ml.

11.2.5 Riprendere il residuo, riestrarlo con metanolo (300 ml) con omogenizzatore ad immersione per 2 minuti e ripetere l'operazione come descritta nel punto 11.2.4.

11.2.6 Evaporare sotto pressione ridotta l'estratto acetone e metanolico riuniti (preferibilmente in un pallone da 1 o 2 l). Può essere aggiunto del butanolo (non più di 50 ml) per evitare la

formazione di eccessiva schiuma.

11.2.7 Trasferire il residuo in un imbuto separatore con 30 ml di diclorometano e 60 ml di metanolo al 60% (metanolo:acqua = 6:4). E' essenziale che i due solventi siano presaturati, altrimenti si potrebbe ottenere un'emulsione troppo densa.

11.2.8 Agitare l'imbuto separatore delicatamente. Terminata la separazione delle due fasi, prendere l'estratto di diclorometano e conservare quello di metanolo.

11.2.9 Estrarre la soluzione di diclorometano per due volte con 60 ml di metanolo al 60%.

11.2.10 Unire gli estratti di metanolo.

11.2.11 Note:

La presenza di AOs, DTXs, PTXs e AZ e' evidenziata nella fase di diclorometano.

La presenza di YTXs è evidenziata nella fase di metanolo 60%.

## **12. Determinazione di AOs, DTXs, PTXs e AZAs (Step 1).**

12.1 Ridurre per evaporazione, in un pallone, il volume della fase di diclorometano.

12.2 Trasferire e completare l'evaporazione del solvente in una provetta graduata con tappo.

## **13. Preparazione dell'inoculo.**

13.1 Portare il residuo lipidico (12.2) ad un volume finale di 4 ml con Tween 60 all'1% (9.1).

13.2 Curare la formazione di un'emulsione omogenea e senza grumi eventualmente con l'uso di ultrasuoni o con ancorotta magnetica.

## **14. Inoculazione degli animali.**

14.1 Pesare tre topi di 18-20 g.

14.2 Iniettare intraperitoneo a ciascuno dei tre topi pesati (13.1) 1 ml dell'emulsione (13.2), equivalente a 25 g di tessuto, utilizzando una siringa monouso con ago da insulina.

14.3 Tenere gli animali in osservazione per 24 ore.

## **15. Interpretazione dei risultati.**

15.1 La morte di due dei tre topi entro le 24 ore indica la presenza di una o più tossine appartenenti ai seguenti gruppi: AOs, DTXs, PTXs e AZAs, a livelli superiori a quelli stabiliti nella decisione della Commissione 2002/225/CE del 15 marzo 2002 ed il test è considerato positivo.

La sopravvivenza di almeno due topi oltre le 24 ore indica l'assenza delle tossine sopra menzionate o la loro presenza a livelli inferiori a quelli stabiliti nella decisione della Commissione 2002/225/CE del 15 marzo 2002; il test e' considerato negativo. In caso di test positivo i molluschi non sono idonei al consumo umano.

## **16. Determinazione di YTXs (step 2).**

- 16.1 Portare gli estratti metanolici 60% raccolti a 200 ml con metanolo.
- 16.2 Prendere 16 ml della soluzione metanolica acquosa (16.1) ed evaporarli quasi completamente.
- 16.3 Trasferire e completare l'evaporazione dei solventi in una provetta graduata con tappo.

## **17. Preparazione dell'inoculo.**

- 17.1 Portare il residuo lipidico (16.4) ad un volume finale di 4 ml con Tween 60 all'1% (9.1).
  - 17.1.1 Curare la formazione di un'emulsione omogenea e senza grumi eventualmente con l'uso di ultrasuoni o con ancorotta magnetica.

## **18. Inoculazione degli animali.**

- 18.1 Pesare tre topi di 18-20 g.
- 18.2 Iniettare intraperitoneo a ciascuno dei tre topi pesati (18.1) 1 ml dell'emulsione (17.2), equivalente a 2 g di tessuto di parte edibile, utilizzando una siringa monouso con ago da insulina.
- 18.3 Tenere gli animali in osservazione per 6 ore.

## **19. Interpretazione dei risultati.**

- 19.1 La morte di due dei tre topi entro le 5 ore indica la presenza di YTXs, a livelli superiori a quelli stabiliti nella decisione della Commissione 2002/225/CE del 15 marzo 2002 ed il test è considerato positivo. La sopravvivenza di almeno due topi oltre le 5 ore indica l'assenza delle tossine sopra menzionate o la loro presenza a livelli inferiori a quelli stabiliti nella decisione della Commissione 2002/225/CE del 15 marzo 2002; il test è considerato negativo. Se si verifica la sopravvivenza di due topi oltre le 5 ore ma il terzo ha un tempo di sopravvivenza inferiore alle tre ore il test deve essere ripetuto. Si determina quindi la mediana dei sei tempi di sopravvivenza registrati complessivamente se questa è inferiore alle 5 ore il test si considera positivo. In caso di test positivo i molluschi non sono idonei al consumo umano.
- 19.2 Quando i solventi utilizzati per la prova (acetone, metanolo, diclorometano e butanolo) non sono usati da lungo tempo è opportuno verificare la loro idoneità al test con una prova in bianco.

## **20. Bibliografia.**

- 20.1 *Metodo sviluppato dal Prof. Yasumoto T., JPRL, basato sul metodo:*

*Yasumoto T., Murata M., Oshima Y., Matsumoto G.K., and Clardy J. (1984) - Diarrhetic Shellfish Poisoning. In: "E.P. Ragelis (Ed): Seafood Toxins, p 207-214. American Chemical Society.*

## **DETERMINAZIONE DELLE BIOTOSSINE ALGALI PSP (PARALYTIC SHELLFISH POISON)**

## **1. Principio.**

1.1 Il metodo si basa sulla inoculazione intraperitoneale di un estratto di molluschi in topi adulti. La presenza di tossina PSP provoca la morte degli animali.

## **2. Materiali.**

2.1 Si utilizzano topi albini di razza Swiss di peso compreso fra i 19 e 21 g. Se il peso è maggiore di 21 o minore di 19 si applica il fattore di correzione del peso. Non si possono utilizzare topi con peso maggiore di 23 g e topi già usati.

## **3. Preparazione del campione.**

3.1 I molluschi da analizzare vengono puliti esternamente lavandoli con acqua. Si aprono tagliando i muscoli adduttori e si rimuovono i tessuti molli (polpa) del mollusco dalla conchiglia. Non si debbono usare ne' calore ne' anestetici prima di aprire il mollusco e bisogna evitare di danneggiare o tagliarne il corpo.

3.2 Circa 100-150 g di polpa vengono trasferiti su una retina di plastica, dove vengono lasciati scolare per 5'.

3.3 Si omogeneizza il campione in frullatore elettrico.

## **4. Estrazione del campione.**

4.1 Si pesano 100 g di materiale omogeneizzato.

4.2 Si aggiungono 100 ml di HCl 0,25 N, si agita e si verifica che il pH sia compreso fra 2 e 2,5.

4.3 La miscela viene portata ad ebollizione e si lascia bollire lentamente per 5'.

4.4 Si lascia raffreddare a temperatura ambiente e si verifica nuovamente il valore del pH che deve essere compreso fra 2 e 2,5. Per abbassarlo si aggiunge HCl 5 N, agitando fino ad ottenere il valore del pH voluto. Per alzare il pH si aggiunge alla miscela NaOH 0,1 N lasciandola cadere a gocce ed agitando costantemente per prevenire una alcalinizzazione locale e di conseguenza la distruzione della tossina.

4.5 Si trasferisce la miscela in un cilindro graduato da 200 ml e si porta a volume con acqua.

4.6 Si centrifuga la miscela a 3000 r.p.m. per 5'.

4.7 Il sopranatante viene trasferito in una beuta e si controlla di nuovo il pH.

## **5. Inoculazione degli animali.**

5.1 Si inocula nel peritoneo di ciascun topo test 1 ml di estratto acido.

5.2 Si annota con un cronometro il tempo all'inizio della inoculazione e si osserva attentamente il topo per stabilire il tempo di morte indicato dall'ultimo respiro.

5.3 Si può usare per l'iniziale determinazione un topo solo, ma e' preferibile usarne 2 o 3.

5.4 Se tutti i topi inoculati sopravvivono oltre i 60 minuti la prova deve ritenersi terminata in quanto la concentrazione delle tossine è da considerarsi non determinabile (N.D.).

5.4 Se il tempo di morte o la mediana dei tempi di morte dei topi e' minore di 5 minuti si fa una diluizione per ottenere un tempo di morte compreso tra 5 e 7 minuti.

5.5 Se il tempo di morte di 1 o 2 topi a cui è stato iniettato l'estratto non diluito risulta maggiore di 7 minuti, tre o più topi devono essere inoculati per stabilire la tossicità del campione.

5.6 Se e' necessaria una elevata diluizione, si aggiusta il pH della soluzione aggiungendo gocce di HCl (0,1 o 0,01 N) per portare il pH ad un valore tra 2 e 2,5.

5.7 Si inoculano tre topi con la diluizione che da' un tempo di morte di 5-7 minuti.

## **6. Interpretazione dei risultati.**

6.1 Si determina il tempo mediano di morte dei topi tenendo presente anche quelli sopravvissuti e tramite la tabella 2 si determinano i corrispondenti valori di unità topo.

6.2 Se il peso degli animali è minore di 19 g o maggiore di 21 g si opera una correzione per ciascun topo moltiplicando le unità topo corrispondenti al tempo di morte per il fattore di correzione del peso per quel topo ricavato in base alla tabella 3 ed infine si sceglie il valore mediano delle unità topo corrette per gruppo (considerare il tempo di morte dei sopravvissuti come minore di 60 minuti o equivalente a minore di 0,875 U.T. nel calcolo della mediana).

6.3 Si convertono le U.T. in microprogrammi ( $\mu\text{g}$ ) di tossina/ml moltiplicandole per il valore del fattore di conversione (C.F.). Quest'ultimo e' dato dal rapporto tra microgrammi di tossina PSP della soluzione di riferimento inoculata in peritoneo e l'U.T. corretta:  $\mu\text{g}$  di tossina/100 g di polpa ( $\mu/\text{ml}$ ) x fattore di diluizione x 200.

## **7. Standardizzazione del metodo biologico.**

7.1 Preparare una soluzione standard di lavoro di PSP, utilizzando una soluzione madre USA, fino ad ottenere una concentrazione di  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Si ottiene portando 1 ml di soluzione standard madre a 100 ml con acqua distillata. Questa soluzione e' stabile numerose settimane a 3-4 oC.

7.2 Calcolo del valore del C.F. (fattore di conversione).

7.2.1 Si diluiscono aliquote di 10 ml di soluzione standard di lavoro (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) con 10-15-20-25-30 ml di H<sub>2</sub>O. Il pH delle diluizioni deve essere compreso fra 2 e 2,5.

7.2.2 Viene scelta quella diluizione che iniettata in tre o più topi per via intraperitoneale alla dose di 1 ml determina la morte degli animali in un tempo mediano di 5-7 minuti.

7.2.3 La diluizione scelta viene provata con variazioni di +1 ml di H<sub>2</sub>O (ad esempio se 10 ml di standard diluiti con 25 ml di H<sub>2</sub>O uccidono i topi in 5-7 minuti, si provano soluzioni diluite 10 + 24 e 10 + 26). Si inietta un gruppo di topi con 1 ml di ciascuna delle 2 o 3 diluizioni che determinano la morte nel tempo mediano di 5-7 minuti.

7.2.4 Si inietta una dose di 1 ml a ciascun topo per via intraperitoneale e si determina il tempo di morte corrispondente al tempo trascorso fra l'esecuzione della iniezione e l'ultimo respiro

del topo.

7.2.5 Si ripete la prova 1 o 2 giorni più tardi usando le diluizioni preparate come sopra descritto, che differiscono per variazioni di + 1 ml di H<sub>2</sub>O rispetto alla diluizione usata.

7.2.6 Si ripete poi l'intero test partendo con nuove diluizioni ottenute dalla soluzione standard di lavoro (1 µg/ml) preparata fresca prima dell'uso.

7.2.7 Si calcola il tempo mediano di morte per ciascun gruppo di 10 topi utilizzati e per ciascuna delle diluizioni preparate. Se tutti i gruppi di 10 topi iniettati con qualunque diluizione danno tempi mediani di morte minore di 5 o minore di 7 minuti non si tiene conto dei risultati di questa diluizione nei calcoli successivi. D'altra parte, se anche per uno solo dei gruppi di 10 topi iniettati con una qualsiasi diluizione si verifica un tempo mediano di morte compreso tra 5 e 7, minuti si includono nei calcoli tutti i gruppi di 10 topi usati con questa diluizione, anche se alcuni dei tempi mediani di morte sono minore di 5 o minore di 7 minuti.

7.2.8 Dal tempo mediano di morte per ciascun gruppo di 10 topi di ciascuna delle diluizioni selezionate si determina il tempo mediano di U.T./ml tramite la tabella 2.

7.2.9 Si dividono i microgrammi di tossina calcolati per 1 ml per le U.T./ml al fine di ottenere il fattore di conversione (C.F.) il quale esprime i microgrammi di tossina equivalenti ad 1 U.T.

7.2.10 Si calcola il valore medio del C.F. e si usa tale valore come punto di riferimento per controllare le prove di routine.

7.2.11 I valori di C.F. possono variare in modo significativo nell'ambito dello stesso laboratorio se le tecniche e i topi non sono rigidamente controllati.

## **8. Uso dello standard per prove di routine sui molluschi.**

8.1 Si controlla periodicamente il valore del C.F.

8.1.1 Se i molluschi sono analizzati meno di una volta a settimana, si determina il valore del C.F. in ciascun giorno in cui sono effettuate le prove, iniettando 5 topi con opportune diluizioni dello standard di lavoro.

8.1.2 Se le prove vengono effettuate in giorni diversi nell'ambito di una settimana, e' necessario fare soltanto un controllo settimanale con diluizioni di standard tali che il tempo mediano di morte risulti compreso tra 5 e 7 minuti. Il valore del C.F. così determinato dovrebbe essere compreso nel valore medio del C.F.  $\pm 20\%$ .

8.1.3 Se il controllo non cade in questo ambito, si completa un gruppo di 10 topi (aggiungendone 5 ai 5 già iniettati) e si inocula un secondo gruppo di 10 topi con la stessa diluizione di standard.

8.1.4 Si media il valore del C.F. per il secondo gruppo con quello del primo e si prende il risultato come nuovo valore di C.F. Variazioni del C.F. minore di 20% rappresentano una significativa modificazione della risposta dei topi alla tossina o alle tecniche di laboratorio. Modificazioni di questo tipo richiedono un cambiamento del valore del C.F.

8.1.5 Controlli ripetuti del valore di C.F. di solito conducono a risultati compresi in una variazione del  $\pm 20\%$ . Se si riscontrano frequentemente variazioni più ampie sarebbe opportuno procedere ad un controllo di tutta la tecnica prima di continuare con le normali prove di routine.



## **Tabella 2**

Vedere Tabella 2

## **Tabella 3**

Vedere Tabella 3

# **METODO PER L'IDENTIFICAZIONE E LA DETERMINAZIONE DELL'ACIDO DOMOICO NEI MOLLUSCHI EDULI LAMELLIBRANCHI**

## **1. Scopo e campo di applicazione.**

Il metodo descritto permette l'identificazione e la determinazione dell'acido domoico nei molluschi eduli lamellibranchi. Il limite di rivelazione del metodo è di 0,2 µg di acido domoico per g di tessuto edibile.

## **2. Principio del metodo.**

L'acido domoico è estratto dalla polpa dei molluschi con soluzione metanolo: acqua, 1:1 (v:v), e, dopo ultrafiltrazione, è determinato mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) su colonna C<sub>18</sub>, con rivelazione spettrofotometrica UV, alla lunghezza d'onda di 242 nm.

## **3. Reagenti.**

3.1 Tutti i reagenti impiegati devono essere di qualità analitica.

3.2 L'acqua usata deve essere bidistillata.

3.3 Acetonitrile.

3.4 Acido domoico.

3.5 Metanolo.

3.6 Acido trifluoroacetico (TFA) per spettroscopia.

## **4. Apparecchiature.**

4.1 Vetreria di laboratorio.

4.2 Bilancia tecnica.

4.3 Bilancia analitica.

4.4 Omogeneizzatore a lame rotanti.

4.5 Omogeneizzatore ad immersione.

4.6 Centrifuga.

4.7 Unità filtro di tipo Millipore Ultrafree-MC, membrana PLGC, a basso assorbimento, da 10.000 NMWL, o unità filtro equivalenti.

4.8 Sistema per degassaggio eluenti.

4.9 Pompa per HPLC.

4.10 Valvola d'iniezione con loop fisso.

4.11 Sistema di termostatazione colonne.

4.12 Pre-colonna per HPLC impaccata con 5 µm di ODS.

4.13 Colonna analitica per HPLC (250 x 4.6 mm), impaccata con 5 µm di ODS, termostata a 40°C (4.11).

4.14 Rivelatore spettrofotometrico UV.

4.15 Sistema per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati.

## **5. Soluzioni.**

5.1 Soluzione acetonitrile: acqua, 10:90 (v:v).

5.2 Soluzione concentrata di acido domoico [100 µg/ml]. Pesare 0,5 mg di acido domoico (3.4) e disciogliere in 5,0 ml di soluzione acetonitrile: acqua, 10:90 (v:v) (5.1).

5.3 Soluzioni di riferimento. Diluire la soluzione concentrata di acido domoico (5.2) con soluzione acetonitrile: acqua, 10:90 (v:v) (5.1) in modo da ottenere soluzioni di concentrazioni di 0,4 µg/ml, 2,0 µg/ml, 4,0 µg/ml e 8,0 µg/ml di acido domoico.

5.4 Soluzione estraente di acqua: metanolo, 1:1 (v:v).

5.5 Fase mobile. Miscelare 100 ml acetonitrile (3.3) con 400 ml di acqua (3.2); aggiungere 0,2 ml TFA (3.6), e portare a volume con acqua (3.2) in matraccio tarato da 1000 ml. Assicurare il degassaggio della fase mobile.

## **6. Procedimento.**

6.1 Preparazione dei campioni.

6.1.1 Pulire esternamente, lavandoli con acqua, i molluschi da analizzare.

6.1.2 Aprire i molluschi tagliando i muscoli adduttori e rimuovere i tessuti molli (polpa) del mollusco dalla conchiglia. Non si devono usare ne' calore, ne' anestetici prima di aprire il mollusco e nel corso dell'operazione bisogna evitare di danneggiare o tagliare il corpo.

6.1.3 Prelevare un campione di ca. 100 g di polpa (6.1.2) e trasferirlo su una retina di plastica, lasciando scolare per 5 minuti.

6.1.4 Omogeneizzare il campione (6.1.3) con omogeneizzatore a lame rotanti (4.4).

Nota: Conservare la polpa residua (6.1.3) a temperatura minore o uguale a -10 °C.

6.2 Estrazione.

6.2.1 Pesare accuratamente un'aliquota di 4 g di campione omogeneizzato (6.1.4) e trasferirla in un tubo da centrifuga graduato.

6.2.2 Aggiungere all'omogeneizzato (6.2.1) 16,0 ml di soluzione estraente (5.4) ed estrarre con omogeneizzatore ad immersione (4.5) per 3 min a 10.000 rpm.

6.2.3 Centrifugare (4.6) l'estratto (6.2.2) a 3000 rpm per 10 min.

6.3 Ultrafiltrazione.

6.3.1 Prelevare dalla fase liquida (6.2.3) un'aliquota di 0,1 ml e trasferirla nell'unità di ultrafiltrazione (4.7).

6.3.2 Ultrafiltrare centrifugando per 30 minuti a 9000 rpm.

Note: Analizzare l'estratto filtrato (6.3.2) in un breve intervallo di tempo. Conservare gli estratti residui (6.3.1) a temperatura minore o uguale a -10 °C.

6.4 Determinazione HPLC-UV.

6.4.1 Condizioni cromatografiche:

separazione mediante eluizione isocratica, a 40 °C (4.11);

a fase mobile: (5.5);

flusso: 1 ml/min;

volume iniettato 20 µl;

rivelazione spettrofotometrica a 242 nm.

6.4.2 Costruzione della curva di taratura.

Iniettare le soluzioni di riferimento (5.3);

costruire una curva di taratura di tipo  $y = ax + b$ ,

dove:  $y$  = area del picco dell'acido domoico;  $x$  = concentrazione della soluzione di riferimento (5.3) in µg/ml;  $a$  = coefficiente angolare;  $b$  = intercetta sull'asse delle  $y$ .

6.4.3 analisi dei campioni per la ricerca di acido domoico: iniettare 20 µl di estratto filtrato (6.3.2) per la determinazione HPLC-UV.

Nota: Eseguire prima di ogni serie analitica la determinazione del "bianco-reagente" applicando l'intero metodo di analisi omettendo la porzione di campione per l'analisi. Nel cromatogramma del bianco-reagente non dovrebbero essere presenti picchi interferenti con l'acido domoico,

oppure presenti a livelli trascurabili.

## 7. Identificazione.

7.1 L'identificazione dell'acido domoico si ottiene per confronto del tempo di ritenzione del picco del campione ed il tempo di ritenzione del picco dello standard di acido domoico.

7.2 Per informazioni supplementari ricorrere alla co-cromatografia.

7.2.1 Ripartire l'estratto (6.3.2) in 2 aliquote:

a) su un aliquota effettuare direttamente la determinazione HPLC-UV (6.4);

b) aggiungere all'altra aliquota un volume trascurabile di soluzione standard di acido domoico (5.2 o 5.3) in modo tale da ottenere una concentrazione finale di acido domoico nell'estratto pari a circa il doppio della concentrazione che si ritiene presente nell'estratto in esame.

7.2.2 L'identificazione del picco dell'acido domoico nell'aliquota (7.2.1.b) è basata sulla presenza di un picco, la cui area incrementa, rispetto all'area del picco dell'estratto non addizionato (7.2.1, a) in modo proporzionale alla quantità di analita addizionato. La larghezza del picco (7.2.1, b), misurata a metà altezza, deve essere 90-110 % della larghezza ottenuta per il picco dell'estratto non addizionato (7.2.1, a) ed il tempo di ritenzione deve coincidere con quello del picco ottenuto per l'estratto non addizionato (7.2.1, a).

## 8. Determinazione.

8.1 La determinazione quantitativa è realizzata mediante interpolazione dell'area del picco dell'acido domoico nell'estratto campione sulla curva di taratura (6.4.2).

8.2 Per campioni ad elevate concentrazioni di acido domoico è opportuno procedere a diluizioni dell'estratto filtrato (6.3.2) prima della determinazione cromatografica, al fine di ottenere una concentrazione di analita compresa nell'intervallo di linearità verificato (6.4.2).

8.3 Espressione dei risultati.

La concentrazione  $C$  di acido domoico, espressa  $\mu\text{g}$  di acido domoico per  $\text{g}$  di polpa, è calcolata secondo la seguente equazione:

Vedere formula

dove:

$y$  = Area del picco di acido domoico dell'estratto campione (6.4.3).

$b$  = Intercetta della curva (6.4.2) sull'asse delle  $y$ .

$a$  = Coefficiente angolare della curva di taratura (6.4.2).

$R$  in base  $m$  = Recupero medio (%), calcolato come al punto 9.2.9.

$V$  = Volume finale dell'estratto (6.2.2).

$m$  = Massa in g dell'aliquota di campione (6.2.1).

$D$  = Fattore di diluizione (se e' stata operata una diluizione dell'estratto) (8.2).

## 9. Valutazione del metodo.

### 9.1 Limite di rivelazione.

Il limite di rivelazione del metodo, calcolato con un  $S/N = 5:1$ , e pari a  $0,2 \mu\text{g}$  di acido domoico per g di polpa.

### 9.2 Calcolo del recupero

9.2.1 Valutare il recupero del metodo effettuando prove di recupero su "bianco-campione" di molluschi per il quale attraverso precedenti determinazioni cromatografiche sia stata dimostrata l'assenza del picco dell'acido domoico o di picchi interferenti nell'intorno del tempo di ritenzione dell'acido domoico.

9.2.2 Preparare il bianco-campione come descritto in 6.1 fino ad ottenere un omogeneizzato di bianco-campione.

9.2.3 Suddividere il bianco-campione omogeneizzato (9.2.2) in un numero di aliquote corrispondenti ai livelli di fortificazione, piu' un'aliquota per la prova in bianco.

9.2.4 Fortificare le aliquote (9.2.3), ad eccezione dell'aliquota destinata alla prova in bianco, con ridotti volumi di soluzione concentrata di acido domoico (5.2) in modo da ottenere in ogni aliquota una diversa concentrazione di acido domoico (livello di fortificazione). I livelli di fortificazione devono essere almeno 2.

9.2.5 Procedere con l'estrazione e l'analisi dei campioni fortificati e della prova in bianco, come descritto in 6.2 - 6.4.

9.2.6 Verificare l'assenza di picchi nell'intorno tempo di ritenzione dell'acido domoico nella prova in bianco.

9.2.7 Calcolare il recupero in percentuale ( $R$ ), sui campioni fortificati, come segue:

Vedere formula di pag. 23

dove:

$y$  = Area del picco di acido domoico dell'estratto campione (6.4.3).

$b$  = Intercetta della curva (6.4.2) sull'asse delle  $y$ .

$a$  = Coefficiente angolare della curva di taratura (6.4.2).

$C$  in base  $r$  = Concentrazione teorica di acido domoico nell'aliquota di campione fortificato (9.2.4).

V = Volume finale dell'estratto (6.2.2).

m = Massa in g dell'aliquota di campione (6.2.1).

9.2.8. Eseguire le prove di recupero, per ciascun livello di fortificazione, in triplicato, per due giorni consecutivi (n maggiore o uguale a 12).

9.2.9 Stima dell'accuratezza e precisione.

Analizzare statisticamente i valori di recupero (9.2.7) ottenuti nelle diverse prove (9.2.8) per ottenere il recupero medio (R in base m) e la deviazione standard del metodo.

Nota: Valori indicativi di recupero medio (%) per i livelli di fortificazione di 2 e 20 µg/g sono rispettivamente di  $91,9 \pm 6,2$  e  $96,3 \pm 3,8$  con un valore medio di  $94,3 \pm 5,3$ .

## **10. Sicurezza.**

L'acido domoico è una neurotossina e deve essere maneggiata con cautela.

Acetonitrile e metanolo sono solventi tossici e volatili.

L'acido trifluoroacetico è tossico, volatile e corrosivo e deve essere maneggiato sotto cappa.

Tutte queste sostanze sono nocive se ingerite, inalate o assorbite per via cutanea.

12. Riferimenti.

Quilliam, M. A., Xie, M., and Hardstoft, W. R. (1995) J. AOAC Int. 78, 543-554.