Certificat d'analyse

CNRC·NRC Matériau de référence certifié

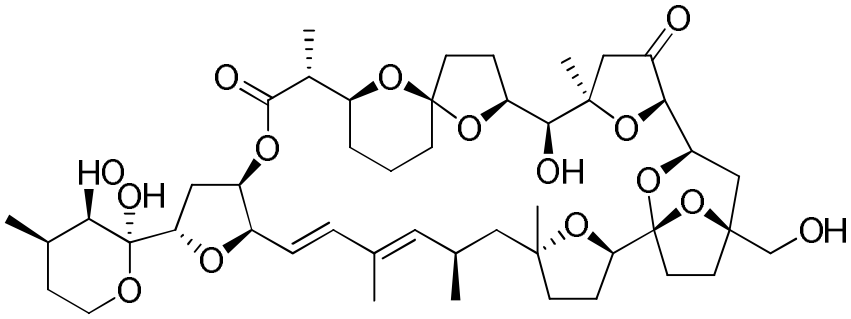
CRM-PTX2-b (lot numéro 20120516)

Solution d'étalonnage certifiée pour la pecténotoxine-2

Les pecténotoxines (PTX) constituent un groupe de toxines de type polyéther lactone produites par plusieurs espèces de dinoflagellés comme *Dinophysis fortii* et *Dinophysis acuta* [1,2]. Les PTX ont été associées aux intoxications par phycotoxine diarrhéique en raison de leur présence dans les mollusques et le plancton avec des composés du groupe de l'acide okadaïque et en raison de leur toxicité pour les souris lors d'injections intrapéritonéales. Toutefois, il n'a pas encore été établi qu'elles sont toxiques par voie orale chez les souris et n'ont pas été associées à des maladies humaines [3]. Néanmoins, les PTX sont réglementées par l'Union européenne à un niveau de 160 µg/kg d'équivalent tissu en combinaison avec l'acide okadaïque et les dinophysistoxines [4]. Le CRM-PTX2-b est une solution d'étalonnage certifiée de PTX2 dans du méthanol, à une concentration de 5,13 µmol/L.

Tableau 1 : Concentrations certifiées du CRM-PTX2-b.

Composé	µmol/L (à +20 °C)	µg/mL (à +20 °C)	µg/g
Pecténotoxine-2	5,13 ± 0,15	4,40 ± 0,13	5,58 ± 0,16



Pecténotoxine-2
Numéro de registre du CAS : 97564-91-5
Formule moléculaire : $C_{47}H_{70}O_{14}$
Masse moléculaire : 859,07
$[M+NH_4]^+$: *m/z* 876,5104

Date d'expiration : 1 an à partir de la date de vente
Conditions de stockage : -12 °C ou moins

Utilisation prévue

Le CRM-PTX2-b est une solution d'étalonnage certifiée conçue pour le développement de méthodes d'analyse et le dosage précis de la PTX2. La concentration du CRM-PTX2-b convient à la préparation d'une série de dilutions à des fins d'étalonnage de systèmes de chromatographie en phase liquide (CL) et de chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse (CL-SM), ainsi qu'au dopage d'échantillons de contrôle de mollusques à des fins de calcul de taux de récupération.

Préparation du MRC

La PTX2 a été isolée à l'institut Cawthron, en Nouvelle-Zélande, d'une prolifération de phytoplanctons dans laquelle *Dinophysis acuta* était l'espèce prédominante. Le phytoplancton a été récolté à 3-4 km au large des côtes de la baie de Buller, Nouvelle-Zélande, au début de février 2001. Il a été purifié au moyen d'une série d'étapes chromatographiques, tel que décrit précédemment [2]. Une solution mère a été préparée en dissolvant la PTX2 purifiée dans du CD_3OH (~ 4 mM). La concentration de PTX2 dans cette solution mère a ensuite été déterminée par RMN quantitative [5], après quoi la solution de MRC a été préparée en diluant avec précision la solution mère de PTX2 dans du méthanol de haute pureté, dégazé, pour obtenir un volume final de 2 L. Cette solution a été mélangée à fond au moyen d'un barreau aimanté recouvert de téflon et d'un agitateur magnétique tout en étant refroidie dans un bain de glace sous une atmosphère d'argon. Des aliquotes ont été placées dans des ampoules en verre ambré, qui ont été scellées à la flamme sous argon. Les ampoules ont été étiquetées, emballées et immédiatement transférées dans un endroit de stockage à long terme à -80 °C. Chaque ampoule contient environ 0,5 mL de solution.

Confirmation de la structure et évaluation de la pureté

La structure et pureté de la PTX2 utilisée pour la préparation du CRM-PTX2-b a été confirmée par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) de ^{1}H (figure 1) et par CL-SM/SM. Un spectre des ions produits présente une fragmentation caractéristique de la PTX2. La CL-SM a aussi été utilisée pour estimer la pureté générale de la solution mère du PTX2-b (colonne : 2,5 µm, Luna C18(2), 100 × 2 mm; eau (A), acétonitrile/eau (95/5) (B) chacune contenant du formate d'ammonium 2 mM et de l'acide formique 50 mM (pH 2,3); 5 à 100 % de B en 15 min à 200 µL/min; température de colonne de +20 °C). Un isomère inconnu partiellement résolu et de la PTX2c ont été observés (figure 2). Grâce à une méthode de CL isocratique (colonne et phase mobile précédemment mentionnées; 55 % B à 250 µL/min; température de colonne de +20 °C), les temps de rétention des impuretés relativement à celui de la PTX2 étaient 1,07 et 2,05 respectivement. La solution de MRC contient environ 2,5 % de l'isomère non résolu et 2,6 % de PTX2c, valeurs déterminées au moyen d'une élution isocratique et avec la détection d'ions sélectionnés (SIM). Les proportions de ces composés mineurs sont fournies à titre informatif et leurs valeurs ne sont pas certifiées.

Homogénéité

Un nombre représentatif d'ampoules (n = 30) a été prélevé parmi la série complète d'ampoules remplies afin de déterminer l'homogénéité du CRM-PTX2-b. Les analyses ont été réalisées par CL-SM (figure 3). La variation d'une ampoule à l'autre a été déterminée comme étant inférieure à la variation entre des analyses répétées d'une même ampoule (ÉTR < 5 % pour n = 16), indiquant donc une homogénéité acceptable pour toute la série d'ampoules.

Stabilité

La stabilité à court et long terme du CRM-PTX2 (lot nº 20021127) dans du méthanol a déjà été évaluée lors d'une étude classique sur la stabilité. Le CRM-PTX2-b a été préparé de la même manière et une stabilité équivalente est raisonnablement assumée. Après 30 jours, aucune dégradation de la PTX2 n'a été observée à des températures allant jusqu'à +20 °C, indiquant une excellente stabilité à court terme. Toutefois, la dégradation de la PTX2 est devenue significative après 30 jours à +37 °C. Des calculs de régression sur les données de stabilité à long terme (1 an) ont été faits pour chaque température de stockage, et leur importance a été testée. Les régressions se sont avérées non significatives pour toutes les conditions jusqu'à +4 °C. Une incertitude associée à l'évaluation de la stabilité à long terme a été calculée au moyen de l'erreur-type de la pente à -12 °C (voir la section Incertitude). L'incertitude relative due à la stabilité à long terme (μ_{lts}) est de 0,77 %. La température de stockage recommandée pour le CRM-PTX2-b est de -12 °C.

Valeur certifiée

La valeur certifiée de 5,13 ± 0,15 µmol/L pour le CRM-PTX2-b (tableau 1) est basée sur les résultats obtenus au Conseil national de recherches du Canada (CNRC) en suivant deux méthodes d'analyse indépendantes : spectroscopie RMN quantitative (RMNq) [5] et CL-SM en mode SIM. Pour la RMNq, trois tubes de RMN de la solution mère de PTX2-b purifiée ont été analysés et dosés en utilisant un étalon de caféine de haute pureté. Pour la CL-SM, six ampoules ont été sélectionnées parmi la série d'ampoules préparées, et chaque ampoule a été analysée trois fois en utilisant le CRM-PTX2 (lot nº 20021127) comme étalon.

Les résultats indiqués sur le présent certificat sont traçables selon la norme du Système international d'unités (SI) au moyen d'étalons de pureté déterminée préparés par gravimétrie. Le présent produit convient comme un matériau de référence approprié pour les programmes d'assurance de la qualité des laboratoires.

Incertitude

L'estimation de l'incertitude globale (U_{CRM}) pour le CRM-PTX2-b comprend les incertitudes associées à la caractérisation du lot (μ_{char}), à la variation d'une ampoule à l'autre (μ_{hom}) et à la stabilité lors du stockage à long terme (μ_{stab}) [6]. Ces éléments sont combinés de la manière suivante :

$$U_{CRM} = k\sqrt{\mu_{char}^2 + \mu_{hom}^2 + \mu_{stab}^2}$$

dans laquelle *k* est le facteur de couverture (généralement 2 ou 3).

Toutes les sources raisonnables d'erreur liées à la caractérisation du CRM-PTX2-b ont été prises en compte et quantifiées. L'analyse quantitative du CRM-PTX2-b par RMNq et CL-SM ont conduit à une incertitude de caractérisation (μ_{char}) de 0,065 µM. Une étude exhaustive sur l'homogénéité a été réalisée sur le CRM-PTX2-b et aucune hétérogénéité significative n'a pu être détectée. L'incertitude sur la stabilité à long terme (μ_{stab}) a été établie 0,039 µM, quand exprimée en µmol/L. Toutes ces sources d'incertitude ont été combinées avec un facteur de couverture de 2 pour estimer l'incertitude finale associée à la valeur certifiée du CRM-PTX2-b. Un résumé est donné dans le tableau 2.

Tableau 2 : Bilan d'incertitudes pour la valeur certifiée du CRM-PTX2-b.

Incertitude	µmol/L
μ_{hom}	*négligeable*
μ_{stab}	0,039
μ_{char}	0,065
U_{CRM} (k=2)	0,15

Instructions pour le stockage

Pour s'assurer de sa stabilité, le CRM-PTX2-b devrait être conservé non ouvert à -12 °C ou moins. De même, toute dilution de ce matériau devrait être conservée à -12 °C dans un flacon à faible espace de tête.

Expiration

Si le CRM-PTX2-b est conservé non ouvert dans les conditions recommandées, sa concentration certifiée est valide pendant 1 an à partir de la date de vente.

Instructions pour l'utilisation

Avant d'ouvrir une ampoule, il faudrait la laisser revenir à la température ambiante, puis bien mélanger son contenu. Les ampoules devraient être ouvertes au niveau de la marque à cet effet. Une fois l'ampoule ouverte, des aliquotes précises devraient être prélevées au moyen d'équipement volumétrique étalonné, puis transférées dans des fioles ou des flacons jaugés. Une augmentation de la concentration due à l'évaporation du méthanol aura lieu si la solution est laissée à l'air libre pour plus de quelques minutes. Il est recommandé de ne pas faire évaporer totalement les solutions de ce MRC, en raison d'une décomposition potentielle sur les parois en verre. *Note :* Le volume de la solution n'est pas certifié. Par conséquent, le contenu complet de l'ampoule ne devrait donc pas être simplement transféré dans une fiole jaugée, puis dilué.

Précautions à prendre

Les PTX ont originalement été classées comme phycotoxines diarrhéiques en raison de leur présence dans le plancton et les mollusques avec des toxines du groupe de l'acide okadaïque. Toutefois, leur toxicité par voie orale n'a pas encore été démontrée chez les souris et n'a pas été directement associée à un évènement d'empoisonnement quelconque chez les humains [3]. Néanmoins, des précautions devraient être prises quand on manipule le CRM-PTX2-b. L'inhalation ou l'ingestion de méthanol est dangereuse. L'ingestion peut causer la cécité ou être fatale, alors qu'un contact cutané prolongé peut causer une dermatite ou des dommages aux reins. Seules des personnes qualifiées devraient manipuler cette solution et des méthodes d'élimination appropriées devraient être observées. Il faudrait porter des gants épais et une protection pour les yeux quand on ouvre une ampoule au cas d'une brisure du verre. Une fiche signalétique (FS) est disponible pour le CRM-PTX2-b.

Références

1. Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G.K., Clardy, J., (1985). "Diarrhetic Shellfish Toxins." *Tetrahedron* 41, 1019-1025.

2. MacKenzie, L., Holland, P., McNabb, P., Beuzenberg, V., Selwood, A., Suzuki, T., (2002). "Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis." *Toxicon* 40, 1321-1330.

3. Tubaro, A., Sosa, S., Hungerford, J., (2012). "Toxicology and diversity of marine toxins." Gupta, R.C. (Ed.) *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*, 2nd edition. Academic Press, Waltham, MA, p 896-934.

4. Anonymous. (2004). Regulation (EC) No 853/2004 of the European parliament and of the council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Off. J. of the European Union* L 139 of 30 April 2004.

5. Burton, I.W., Quilliam, M.A., Walter, J.A., (2005). "Quantitative ^{1}H NMR with external standards: use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products." *Anal. Chem.* 77, 3123-3131.

6. Pauwels, J., Lamberty, A., Schimmel, H., (2000). "Evaluation of uncertainty of reference materials." *Accred. Qual. Assur.* 5, 95-99.

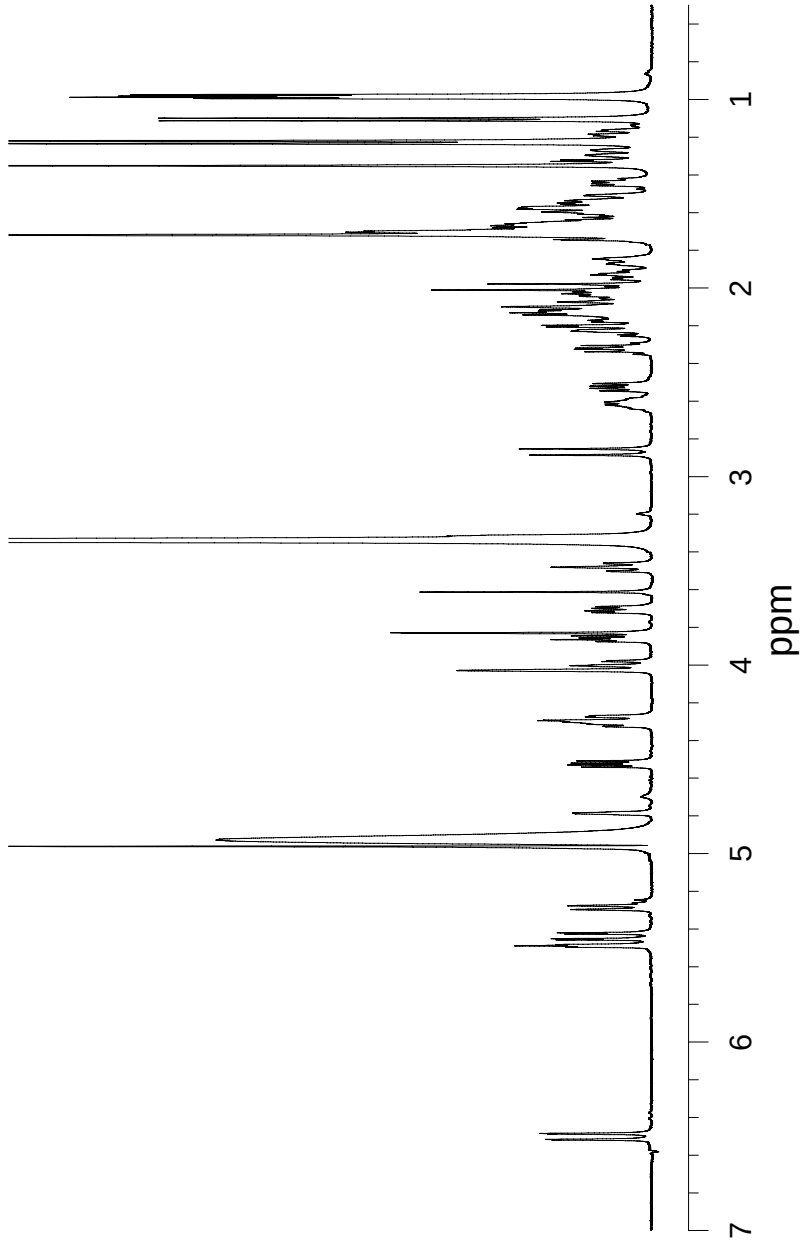


Figure 1 : Spectre RMN des protons de la PTX2 utilisée pour la préparation du CRM-PTX2-b dissous dans du méthanol-d_3.

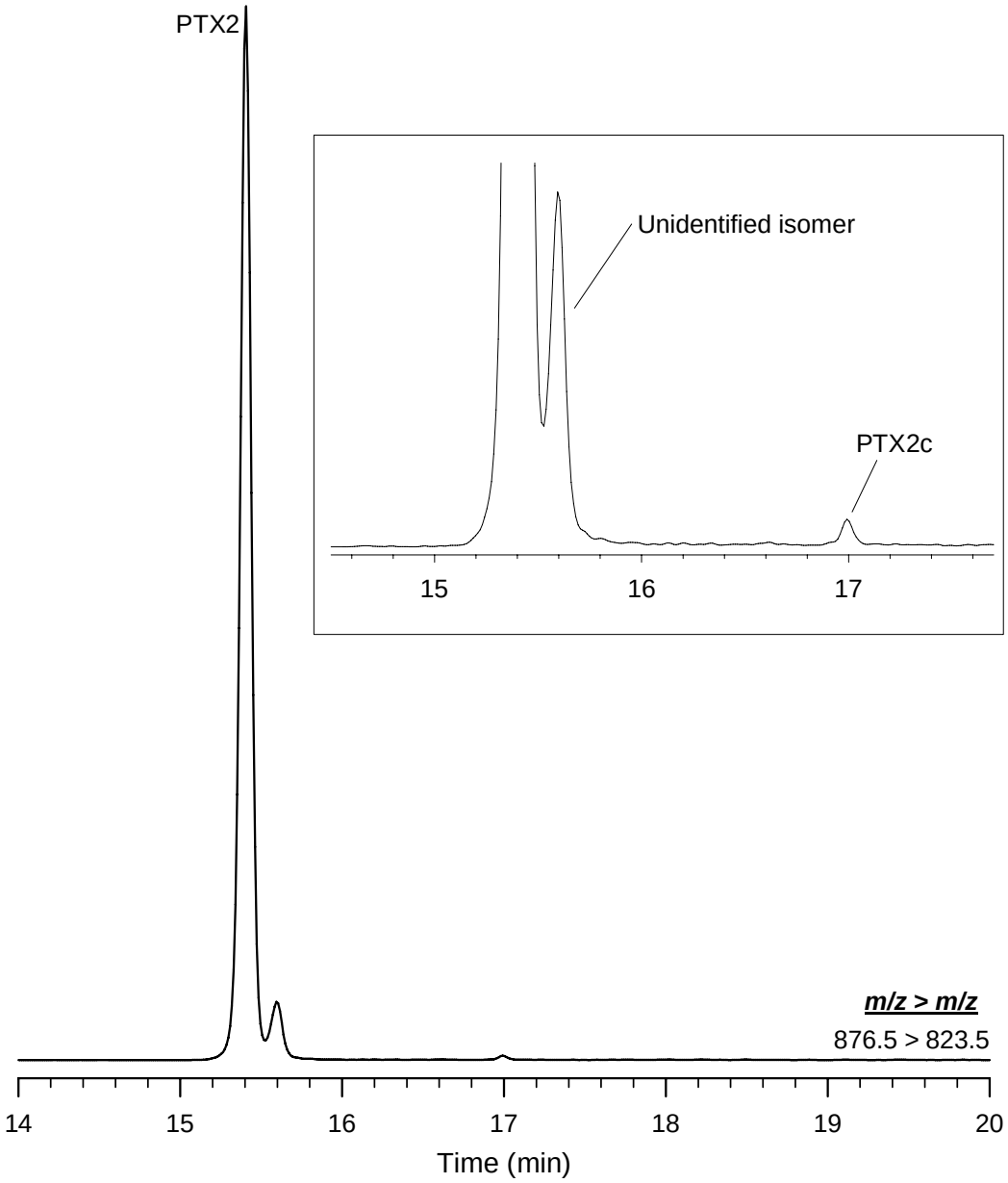


Figure 2 : L'analyse de la pureté de la solution mère de PTX2-b par CL-SM/SM a mis en évidence la présence de deux isomères de la PTX2. Conditions : colonne Luna C18(2), 2,5 µm, 100 × 2 mm, maintenue à +20 °C; phase mobile : eau (A), acétonitrile/eau (95/5, v/v) (B), chacune contenant de l'acide formique 50 mM et du formate d'ammonium 2 mM, gradient : 5-100 % B en 15 min, 200 µL/min; volume injecté 0,1 µL; SM opéré en mode positif avec la mesure de réactions sélectionnées.

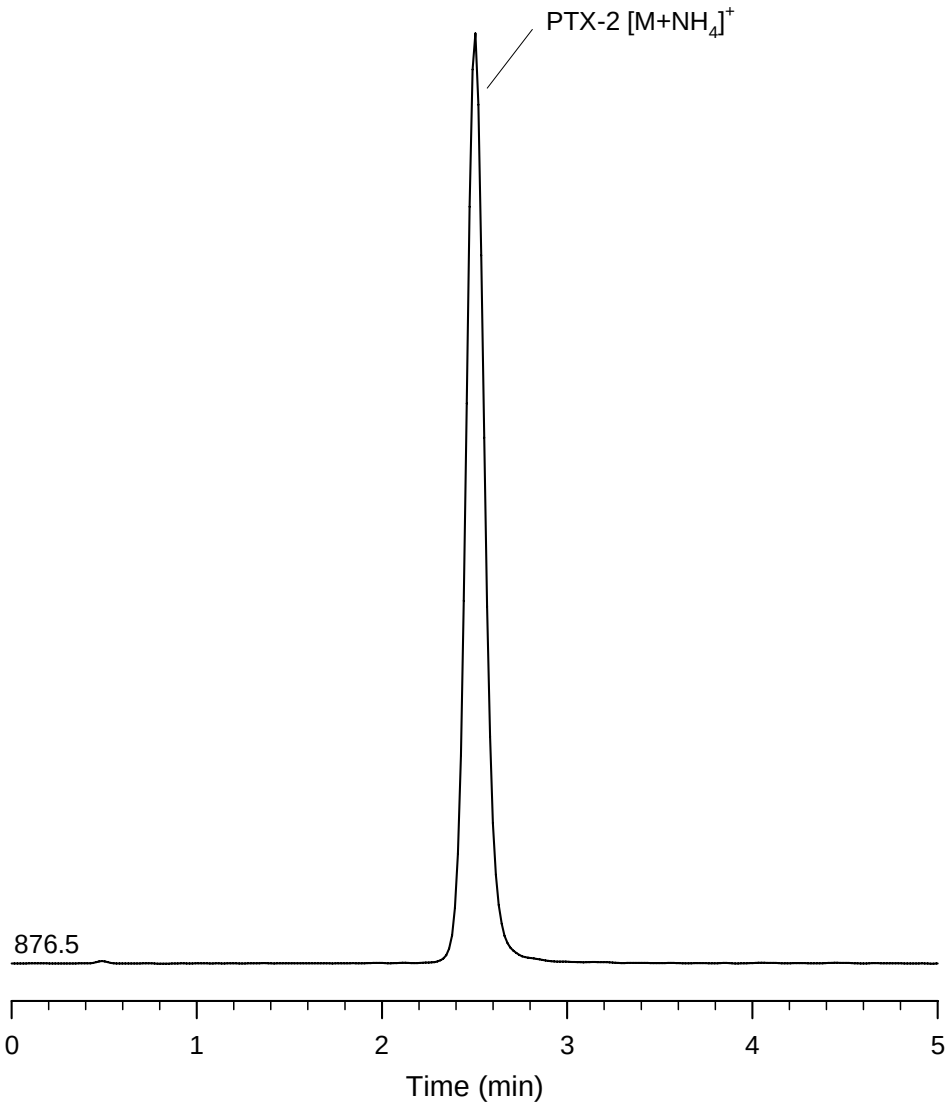


Figure 3 : Analyse par CL-SM du CRM-PTX2-b. Conditions : colonne Luna C18(2), 2,5 µm, 50 × 2 mm, maintenue à +20 °C; phase mobile : eau (A) et acétonitrile/eau (95/5) (B), les deux avec de l'acide formique 50 mM et du formate d'ammonium 2 mM; élution isocratique avec 50 % B, 300 µL/min; volume injecté 0,8 µL; SM opéré en mode positif SIM.

Remerciements

Les membres suivants du personnel de Science des mesures et étalons du CNRC ont contribué à la production et à la certification du CRM-PTX2-b : S. Crain, S.D. Giddings, W. Hardstaff, E. Kerrin, P. LeBlanc, D. Marciniak, P. McCarron, R. Perez, M.A. Quilliam, K. Reeves, K. Thomas et E. Wright.

Le présent document devrait être cité sous la forme suivante :

P. McCarron, S.D. Giddings, S. Crain and M.A. Quilliam, “CRM-PTX2-b, certified calibration solution for pectenotoxin-2”, Biotoxin Metrology Technical Report CRM-PTX2-b-20120516, National Research Council Canada, Halifax, March 2013.
DOI https://doi.org/10.4224/crm.2013.ptx2-b.20120516

Première certification complétée : mars 2013
Version du document : 20220405

Date de révision : avril 2022 (DOI ajouté et mises à jour éditoriaux)

Signé :

Michael A. Quilliam, Ph.D.
Chef de groupe, Métrologie des biotoxines
Science des mesures et étalons

Le texte anglais est la version définitive de ce document.

Ce certificat est valide uniquement si le produit correspondant a été obtenu directement du CNRC ou de l’un de ses fournisseurs qualifiés.

Adresser tout commentaire, information ou requête à :

Conseil national de recherches Canada
Science des mesures et étalons
1411, rue Oxford
Halifax (Nouvelle-Écosse) B3H 3Z1

Téléphone : 1-902-426-8281
Télécopieur : 1-902-426-5426
Courriel : CRM-MRCBiotoxin-Biotoxines@nrc-cnrc.gc.ca