

# Certificat d'analyse

CMRC-NRC

Matériau de référence certifié

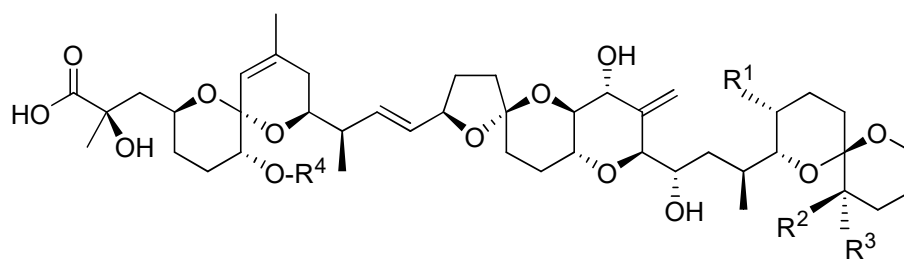
## CRM-DSP-Mus-C (lot numéro 201304)

Matériau de référence certifié de tissu de moule pour l'acide okadaïque et les dinophysistoxines

L'intoxication par phycotoxine diarrhéique (IPD) est une maladie gastro-intestinale provoquée par l'ingestion de mollusques contaminés par des toxines produites par certaines souches de dinoflagellés [1]. Les toxines principales associées à l'IPD sont l'acide okadaïque (AO) et les dinophysistoxines, DTX1 et DTX2 (figure 1). Le CRM-DSP-Mus-c est un homogénat de tissu de moule (*Mytilus edulis*) contenant de l'AO, du DTX1 et du DTX2. Dans ce matériau, on retrouve aussi de l'acide domoïque (AD) et de l'épiAD (figure 2), ainsi que des esters acyliques d'AO et des DTX. Dans les tableaux 1 et 2, nous donnons une liste des analytes pour lesquels des valeurs certifiées ont été établies, avec leurs incertitudes totales ( $U_{CRM}$ ). Dans le tableau 3, nous donnons des valeurs informatives pour les esters acyliques des toxines IPD présentes, alors que dans le tableau 4, nous donnons des valeurs informatives sur les concentrations individuelles d'AD et de l'épiAD.

**Tableau 1 :** Concentrations certifiées et incertitudes associées pour l'acide okadaïque et les dinophysistoxines dans le CRM-DSP-Mus-c.

Toxine	AO	DTX1	DTX2
Concentration forme acide libre (mg/kg)	1,07 ± 0,08	1,07 ± 0,11	0,86 ± 0,08



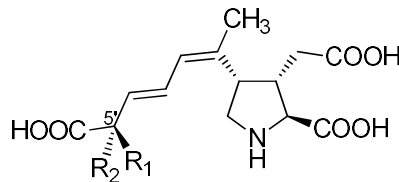
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
AO	CH <sub>3</sub>	H	H	H
DTX1	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H
DTX2	H	H	CH <sub>3</sub>	H
7-O-Acyl AO	CH <sub>3</sub>	H	H	O-Acyl
7-O-Acyl DTX1	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	O-Acyl
7-O-Acyl DTX2	H	H	CH <sub>3</sub>	O-Acyl

**Figure 1 :** Structures de l'acide okadaïque et des dinophysistoxines. Une série d'esters gras acyliques sont formés comme métabolites dans les mollusques (liaison au R<sup>4</sup>).



**Tableau 2 :** Valeur certifiée et incertitude associée pour la concentration totale d'AD et d'épiAD dans le CRM-DSP-Mus-c.

Toxine	AD + épiAD
Concentration (mg/kg)	11,8 ± 0,6



**Figure 2 :** Structure de l'AD ( $R_1=CH_3$ ,  $R_2=H$ ) et du C5'-épiAD ( $R_1=H$ ,  $R_2=CH_3$ ).

**Tableau 3 :** Valeurs informatives pour les esters acyliques d'acides gras de l'acide okadaïque et les dinophysistoxines dans le CRM-DSP-Mus-c.

Composé parent	Total post-hydrolyse (mg/kg)*
AO	2,4
DTX1	1,1
DTX2	2,2

\* Valeurs totales (toxine libre plus esters) ne sont pas certifiées.

**Tableau 4 :** Valeurs informatives pour les concentrations individuelles d'AD et d'épiAD dans le CRM-DSP-Mus-c.

Toxine	AD	épiAD
Concentration (mg/kg)	11,5	0,3

### Utilisation prévue

Le CRM-DSP-Mus-c est un MRC à matrice de tissu de moule (*Mytilus edulis*) pour lequel des valeurs certifiées ont été établies pour l'AO, le DTX1, le DTX2 et l'AD + l'épiAD. Il est conçu pour tester la précision de méthodes d'analyse chimique ou pour aider au développement de nouvelles méthodes d'analyse de ces toxines de mollusques. Le CRM-DSP-Mus-c contient aussi des quantités significatives de métabolites d'esters acyliques de l'AO et de DTX2, et peut être utilisé pour le développement de méthodes pour ces composés.

## Instructions pour l'entreposage et l'utilisation

Le CRM-DSP-Mus-c devrait être entreposé dans un congélateur (à -12 °C ou moins) pour en assurer la stabilité.

Il faudrait laisser chaque flacon revenir à la température ambiante avant de l'ouvrir, et le contenu devrait être mélangé à fond (p. ex., agitation au vortex pendant au moins 2 min). Chaque flacon contient environ 4 g ( $\pm 0,75$  g) de tissu. La masse de l'homogénat n'est pas certifiée. Enlever le joint hermétique avec soin au moyen d'un couteau ou d'une lame, bien mélanger le contenu au moyen d'une spatule et peser l'échantillon sur une balance d'analyse. Il n'est pas recommandé de prélever des sous-échantillons à partir du même flacon de CRM-DSP-Mus-c; idéalement, tout le contenu du flacon devrait être utilisé à des fins d'analyse.

## Préparation de la matrice du MRC

Le CRM-DSP-Mus-c est un mélange de tissus de moules (*Mytilus edulis*) contaminés naturellement par l'AO et le DTX2 (Castletownbere, Irlande, 2004), de tissus de moules (*Mytilus edulis*) contaminés par de l'AD (Île-du-Prince-Édouard, Canada, 1987) et d'une petite quantité de biomasse provenant de *Prorocentrum lima* en culture afin d'augmenter le niveau d'AO et d'ajouter du DTX1. Les moules ont été cuites à la vapeur, puis écaillées avant leur congélation. Avant la préparation du matériau de référence certifié, les moules ont été nettoyées en éliminant des morceaux de coquilles et des filaments de byssus. Les tissus ont été initialement homogénéisés au moyen d'un Robot Coupe et traités dans un autoclave (+120 °C pendant 20 min). Environ 4,8 kg de chair de moules entières de Castletownbere, 0,95 kg de glandes digestives de moules de Castletownbere et 0,15 kg de tissus de moules de l'Île-du-Prince-Édouard ont été combinés dans un récipient en acier inoxydable et mélangés à la main. La biomasse de *Prorocentrum lima* (41 g) a ensuite été ajoutée. Des stabilisants (éthoxyquine, oxytétracycline, érythromycine et ampicilline) ont été ajoutés à des concentrations de 0,02 % en poids [2]. Le tout a été mélangé de nouveau au moyen d'un mélangeur Polytron et de l'eau doublement distillée a été ajoutée de manière à porter la teneur en eau à environ 85 %. Une homogénéisation finale a été réalisée au moyen du Polytron. L'homogénat de moule a été continuellement mélangé pendant le remplissage des flacons, au moyen d'un mélangeur et purgé sous azote. Des aliquotes ( $4 \pm 0,75$  g) ont été placées dans des flacons de 5 mL en polypropylène, sous azote, au moyen d'une pompe péristaltique. Immédiatement après le remplissage, les flacons ont été purgés avec de l'azote de nouveau et thermoscellés au moyen de dispositifs de fermeture en feuille d'aluminium. Les joints ont été inspectés, les flacons étiquetés et des bouchons ont été mis en place. Les flacons ont été congelés et scellés individuellement dans des pochettes en trilaminé.

## Méthodes d'analyse

Les valeurs certifiées pour l'AO, le DTX1 et le DTX2 ont été déterminées en suivant deux approches distinctes d'extraction et de dosage. La première approche suivie est basée sur une méthode d'extraction exhaustive liquide-solide (4 g de tissu avec 50 mL de méthanol, procédure en 4 étapes) avec des additions connues d'un étalon pour compenser les effets de matrice en CL-SM/SM (figure 3). La solution de dopage pour les additions connues de l'étalon a été préparée en utilisant des solutions étalons d'AO et de DTX fournies par le CNRC (CRM-OA-c, CRM-DTX1 et CRM-DTX2). Pour la deuxième approche, le CRM-DSP-Mus-c a été extrait au moyen d'une dispersion complète en phase à matrice solide (0,5 g de tissu, 2 g de phase C18, 10 mL de méthanol) avec étalonnage apparié à la matrice pour tenir compte des effets de matrice lors de l'analyse par CL-SM/SM. Les étalons appariés à la matrice ont été préparés en dopant les MRC étalons dans des tissus de moule « blancs » (CRM-Zero-Mus) et en les extrayant avec la même méthode de dispersion complète en phase solide appliquée au CRM-DSP-Mus-c.



Une procédure d'hydrolyse basique [3] a été suivie pour déterminer indirectement les niveaux d'esters d'AO et de DTX2 présents dans le CRM-DSP-Mus-c (tableau 3), en utilisant des conditions de méthodes d'extraction et de CL-SM/SM similaires à celles suivies pour l'exercice de certification. Le profil des esters a aussi été déterminé directement par CL-SM à haute résolution, les principaux esters acyliques d'AO et de DTX2 étaient 16:0, 16:1, 14:0, 18:4, 18:1, 20:5 et 22:6. D'autres esters étaient aussi présents en quantités moindres.

La valeur certifiée pour l'AD a été déterminée par extraction des échantillons en suivant une méthode d'extraction exhaustive liquide-solide (4 g de tissu avec 50 mL de méthanol aqueux à 50 %, procédure en 4 étapes). Des extraits filtrés ont été analysés par CL-SM/SM et CL-UV (figure 4). Aucun effet de matrice significatif n'a été détecté en CL-SM/SM. L'étalonnage a été réalisé en utilisant des dilutions précises d'une solution étalon certifiée d'AD (CRM-DA-f). La valeur certifiée correspond à la concentration totale d'AD et de son diastéréo-isomère C5', C5'-épiAD, qui a un spectre UV identique à celui de l'AD. Les valeurs informatives pour les concentrations individuelles d'AD et d'épiAD, obtenues par CL-UV, sont respectivement de 11,5 et 0,3 mg/kg (tableau 4).

### Homogénéité

Un nombre représentatif de flacons de CRM-DSP-Mus-c ont été prélevés parmi la série complète de flacons remplis ( $n = 30$ ). Une bonne homogénéité a été observée, et nous avons calculé que les incertitudes relatives due à l'homogénéité d'une bouteille à l'autre allait de 0,6 à 1,9 % pour les analytes certifiés. Nous avons utilisé ces incertitudes pour le calcul de l'incertitude combinée finale. Le CRM-DSP-Mus-c est un matériau à matrice et, donc, l'incertitude due à l'homogénéité ( $\mu_{\text{hom}}$ ) est un élément important de l'incertitude totale.

### Stabilité

Une étude isochrone inverse sur le CRM-DSP-Mus-c a mis en évidence une bonne stabilité de l'AO, de DTX1 et de DTX2 à -12 °C, +4 °C et +20 °C après une année. Une dégradation significative a été observée à +40 °C. Ces données ont été utilisées pour calculer l'incertitude associée à la stabilité à long terme à des fins d'inclusion dans le bilan d'incertitudes combinées final. L'AD était stable dans le CRM-DSP-Mus-c à -12 °C pendant un an et ces données ont été utilisées pour calculer l'incertitude associée à la stabilité à long terme.

### Incertitude

Toutes les sources raisonnables d'erreur reliées à la caractérisation du CRM-DSP-Mus-c ont été prises en compte et quantifiées. Un élément d'incertitude combinée lié aux deux méthodes d'analyse utilisées est inclus ( $\mu_{\text{char}}$ ). L'estimation de l'incertitude globale ( $U_{\text{CRM}}$ ) comprend des incertitudes associées à la caractérisation du lot ( $\mu_{\text{char}}$ ), à la variation d'un flacon à l'autre ( $\mu_{\text{hom}}$ ) et à l'instabilité lors du stockage à long terme ( $\mu_{\text{stab}}$ ) [4]. Ces éléments sont donnés dans le tableau 5 et sont combinés de la manière suivante :

$$\text{Équation 1 : } U_{\text{CRM}} = k\sqrt{\mu_{\text{char}}^2 + \mu_{\text{hom}}^2 + \mu_{\text{stab}}^2}$$

dans laquelle  $k$  est le facteur de couverture pour un niveau de confiance de 95 % (= 2).



**Tableau 5** : Éléments d'incertitude (mg/kg) pour les valeurs certifiées du CRM-DSP-Mus-c.

Incertitude	AO	DTX1	DTX2	AD+épiAD
$\mu_{\text{hom}}$	0,011	0,018	0,008	0,3
$\mu_{\text{stab}}$	0,019	0,007	0,016	0,1
$\mu_{\text{char}}$	0,035	0,052	0,035	0,2
$U_{\text{CRM}} (k=2)$	0,08	0,11	0,08	0,6

### Consignes de sécurité

Le CRM-DSP-Mus-c contient une variété de biotoxines marines qui peuvent provoquer des problèmes gastro-intestinaux et neurologiques [5]. Ce matériau ne convient pas à la consommation humaine. Seules des personnes qualifiées devraient manipuler le CRM-DSP-Mus-c et des méthodes appropriées d'élimination devraient être suivies pour les extraits d'échantillons. Il faudrait porter des gants et une protection pour les yeux quand on manipule le CRM-DSP-Mus-c. Une fiche signalétique est disponible.

### Période de validité

Si le CRM-DSP-Mus-c est conservé non ouvert dans les conditions recommandées, la concentration certifiée est valide pour 1 an à partir de la date de vente.

### Traçabilité métrologique

Les résultats présentés dans ce certificat sont traçables au SI (*Système international d'unités*) par l'entremise d'étalons de pureté établie, préparés gravimétriquement.

### Management de la qualité (ISO/CEI 17025, ISO Guide 34)

Ce matériel a été produit conformément au système qualité documenté de Science des mesures et étalons du CNRC, qui est conforme aux exigences de la norme ISO/CEI 17025 et du Guide ISO 34.

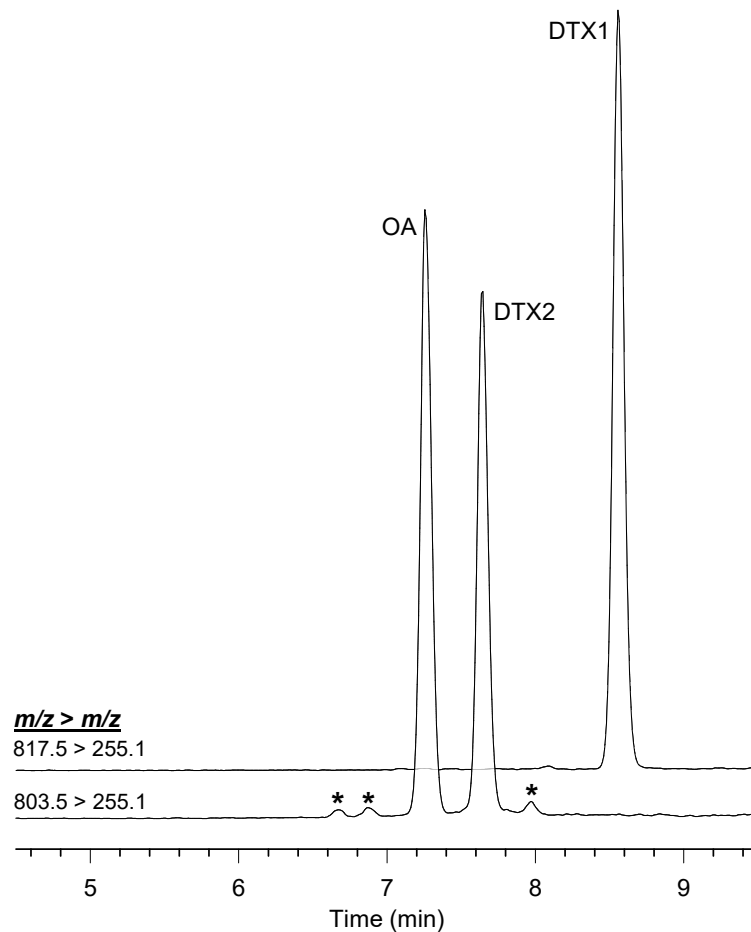
Le système de management de la qualité à l'appui des aptitudes en matière de mesure et d'étalonnages du CNRC, comme indiqué dans la base de données (<http://kcdb.bipm.org/>) du Bureau international des poids et mesures (BIPM), a été examiné et approuvé sous l'autorité du Système interaméricain de métrologie (SIM) et jugé conforme aux attentes de l'arrangement de reconnaissance mutuelle du Comité international des poids et mesures (CIPM). Le certificat d'approbation SIM est disponible sur demande.

### Références

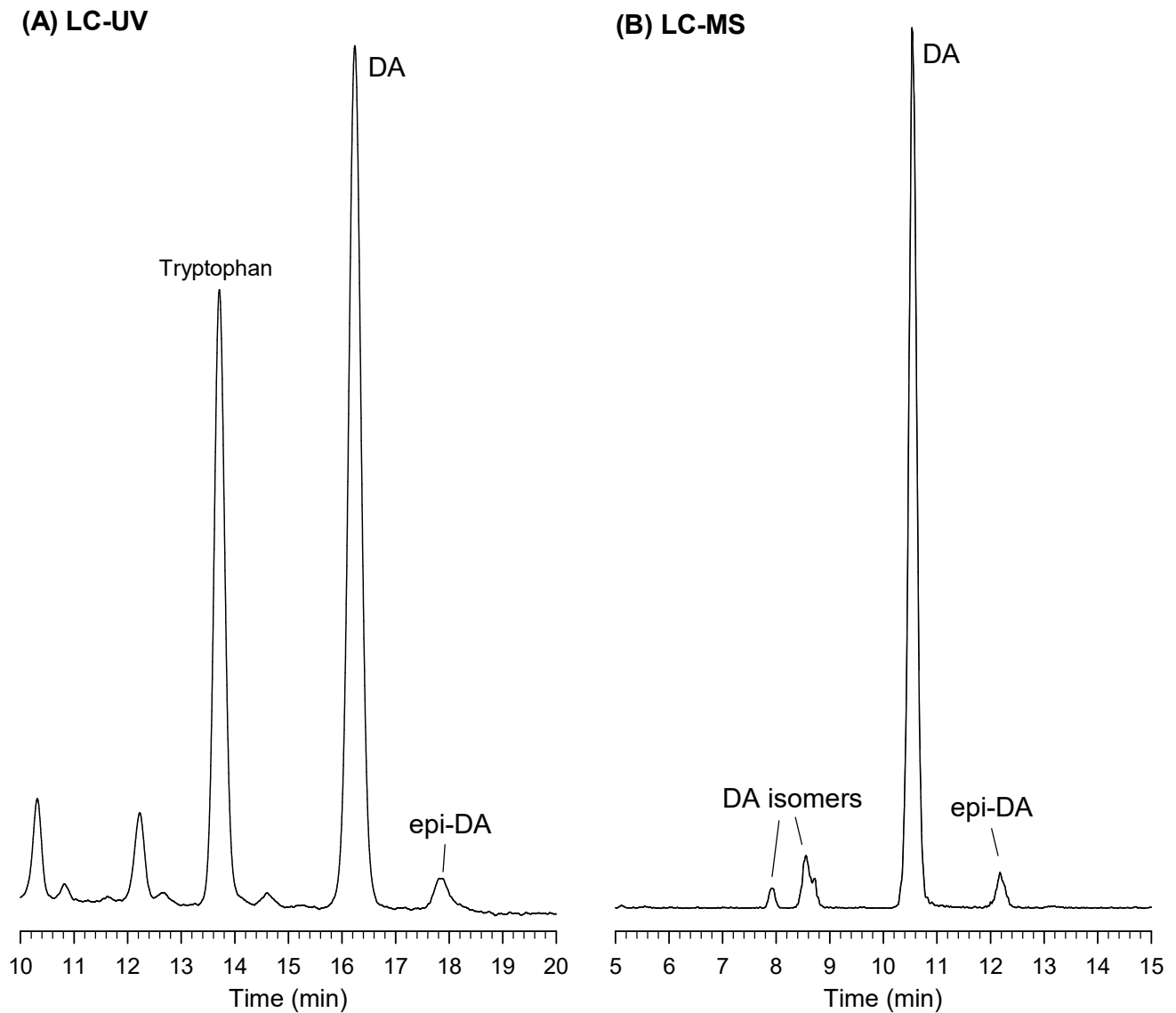


1. Yasumoto T, Murata M, Lee JS, Torigoe K (1989). Polyether toxins produced by dinoflagellates. In: Natori S, Hashimoto K, Ueno Y (Editors) *Mycotoxins and Phycotoxins '88*. Elsevier, Amsterdam, 375-382.
2. McCarron P, Burrell S, Hess P (2007). Effect of addition of antibiotics and an antioxidant on the stability of tissue reference materials for domoic acid, the amnesic shellfish poison. *Anal Bioanal Chem* 387:2495-2502.
3. Mountfort DO, Suzuki T, Truman P (2001). Protein phosphatase inhibition assay adapted for determination of total DSP in contaminated mussels. *Toxicon* 39:383-390.
4. Pauwels J, Lamberty A, Schimmel H (2000). Evaluation of uncertainty of reference materials. *Accred Qual Assur* 5:95-99.
5. Picot C, Nguyen TA, Roudot AC, Parent-Massin D (2011). A preliminary risk assessment of human exposure to phycotoxins in shellfish: a review. *Hum Ecol Risk Assess* 17:328-366.





**Figure 3 :** Analyse par CL-SM/SM d'un extrait de CRM-DSP-Mus-c. Les isomères sont indiqués par des astérisques (\*). Conditions pour la CL : colonne Luna C18(2) (50 × 2,1 mm d.i., 2,5 µm); phase mobile : (A) eau désionisée et (B) 95 % acétonitrile, les deux contenant de l'acide formique 50 mM et du formate d'ammonium 2 mM; gradient 25-100 % de B en 8 min à 0,25 mL/min à +20°C; volume injecté 5 µL. SM utilisé en mode ion négatif avec la mesure de réactions sélectionnées; énergie de collision: - 65 eV; potentialité de défragmentation: - 75 V.



**Figure 4 :** Analyses par CL-UV (A) et CL-SM/SM (B) de l'AD et de ses isomères dans un extrait de CRM-DSP-Mus-c. Conditions pour la CL-UV : CL Agilent 1100; longueur d'onde : 242 nm; colonne : Luna C18 (150 × 4,6 mm d.i., 3 µm); phase mobile : 10 % acétonitrile et 0,1 % acide trifluoroacétique dans l'eau; 0,9 mL/min à +35°C; volume injecté : 10 µL. Conditions pour la CL-SM/SM : CL Agilent 1100 et SM AB-Sciex API4000 à triple quadripôle; colonne : Luna C18 (150 × 4,6 mm d.i., 3 µm); phase mobile : 10 % acétonitrile et 0,1 % acide formique dans l'eau; 1,0 mL/min à +35 °C; volume injecté : 10 µL; SM utilisé en mode ion positif avec la mesure de réactions sélectionnées ( $m/z$  312→266); énergie de collision : 15 eV; potentialité de défragmentation : 50 V.

## 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-DSP-Mus-c : D. Beach, S. Crain, S.D. Giddings, P. McCarron, R. Perez, M.A. Quilliam, K. Reeves, K. Thomas.

Nous remercions Stephen Burrell et Conor Duffy du Marine Institute (Galway, Irlande) pour la fourniture des tissus de moules contaminées.

## Le présent document devrait être cité comme suit:

K.L. Reeves, S.D. Giddings, M.A. Quilliam and P. McCarron, "CRM-DSP-Mus-c, a mussel tissue certified reference material for okadaic acid and dinophysistoxins", Biotxin Metrology Technical Report CRM-DSP-Mus-c-201304, National Research Council Canada, Halifax, September 2014.

DOI <https://doi.org/10.4224/crm.2014.dsp-mus-c.201304>

## Référencé/cité par:

P. McCarron, K.L. Reeves, S. Giddings, D.G. Beach, M.A. Quilliam (2016). Development of Certified Reference Materials for Diarrhetic Shellfish Poisoning Toxins, Part 2: Shellfish Matrix Materials. *Journal of AOAC International* 99(5):1163-1172.

*Date de délivrance : septembre 2014*

*Version du document : 20220221*

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

Approuvé par :



Pearse McCarron, Ph.D.  
Chef de discipline, 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](mailto:CRM-MRCBiotoxin-Biotoxines@nrc-cnrc.gc.ca)

