

Certificat d'analyse

CMRC-NRC

Matériau de référence certifié

CRM-Zero-Mus (lot numéro 200604)

Matériau de référence certifié à base de tissu de moule contrôle pour les toxines marines

Utilisation prévue

Le CRM-Zero-Mus est une matrice de tissu de moule (*Mytilus edulis*) devant servir de témoin négatif pour l'analyse de toxines de crustacés et mollusques. Il est exempt des toxines suivantes : toxines paralysantes des crustacés et mollusques (TPCM), acide domoïque (AD) et ses isomères, acide okadaïque (AO) et dinophysistoxines (DTX), azaspiracides (AZA), yessotoxines (YTX), pecténotoxines (PTX) et gymnodimine (GYM). Il peut être utilisé pour tester des procédures d'analyse à des fins d'étude de sélectivité, de taux de récupération de dopant et d'étalonnage en milieu adapté à la matrice.

CRM-Zero-Mus ne convient pas comme témoin négatif pour les spirolides (SPX) et les pinnatoxines (PnTX), car il contient ces toxines, quoique à des niveaux très faibles.

Préparation de CRM-Zero-Mus

Puisque la plupart de la surveillance des toxines de crustacés et mollusques est réalisée sur des tissus de moule entiers, une bouillie liquide, homogénéisée, stabilisée thermiquement, de moules entières et d'eau a été sélectionnée comme tissu de contrôle représentatif. Une telle approche s'est précédemment avérée efficace par Métrologie des biotoxines lors de la production d'autres matériaux de référence de tissu de moule.

Le tissu de moule utilisé pour le CRM-Zero-Mus a été fourni par l'Agence canadienne d'inspection des aliments. Les moules ont été pêchées dans la baie de New London, Île-du-Prince-Édouard, pendant la dernière semaine d'avril 2005.

Une préparation à grande échelle d'homogénat a été faite en utilisant environ 13,5 kg de moules précuites. L'homogénat a été préparé en broyant en plusieurs fois les moules dans un coupe-aliments Comitrol. De l'eau doublement distillée a été ajoutée pour amener l'homogénat final à une valeur d'environ 85 % eau, similaire à du tissu frais prélevé sur des animaux vivants. Un antioxydant (éthoxyquine) a aussi été ajouté à l'homogénat. L'homogénat a été désaéré sous vide après barbotage avec de l'azote, avant d'être emballé. Pendant le processus de remplissage des flacons, l'homogénat de moule a été mélangé continuellement et purgé à l'azote. Des aliquotes d'environ 8 g d'homogénat ont été transférées dans des flacons de 8 mL en polypropylène purgé à l'azote. Immédiatement après leur remplissage, les flacons ont été de nouveau purgés à l'azote, thermoscellés au moyen de film en polypropylène trilaminé et numérotés par ordre de remplissage. Les échantillons scellés ont été placés dans des supports et traités thermiquement à +118 °C pendant 20 min dans un autoclave à vapeur. Après refroidissement, les joints d'étanchéité (films) ont été parés, inspectés, puis des bouchons ont été posés. Les flacons ont été ensuite thermoscellés individuellement dans des pochettes trilaminées 100 x 165 mm.



Homogénéité

Étant donné qu'il n'y a aucune toxine significative présente dans ce tissu, aucune étude rigoureuse sur l'homogénéité du CRM-Zero-Mus n'a été réalisée. Des procédures de préparation et de traitement identiques ont été suivies lors de la production d'autres MRC de tissu de moule par Métrologie des biotoxines. Le fait que ces tissus se sont avérés avoir une homogénéité acceptable pendant tout le processus de production, il a été assumé que le CRM-Zero-Mus est homogène.

Études de stabilité

Ce matériau a été préparé par Métrologie des biotoxines de manière identique à celle suivie pour les homogénats de tissu de moule précédents. La stabilité à long terme de telles matrices de moule a été historiquement établie avec l'entreposage dans un congélateur (-12 °C ou moins).

Valeur certifiée

Les toxines étudiées sont données ci-après (tableau 1), ainsi que la principale méthode expérimentale d'analyse. Les niveaux certifiés donnés correspondent à la limite de détection (LD) de nos méthodes, basée sur un rapport signal/bruit de 3. Si des toxines sont présentes dans cet homogénat, elles le sont à un niveau inférieur au seuil de détection de nos instruments d'analyse. Ce MRC peut être utilisé comme contrôle négatif ou pour des expériences de dopage pour les toxines mentionnées dans les tableaux 1a-c. Certaines toxines imines cycliques sont présentes à de très faibles concentrations (tableau 2), et ces valeurs devraient être prises en compte si on utilise ce MRC pour des applications concernant ces toxines.

Incertitude

Les valeurs données ne le sont qu'à titre informatif. Il n'y a pas de concentrations certifiées pour le CRM-Zero-Mus et, donc, aucune incertitude associée n'a été calculée.

Instructions pour le stockage

CRM-Zero-Mus devrait être stocké dans un congélateur (à -12 °C ou moins).

Expiration

S'il est stocké non ouvert dans les conditions recommandées (voir section Instructions pour le stockage) et étant donné qu'aucune toxine n'est présente à un niveau appréciable, le CRM-Zero-Mus est valide pendant 3 ans après la date de vente.

Mode d'emploi

Il faudrait laisser chaque flacon revenir à la température ambiante avant de l'ouvrir, et son contenu devrait être mélangé à fond au vortex pendant au moins 2 min. Chaque flacon contient environ 8 g ($\pm 0,5$ g) de tissu. La masse de l'homogénat n'est pas certifiée. Retirer soigneusement le joint d'étanchéité au moyen d'un couteau ou d'une lame, mélanger le contenu à fond au moyen d'une spatule et peser la quantité requise d'échantillon. Il n'est pas recommandé de recongeler les flacons entre deux prélèvements, tous les échantillons devraient donc être prélevés suite à la décongélation initiale. Nous recommandons une taille minimale de sous-échantillon de 2 g. Une fois le tissu pesé avec précision dans un récipient à extraction, il peut être traité en suivant les procédures d'extraction prescrites.



Consignes de sécurité

Il faut faire attention lorsqu'on découpe le joint d'étanchéité d'un flacon de CRM-Zero-Mus. Les mesures de sécurité habituelles de laboratoire s'appliquent.

Tableau 1a : Concentrations des toxines paralysantes de crustacés et mollusques dans le CRM-Zero-Mus, déterminées en suivant une procédure d'extraction acide et en faisant une analyse par CL-oxpc-DFL [1]. Le dosage a été réalisé par comparaison avec des solutions d'étalonnage certifiées du CNRC ou des étalons préparés à l'interne (nd = non détecté).

Nom de la toxine	Code	Concentration (µmol/kg)	Limite de détection (µmol/kg)
Saxitoxine	STX	nd	0,1
Néosaxitoxine	NEO	nd	0,3
Décarbamoylsaxitoxine	dcSTX	nd	0,2
Gonyautoxine-4	GTX4	nd	0,1
Gonyautoxine-1	GTX1	nd	0,1
Gonyautoxine-5	GTX5	nd	0,3
Décarbamoylgonyautoxine-3	dcGTX3	nd	0,04
Décarbamoylgonyautoxine-2	dcGTX2	nd	0,06
Gonyautoxine-2	GTX2	nd	0,03
Gonyautoxine-3	GTX3	nd	0,02
N-Sulfocarbamoylgonyautoxine-2	C1	nd	0,06
N-Sulfocarbamoylgonyautoxine-3	C2	nd	0,04
N-Sulfocarbamoylgonyautoxine-1	C3	nd	0,3
N-Sulfocarbamoylgonyautoxine-4	C4	nd	0,2
Décarbamoylgonyautoxine-4	dcGTX4	nd	0,06
Décarbamoylgonyautoxine-1	dcGTX1	nd	0,1
Décarbamoylnéosaxitoxine	dcNEO	nd	0,3
Gonyautoxine-6	GTX6	nd	0,5

Tableau 1b : Les concentrations d'acide domoïque dans le CRM-Zero-Mus ont été déterminées en suivant une procédure exhaustive d'extraction volumétrique en 3 étapes avec 50% de méthanol et en faisant une analyse par CL-UV [2]. Le dosage a été réalisé par comparaison avec des solutions d'étalonnage certifiées du CNRC ou des étalons préparés à l'interne (nd = non détecté).

Nom de la toxine	Code	Concentration (µg/kg)	Limite de détection (µg/kg)
Acide domoïque	AD	nd	0,05
Acide C5'-épidomoïque	épiAD	nd	0,05
Acides isodomoïques A-H		nd	0,05



Tableau 1c : Les concentrations de toxines lipophiles réglementées dans le CRM-Zero-Mus ont été déterminées en suivant une procédure exhaustive d'extraction volumétrique en 4 étapes avec 90 % (PTX2, YTX) ou 100 % (AZA, AO) de méthanol et en faisant une analyse par CL/SM/SM [3]. Le dosage a été réalisé par comparaison avec des solutions d'étalonnage certifiées du CNRC ou des étalons préparés à l'interne (nd = non détecté).

Nom de la toxine	Code	Concentration (µg/kg)	Limite de détection (µg/kg)
Acide okadaïque	AO	nd	1
Dinophysistoxine-1	DTX1	nd	3
Dinophysistoxine-2	DTX2	nd	2
Azaspiracide-1	AZA1	nd	5
Azaspiracide-2	AZA2	nd	2
Azaspiracide-3	AZA3	nd	0,6
Yessotoxine	YTX	nd	8
Pecténotoxine-2	PTX2	nd	4

Tableau 2 : Concentrations des toxines imines cycliques dans le CRM-Zero-Mus déterminées en suivant une procédure exhaustive d'extraction volumétrique au méthanol et en faisant une analyse par CL/SM/SM. Le dosage a été réalisé par comparaison avec des solutions d'étalonnage certifiées du CNRC ou des étalons préparés à l'interne. Ces concentrations sont uniquement fournies qu'à titre d'information et ne sont pas certifiées.

Nom de la toxine	Masse Moléculaire	Code	Numéro du pic ^a	Concentration (µg/kg)
Gymnodimine	507,3	GYM	n/a	nd (< 0,5)
Spirolide inconnu	691,5	-	1	1,5
13-déméthylspirolide C	691,5	13-déMé-SPX C	2	1,9
13-déméthylspirolide D	693,5	13-déMé-SPX D	3	3,1
Pinnatoxine G	693,5	PnTX G	4	2,0
Spirolide inconnu	705,5	-	5	1,1
Spirolide C	705,5	SPX C	6	1,7
Spirolide inconnu	705,5	-	7	1,5
Spirolide inconnu	705,5	-	8	1,3
Spirolide inconnu	705,5	-	9	0,7
Spirolide D	707,5	SPX D	10	4,1
Spirolide inconnu	707,5	-	11	1,4

^a Numéro des pics de la figure 1.



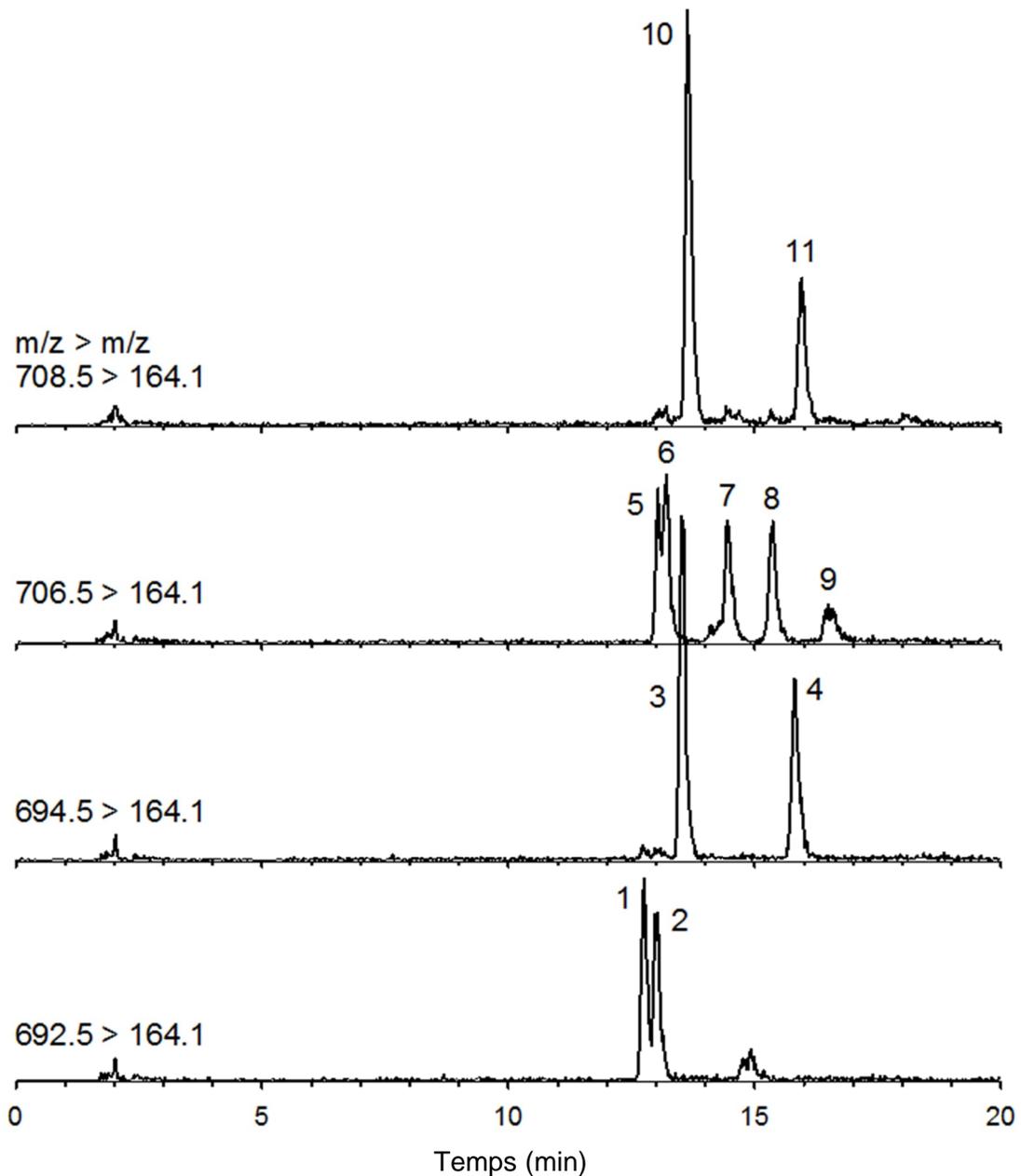


Figure 1 : Chromatogrammes de masse extraits lors de l'analyse des spirolides et de la pinnatoxine G dans le CRM-Zero-Mus par CL/SM/SM. Conditions : CLHP Agilent 1200 couplé à un SM QTRAP5500; colonne BDS Hypersil-C8, 3 μ m (2 x 150 mm; Keystone) maintenue à +20 °C; débit : 0,2 mL/min avec un gradient de 25 à 55 % de B sur 10 min et maintien à 55 % de B pendant 10 min; phase mobile, A = eau et B = acétonitrile/eau (95/5), les deux avec de l'acide formique 50 mM et du formate d'ammonium 2 mM; un total de 10 transitions ont été surveillées, chacune avec une durée d'acquisition de 90 msec (seulement 4 transitions ont indiqué la présence de toxines imines cycliques, qui ont été confirmées par balayages des ions produits en mode EPI).

Références

1. van de Riet, J.M., Gibbs, R.S., Chou, F.W., Muggah, P.M., Rourke, W.A., Burns, B.G., Thomas, K., Quilliam, M.A. (2009). A single laboratory validation study of a liquid chromatographic, post-column oxidation method for the analysis of paralytic shellfish toxins in mussels, clams, scallops and oysters, *J. AOAC Int.* 92, p. 1690-1704.
2. Quilliam, M.A., Xie, M., Hardstaff, W.R. (1995). Rapid extraction and cleanup for liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood, *J. AOAC Int.* 78, p. 543-554.
3. McCarron, P., Giddings, S.D., Quilliam, M.A. (2011). A mussel tissue certified reference material for multiple phycotoxins. Part 2: Liquid chromatography-mass spectrometry, sample extraction and quantitation procedures, *Anal. Bioanal. Chem.* 400, p. 835-846.



Remerciements

Les membres suivants du personnel de Science des mesures et étalons du CNRC ont contribué à la production et la certification du CRM-Zero-Mus: S.D. Giddings, W. Hardstaff, D. Marciniak, P. McCarron, M.A. Quilliam, K.L. Reeves et K. Thomas. L'Agence canadienne d'inspection des aliments a fourni le tissu de moule, des services financiers et l'aide de G. Pitcher et E. Wright. Nous remercions D. Singer, A. Timmins et J. Thompson du Canadian Institute of Fisheries and Technology pour leur aide.

Le présent document devrait être cité sous la forme suivante :

K.L. Reeves and M.A. Quilliam. "CRM-Zero-Mus, a control mussel tissue certified reference material for marine toxins", Biotxin Metrology Technical Report CRM-Zero-Mus-200604, National Research Council Canada, Halifax, August 2011.

DOI <https://doi.org/10.4224/crm.2011.zero-mus.200604>

Première certification complétée : août 2011

Version du document : 20220408

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

