



Certificat d'analyse

Matériau de référence certifié

CRM-PSP-Mus (Lot no 200703)

Matériau de référence à base de tissus de moule pour la saxitoxine et ses analogues

L'intoxication paralysante par les mollusques survient après l'ingestion de mollusques dans lesquels se sont accumulées des saxitoxines produites par des dinoflagellés [1]. Le CRM-PSP-Mus est un mélange de tissus de moules entières (*Mytilus edulis*), de biomasse cultivée de *Alexandrium spp.* et de toxines semi-purifiées [2]. Les valeurs certifiées et les incertitudes élargies sont fournies pour la saxitoxine (STX), la gonyautoxine-2 (GTX2) et la gonyautoxine-3 (GTX3) (Tableau 1), de même que les valeurs informatives pour d'autres analogues de la STX (Tableau 2) et une valeur certifiée pour la combinaison de l'acide domoïque (AD) et de C5'-acide épidoïque (AépiD) (Tableau 3).

Tableau 1 : Valeurs certifiées de la concentration des analogues de la STX et leur incertitude dans le CRM-PSP-Mus.

Composé	$\mu\text{mol/kg}$	$\mu\text{g éqv STX diHCl /kg}^*$
Saxitoxine (STX)	$4,99 \pm 0,33$	1 860
Gonyautoxine-2 (GTX2)	$0,96 \pm 0,13$	128
Gonyautoxin-3 (GTX3)	$0,33 \pm 0,05$	78

Tableau 2 : Valeurs informatives d'autres analogues de la STX dans le CRM-PSP-Mus.

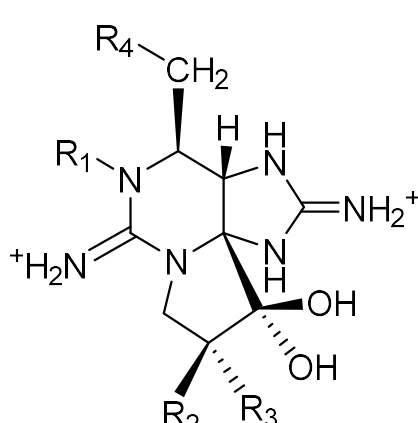
Composé	$\mu\text{mol/kg}^{**}$	$\mu\text{g éqv STX diHCl /kg}^*$
Gonyautoxine-1 (GTX1)	0,13	49
Gonyautoxine-4 (GTX4)	0,04	12
Décarbamoylegonyautoxine-2 (dcGTX2)	0,38	22
Décarbamoylegonyautoxine-3 (dcGTX3)	0,10	14
Néosaxitoxine (NEO)	0,19	65
Décarbamoylegonyautoxine (dcSTX)	0,27	51
Total $\mu\text{g éqv STX diHCl /kg}$		2 278

* Valeurs informatives d'équivalence toxique calculées à l'aide de facteurs d'équivalence toxique [3]

** Ces concentrations ne sont pas certifiées.

Période de validité : 1 an à partir de la date de vente

Conditions de conservation : -12 °C ou moins



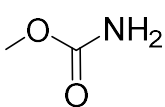
R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Toxin
H	H	H		STX
OH	H	H		NEO
H	H	OSO ₃ ⁻		GTX2
H	OSO ₃ ⁻	H		GTX3
OH	H	OSO ₃ ⁻		GTX1
OH	OSO ₃ ⁻	H		GTX4
H	H	OSO ₃ ⁻		dcGTX2
H	OSO ₃ ⁻	H	-OH	dcGTX3
H	H	H		dcSTX

Figure 1 : Structure de la saxitoxine et de ses analogues présents dans le CRM-PSP-Mus.

Tableau 3 : Valeur certifiée et incertitude de la combinaison de l'AD et de l'AépiD dans le CRM-PSP-Mus.

Composé	mg/ kg
AD + AépiD	33,6 ± 2,1

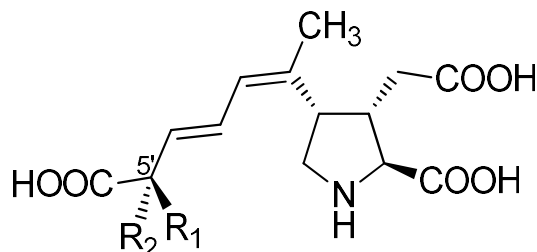


Figure 2 : Structure de l'AD (R₁=CH₃, R₂=H) et C5'-AépiD (R₁=H, R₂=CH₃).

Utilisation prévue

Le CRM-PSP-Mus est une matrice d'un matériau de référence certifié présentant des valeurs certifiées pour la STX, la GTX2, la GTX3 et l'AD et l'AépiD combinés. Il a été conçu pour vérifier la précision de méthodes d'analyse dans leur entièreté et pour faciliter la mise au point de méthodes d'analyse de ces toxines. Le CRM-PSP-Mus présente aussi des valeurs informatives pour des analogues de la STX qui peuvent servir à la mise au point de méthodes visant ces composés.

Instructions pour la conservation et l'utilisation

Afin d'assurer la stabilité du CRM-PSP-Mus, les flacons devraient être conservés dans un congélateur (-12 °C ou moins).

Avant d'ouvrir un flacon, il faudrait le laisser revenir à la température ambiante, puis bien mélanger son contenu. 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, mélanger parfaitement le contenu et peser l'échantillon sur une balance d'analyse. Il n'est pas recommandé que des sous-échantillons soient prélevés à partir d'un flacon de CRM-PSP-Mus; tout le contenu du flacon devrait servir à l'analyse.

Préparation du CRM-PSP-Mus

Le CRM-PSP-Mus est un mélange de moules (*Mytilus edulis*) cuites dont la quantité de toxines STX ou AD est non décelable (prélevées au Canada et aux Pays-Bas), de moules cuites (*Mytilus edulis*) contaminées avec de l'AD (prélevées à l'Île-du-Prince-Édouard, Canada), de biomasse cultivée d'*Alexandrium tamarense* et d'*Alexandrium minutum* et d'une petite quantité de STX et de NEO à moitié purifiées [4]. Le profil de la toxine STX dans la biomasse d'algues a été stabilisé après la récolte [5]. Toutes les moules ont été mélangées et homogénéisées. Des algues *A. tamarense* et *A. minutum* traitées ont été ajoutées ainsi qu'une solution aqueuse contenant de la STX et de la NEO à moitié purifiées. L'éthoxyquine a servi de stabilisant (0,02 % p/p). Toutes les matières ont été passées plusieurs fois dans un coupe-aliment Comitrol que l'on a rincé avec de l'eau désionisée, ce qui a donné une proportion finale en eau d'environ 85 %. L'homogénat a été dégazé, purgé avec de l'azote et puis versé dans des flacons de polypropylène purgés à l'azote, thermoscellées et traitées à la chaleur dans un autoclave à vapeur (118 °C durant 20 min). Après le refroidissement, les flacons ont été congelés avant d'être chacun scellé dans une pochette en stratifié trois épaisseurs.

Méthodes d'analyse et attribution de valeur

Les valeurs certifiées de STX, de GTX2 et de GTX3 ont été déterminées à l'aide de deux méthodes d'analyse. Les extraits de CRM-PSP-Mus ont été préparés par une méthode d'extraction liquide-solide qui est une version modifiée du protocole d'extraction AOAC [6] (8 g de tissu, extraction à l'aide de trois étapes utilisant du HCl 0,1 M HCl pour arriver à un volume final de 25 mL [2]). L'analyse a été réalisée à l'aide d'une version modifiée de la méthode CL-pcox-DOL (chromatographie en phase liquide avec détection en sortie de colonne par oxydation-fluorescence) [7] (Figure 3), et par chromatographie liquide à interaction hydrophile couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CLIH-SM/SM) (Figure 4). Dans le cas de la CL-pcox-DOL, l'étalonnage externe a été réalisé à l'aide de dilutions précises de solutions d'étalonnage de la STX (CRM-STX et CRM-GTX2&3). Pour la CLIH-SM/SM, l'ajout d'un étalon préparé avec une solution d'enrichissement à base du même matériau de référence certifié (MRC) a servi à corriger les effets de matrice. Les valeurs informatives du CRM-PSP-Mus (Tableau 2) ont été obtenues

par l'une ou les deux techniques, et des dilutions de solutions d'étalonnage du Conseil national de recherches du Canada (CNRC) (CRM-NEO, CRM-dcSTX, CRM-dcGTX2&3 et CRM-GTX1&4) ont servi d'étalons.

La valeur certifiée de l'AD et de l'AépiD (Tableau 3) a été déterminée par extraction des échantillons à l'aide d'une méthode d'extraction exhaustive liquide-solide (4 g de tissu avec 50 mL d'une solution de méthanol à 50 % dans l'eau, 4 étapes). Les extraits filtrés ont été analysés par CL-UV et par CL-SM/SM (Figure 5). Aucun effet significatif de matrice n'a été décelé par CL-SM/SM. Les étalonnages ont été effectués à l'aide de dilutions précises de CRM-DA. La valeur certifiée correspond à la concentration combinée d'AD et de son diastéréoisomère C5', le C5'-AépiD, dont le spectre UV est identique à celui de l'AD. Les valeurs informatives de la concentration d'AD et de la concentration de l'AépiD par CL-UV sont de 30,8 et de 2,8 mg/kg, respectivement.

Une faible concentration d'acide okadaïque (AO) a été mesurée dans le CRM-PSP-Mus par CL-MS/MS lorsque le CRM-OA était l'étalon. Les valeurs informatives d'AO avant et après l'hydrolyse basique sont 0,03 µg/g et 0,06 µg/g, respectivement.

Homogénéité

Un nombre représentatif de flacons de CRM-PSP-Mus a été choisi parmi la série de flacons remplis. La concentration relative des STX et d'AD a été mesurée by CL-pcox-DOL et par CL-UV, respectivement. L'incertitude obtenue des tests d'homogénéité est comprise dans l'incertitude globale du CRM-PSP-Mus (Tableau 4).

Stabilité

Les STX et l'AD présentaient une bonne stabilité dans le CRM-PSP-Mus lorsque ce dernier était conservé à -12 °C. On n'a constaté aucune dégradation importante des analytes certifiés à +4 °C durant deux semaines.

Incertitudes

Toutes les sources raisonnables d'erreur liées à la caractérisation du CRM-PSP-Mus ont été prises en compte et quantifiées. L'estimation de l'incertitude globale (U_{CRM}) comprend les incertitudes associées à la caractérisation du lot (u_{char}), à la variation d'un flacon à l'autre (u_{hom}) et à l'instabilité lors de la conservation (u_{stab}) [8-11]. Ces éléments sont donnés dans le tableau 4 et ont été combinés selon la formule suivante :

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

où k est le facteur de couverture pour l'intervalle de confiance à 95 % (= 2).

Tableau 4 : Éléments de l'incertitude relative des valeurs certifiées du CRM-PSP-Mus.

Composé	u_{char}	u_{hom}	u_{stab}
STX	0,031	0,011	0,003
GTX2	0,036	0,057	0,006
GTX3	0,031	0,069	0,002

AD + AépiD	0,026	0,009	0,016
------------	-------	-------	-------

Consignes de sécurité

Le CRM-PSP-Mus contient des STX et de l'AD, des toxines causant une intoxication paralysante par les mollusques et une intoxication par phycotoxine amnésique, respectivement. Seules des personnes qualifiées devraient manipuler cette matière et des méthodes d'élimination satisfaisantes devraient être suivies. Une fiche de données de sécurité (FDS) est disponible pour le CRM-PSP-Mus.

Période de validité

Si le flacon est conservé non ouvert à la température recommandée de -12 °C ou moins, les concentrations certifiées du CRM-PSP-Mus sont valides pendant 1 an à partir de la date de vente.

Traçabilité métrologique

Les résultats présentés dans le présent certificat sont traçables au SI (*Système international d'unités*) à l'aide des matériaux de référence certifiés du CNRC pour la STX (CRM-STX-e), la GTX2 et la GTX3 (CRM-GTX2&3-c) ainsi que l'AD (CRM-DA-f).

Système de gestion de la qualité (ISO 17034, ISO/CEI 17025)

Ce matériau a été produit conformément au Système de gestion de la qualité de Métrologie du Conseil national de recherches du Canada (CNRC), qui est conforme aux exigences des normes ISO 17034 et ISO/CEI 17025.

Le Système de gestion de la qualité de Métrologie qui appuie les aptitudes en matière de mesures et d'étalonnages du CNRC, telles qu'indiquées dans la base de données des comparaisons clés du Bureau international des poids et mesures (BIPM) (http://kcdb.bipm.org/default_fr.asp), a été examiné et approuvé sous l'autorité du Système interaméricain de métrologie (SIM) et s'est avéré conforme aux attentes de l'Arrangement de reconnaissance mutuelle du Comité international des poids et mesures (CIPM). L'approbation SIM est disponible sur demande.

Références

1. Hall S, Strichartz GR, Moczydlowski E, Ravindran A, Reichardt PB (1990). The saxitoxins: sources, chemistry, and pharmacology. In: Hall S and Strichartz GR (Eds) *Marine Toxins. ACS Symposium Series 418*: 29-65. Washington, DC, *Am Chem Soc*.
2. Thomas K, Beach DG, Reeves KL, Gibbs RS, Kerrin ES, McCarron P, Quilliam MA (2017). Hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for quantitation of paralytic shellfish toxins: validation and application to reference materials. *Anal Bioanal Chem* 409: 5675-5687.
3. Oshima Y (1995). Post column derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J AOAC Int* 78, 528-532.
4. Laycock MV, Thibault P, Ayer SW, Walter JA (1994). Isolation and purification procedures for the preparation of paralytic shellfish poisoning toxin standards. *Nat Toxins* 2: 175-183.
5. Reeves KL, Thomas K, Quilliam MA (2006). A mussel tissue certified reference material for paralytic shellfish poisoning toxins. In: Henshilwood K, Deegan B, McMahon T et al. (eds) *Molluscan Shellfish Safety*. The Marine Institute, Galway, Ireland, pp 116-122.
6. Anon. AOAC Official Method 2011.02. Paralytic shellfish toxins in mussels, clams, oysters, and scallops; post-column oxidation (PCOX) method (2009). *Official Methods of Analysis* 18th Ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
7. Rourke WA, Murphy CJ, Pitcher G, van de Riet JM, Burns BG, Thomas K, Quilliam MA. (2008). Rapid postcolumn methodology for determination of paralytic shellfish toxins in shellfish tissue. *J AOAC Int* 91: 589-597.
8. Pauwels J, Lamberty A, Schimmel H (2000). Evaluation of uncertainty of reference materials. *Accred Qual Assur* 5: 95-99.
9. Pauwels J, Lamberty A, Schimmel H (1998). The determination of the uncertainty of reference materials certified by laboratory intercomparison. *Accred Qual Assur* 3: 180-184.
10. Ellison SLR, Burke S, Walker RF, Heydorn K, Mansson M, Pauwels J, Wegscheider W, te Nijenhuis B (2001). Uncertainty for reference materials certified by interlaboratory study: Recommendations of an international study group. *Accred Qual Assur* 6: 274-277.
11. Evaluation of measurement data – Supplement 1 to the “Guide to the expression of uncertainty in measurement” (GUM) – Propagation of distributions using a Monte Carlo method. JCGM 101:2008, www.bipm.org.

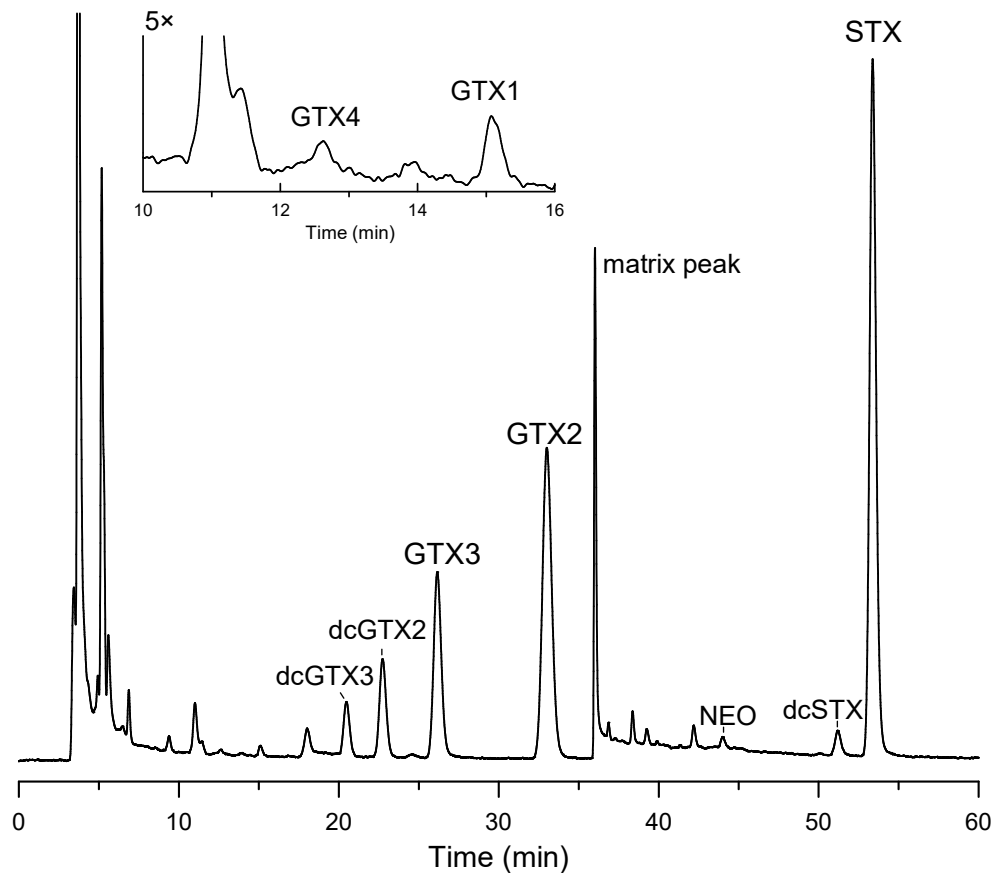


Figure 3 : Analyse par CL-pcox-DOL d'un extrait de CRM-PSP-Mus. Conditions de chromatographie : colonne Zorbax Bonus-RP (150 × 4,6 mm, 5 µm); phase mobile : A) Solution contenant 11 mM de sulfonate d'heptane et 5,5 mM d'acide phosphorique dans l'eau (pH 7,1), et B) solution contenant 11 mM de sulfonate d'heptane et 16,5 mM d'acide phosphorique dans l'eau (pH 7,1) avec 11,5 % acétonitrile; gradient discontinu 100% A, passage à 100 % B à 18 min; 0,8 mL/min à +30 °C; volume d'injection de 20 µL; oxydation post-colonne : 0,4 mL/min avec 5 mM acide périodique dans 100 mM d'acide phosphorique dans l'eau à pH 7,8 avec bobine de réaction à 80 °C; effluent acidifié avec 0,75 M d'acide nitrique à raison de 0,4 mL/min; détection : fluorescence avec excitation à 330 nm et émission à 390 nm.

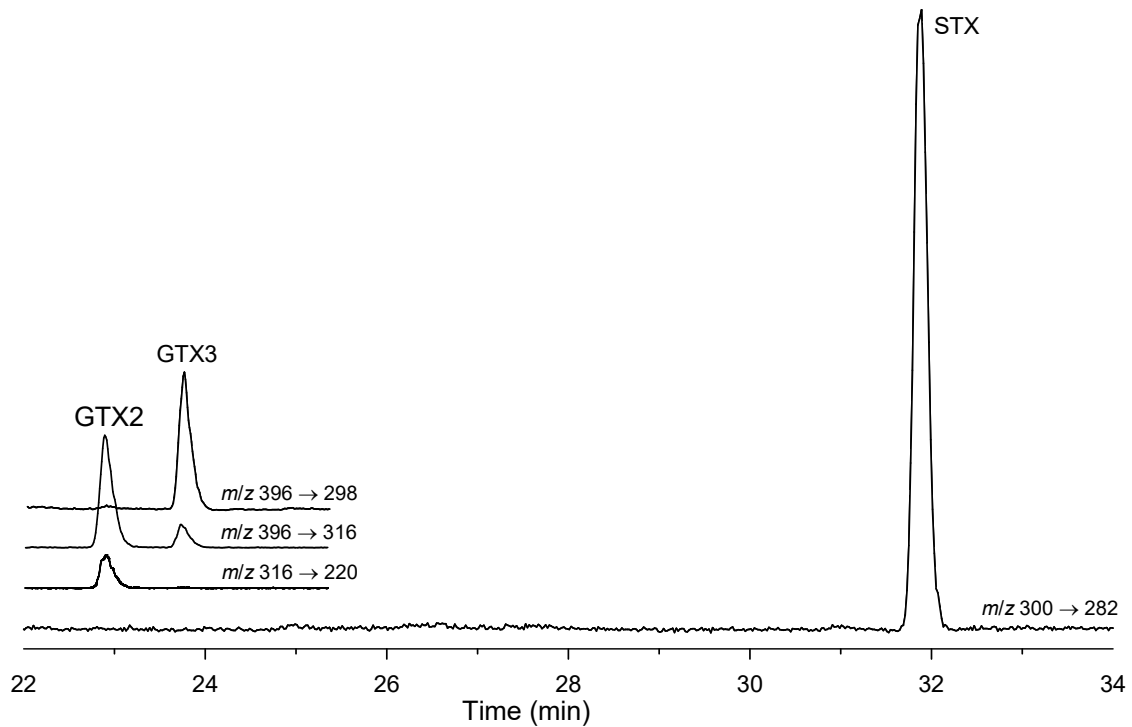


Figure 4 : Analyse par CL-SM/SM de la STX, la GTX2 et la GTX3 dans un extrait de CRM-PSP-Mus à l'aide d'un appareil Agilent 1290 LC couplé à un spectromètre de masse Sciex 5500 QTRAP avec ionisation positive par électrobulbation. Conditions de chromatographie : colonne Toso-Haas Amide-80 (250 × 2,1 mm, 5 µm); phase mobile : Phase mobile A : solution contenant 2 mM de formiate d'ammonium dans l'eau avec 50 mM d'acide formique; et phase B : MeCN. Gradient : Gradient d'élution de 90 % à 55 % de B en 25 min, 0,2 mL/min à +40 °C; volume d'injection de 5 µL. SM en mode détection de réactions sélectionnées d'ions positifs utilisé dans les conditions décrites précédemment [2].

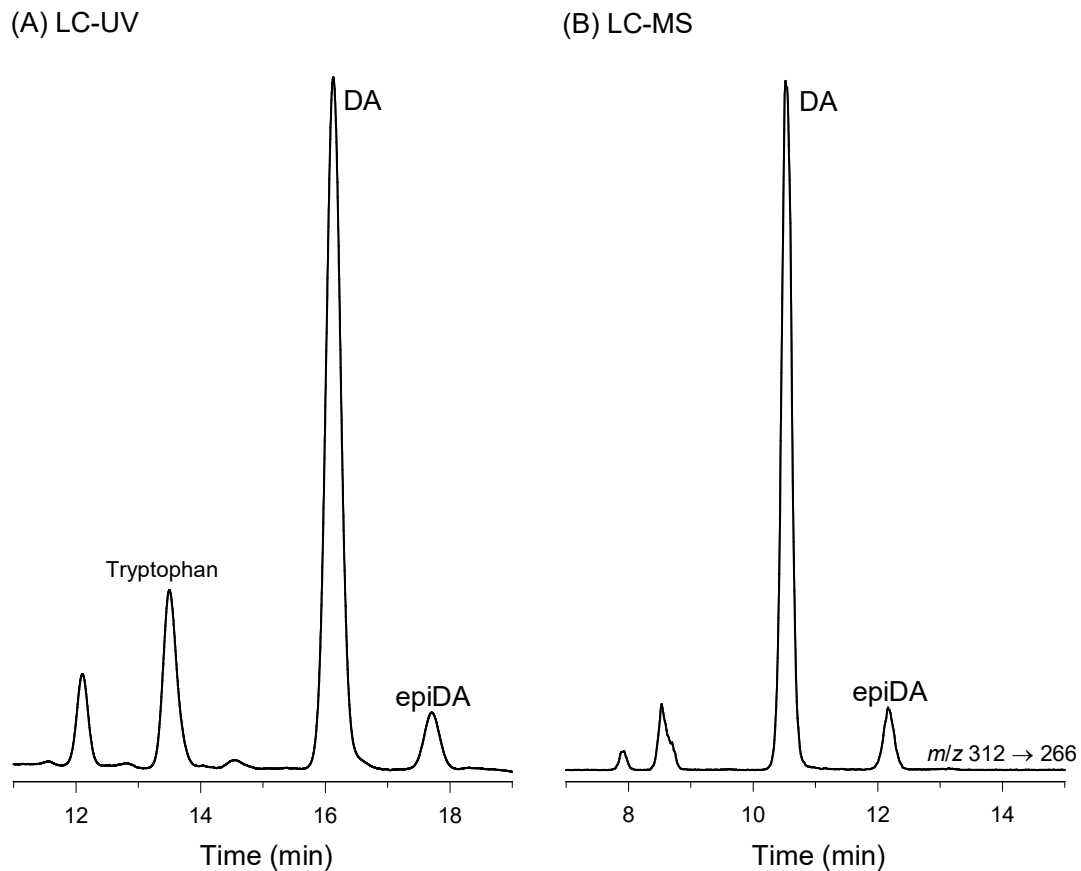


Figure 5 : Analyse par CL-UV (A) and LC-MS/MS (B) de l'AD et de l'AépiD dans un extrait de CRM-PSP-Mus au moyen d'une colonne Phenomenex Luna C18 (150 × 4,6 mm, 3 µm). Conditions de la CL-UV : appareil Agilent 1100 LC muni d'un détecteur à barrettes de diodes 1290; longueur d'onde : 242 nm; phase mobile : solution contenant 10 % de MeCN et 0,1 % de TFA dans l'eau; élution à 0,9 mL/min à +35 °C; volume d'injection de 10 µL. Conditions de CL-SM : appareil Agilent 1200 couplé à un spectromètre Sciex 4000 QTRAP; phase mobile : solution contenant 10 % de MeCN et 0,1 % d'acide formique dans l'eau; 0,9 mL/min à +35 °C; volume d'injection à 5 µL; SM en mode détection de réactions sélectionnées d'ions positifs; Conditions pour la SM : énergie de collision +25 V; potentiel de désagrégation 50 V.

Remerciements

Les membres suivants du personnel du CNRC ont contribué à la production et à la certification du CRM-PSP-Mus : Beach D, Crain S, Giddings SD, Kerrin E, LeBlanc P, Marciniak D, McCarron P, Perez Calderon R, Pitcher G, Quilliam MA, Reeves KL, Thomas K et Wright EJ.

Le CRM-PSP-Mus a été préparé dans le cadre d'une Stratégie de partenariat de recherche entre le CNRC et l'Agence canadienne d'inspection des aliments (Dartmouth, Nouvelle-Écosse) (CFIA-ACIA-no 852837).

Le présent document devrait être cité de la manière suivante :

Thomas K, Reeves K, Gibbs R, McCarron P, Quilliam MA "CRM-PSP-Mus, a mussel tissue certified reference material for Saxitoxin and Related Analogues", Biotoxin Metrology Technical Report CRM-PSP-Mus-200703, National Research Council Canada, Halifax.
DOI <https://doi.org/10.4224/crm.2021.psp-mus.200703>

Date de délivrance : Août 2021

Version du document : 20220310

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

Approuvé par : 

Pearse McCarron, Ph. D.

Chef d'équipe, Métrologie des biotoxines

Ce certificat n'est valide que si le matériau correspondant a été obtenu directement du CNRC ou d'un revendeur autorisé.

Adresser tout commentaire, toute information ou toute requête à :

Conseil national de recherches du Canada
1411, rue Oxford
Halifax (Nouvelle-Écosse) B3H 3Z1
Canada

Téléphone : 1-902-426-8281

Télécopieur : 1-902-426-5426

Courriel : CRM-MRCHalifax@nrc-cnrc.gc.ca