



# Certificat d'analyse

## Matériau de référence certifié

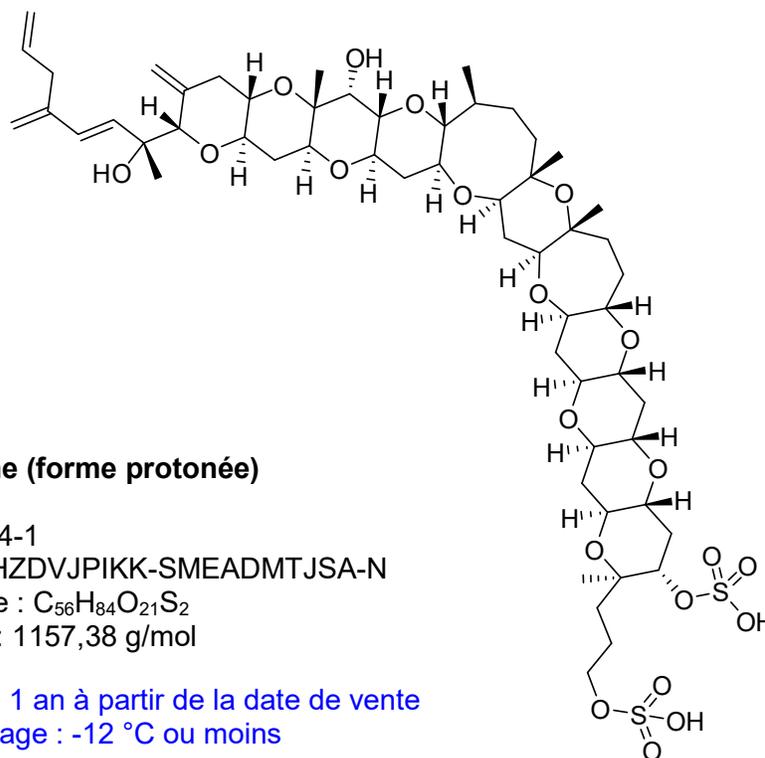
### CRM-hYTX-b (lot n° 20190716)

Solution d'étalonnage certifiée pour la 1-homoyessotoxine

Les yessotoxines (YTX) sont un groupe de composés polyéthers sulfatés produits par divers algues dinoflagellés incluant *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* et *Gonyaulax spinifera* [1]. Les niveaux maximaux permis de certaines YTX dans les mollusques et crustacés destinés à la consommation humaine sont réglementés par l'Union européenne [2]. La 1-homoyessotoxine (hYTX) est un analogue réglementé qui a été identifié pour la première fois dans des mollusques et crustacés de la mer Adriatique [3]. Le CRM-hYTX-b est une solution d'étalonnage certifiée de hYTX dans du méthanol. Il est conçu comme solution pour l'étalonnage d'instruments à des fins d'identification et de dosage de la hYTX.

**Tableau 1** : Concentration certifiée et incertitude pour le CRM-hYTX-b.

Composé	µg/g	µg/mL (15-30 °C)	µmol/L (15-30 °C)
1-homoyessotoxine (hYTX)	7,29 ± 0,39	5,75 ± 0,31	4,97 ± 0,27



#### 1-homoyessotoxine (forme protonée)

No CAS : 196309-94-1

InChIKey : RVOXLHZDVJPIKK-SMEADMTJSA-N

Formule moléculaire : C<sub>56</sub>H<sub>84</sub>O<sub>21</sub>S<sub>2</sub>

Masse moléculaire : 1157,38 g/mol

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

Conditions de stockage : -12 °C ou moins

## Utilisation prévue

Le CRM-hYTX-b est une solution d'étalonnage certifiée conçue pour le développement de méthodes d'analyse et le dosage précis de la hYTX. La concentration convient à la préparation d'une série de dilutions pour l'étalonnage d'instruments d'analyse, tels que des systèmes de chromatographie en phase liquide avec spectrométrie de masse (CPL-SM), ainsi qu'au dopage d'échantillons de contrôle à des fins de mesures de taux de récupération.

## Instructions pour le stockage et l'utilisation

Pour assurer la stabilité du CRM-hYTX-b, les ampoules devraient être conservées à -12 °C ou moins.

Avant d'ouvrir une ampoule, il faudrait la laisser revenir à la température ambiante et bien mélanger son contenu. Les ampoules devraient être ouvertes au niveau de la ligne prélimée. On devrait utiliser un équipement volumétrique étalonné pour transférer des aliquotes précises. Une augmentation de la concentration due à l'évaporation du solvant se produira si l'ampoule de solution est laissée à l'air libre plus de quelques minutes. Il est recommandé de ne pas évaporer le MRC complètement en raison de pertes potentielles. *Remarque* : Le volume de la solution n'est pas certifié. Seule la concentration l'est. Tout le contenu de l'ampoule ne devrait donc pas être simplement transféré dans une fiole jaugée, puis dilué au volume.

## Préparation du CRM-hYTX-b

La 1-homoyessotoxine a été isolée d'une culture en laboratoire à grande échelle de *P. reticulatum* et purifiée en suivant plusieurs étapes de chromatographie au Conseil national de recherches du Canada (CNRC). La structure et la pureté de la hYTX ont été confirmées par RMN de <sup>1</sup>H, CPL-SM haute résolution (CPL-SMHR), CPL avec détection d'aérosol chargé (CPL-DAC) et CPL-SM/SM. Une *m/z* mesurée avec une précision de 1155,4869 ( $\Delta = -0,6$  ppm) a été obtenue pour l'ion [M-H]<sup>-</sup> de hYTX et une fragmentation caractéristique en SM/SM a été observée (Figure 1).

La solution de CRM-hYTX-b a été préparée par dilution précise de la solution mère RMNq dans du méthanol dégazé de haute pureté. Cette solution a été soigneusement mélangée, mise dans des ampoules en verre ambré préalablement remplies d'argon, puis immédiatement scellées à la flamme. Chaque ampoule contient environ 0,5 mL de solution.

## Méthodes d'analyse et attribution de valeur

La valeur certifiée pour le CRM-hYTX-b (Tableau 1) est basée sur des résultats obtenus au CNRC au moyen de deux méthodes d'analyse : La RMNq avec un matériau de référence certifié d'acide benzoïque (NIST SRM 350b) pour l'étalonnage [4] et la CPL-SM/SM avec le CRM-hYTX du CNRC pour l'étalonnage [5].

## Homogénéité

Nous avons prélevé un nombre représentatif d'ampoules de CRM-hYTX-b parmi la série d'ampoules produites, et en avons mesuré la réponse de la hYTX par CPL-SM/SM. Aucune hétérogénéité n'a été observée.

## Stabilité

Des études sur la stabilité pendant un an (long terme) et pendant un mois (transport) ont été réalisées sur le CRM-hYTX. Elles ont mis en évidence une bonne stabilité de la hYTX dans le méthanol dans les ampoules scellées conservées à +4 °C ou moins.

## Incertitude

Toutes les sources d'erreur raisonnables liées à la caractérisation du CRM-hYTX-b ont été prises en compte et mesurées. L'incertitude globale estimée ( $U_{CRM}$ ) comprend les incertitudes associées à la caractérisation du lot ( $u_{char}$ ) et à l'instabilité lors du stockage ( $u_{stab}$ ) [6-8]. Ces éléments sont donnés dans le Tableau 2 et sont combinés de la manière suivante :

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

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

**Tableau 2** : Éléments d'incertitude pour la valeur certifiée du CRM-hYTX-b.

Incertitudes	Relative*
$u_{char}$	0,025
$u_{hom}$	négligeable
$u_{stab}$	0,010

\*Relative à la concentration indiquée dans le Tableau 1.

## Consignes de sécurité

Les yessotoxines ont été initialement classées comme toxines diarrhéiques de mollusques et crustacés, mais l'activité biologique de ces composés ne présente pas d'effet diarrhéique et les YTX ont depuis été classées comme groupe séparé de toxines [9]. Aucune toxicité humaine n'a été rapportée suite à la consommation de mollusques et crustacés contaminés par une YTX [10]. Néanmoins, des précautions doivent être prises lors de la manipulation du CRM-hYTX-b. L'inhalation et l'ingestion de méthanol sont dangereuses et, donc, seules les personnes qualifiées doivent manipuler la solution et des méthodes appropriées d'élimination devraient être suivies. De l'équipement de protection personnelle adéquat devrait être utilisé lors de l'ouverture d'une ampoule au cas où le verre se briserait. Une fiche de données de sécurité (FDS) est disponible pour le CRM-hYTX-b.

## Période de validité

Si l'ampoule est conservée non ouverte dans la condition recommandée de -12 °C ou moins, la concentration certifiée du CRM-hYTX-b est valide 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*) au moyen d'étalons préparés par gravimétrie à partir d'un matériau de référence certifié du NIST, l'acide benzoïque (NIST SRM 350b) et d'un matériau de référence certifié de hYTX (CRM-hYTX du CNRC).

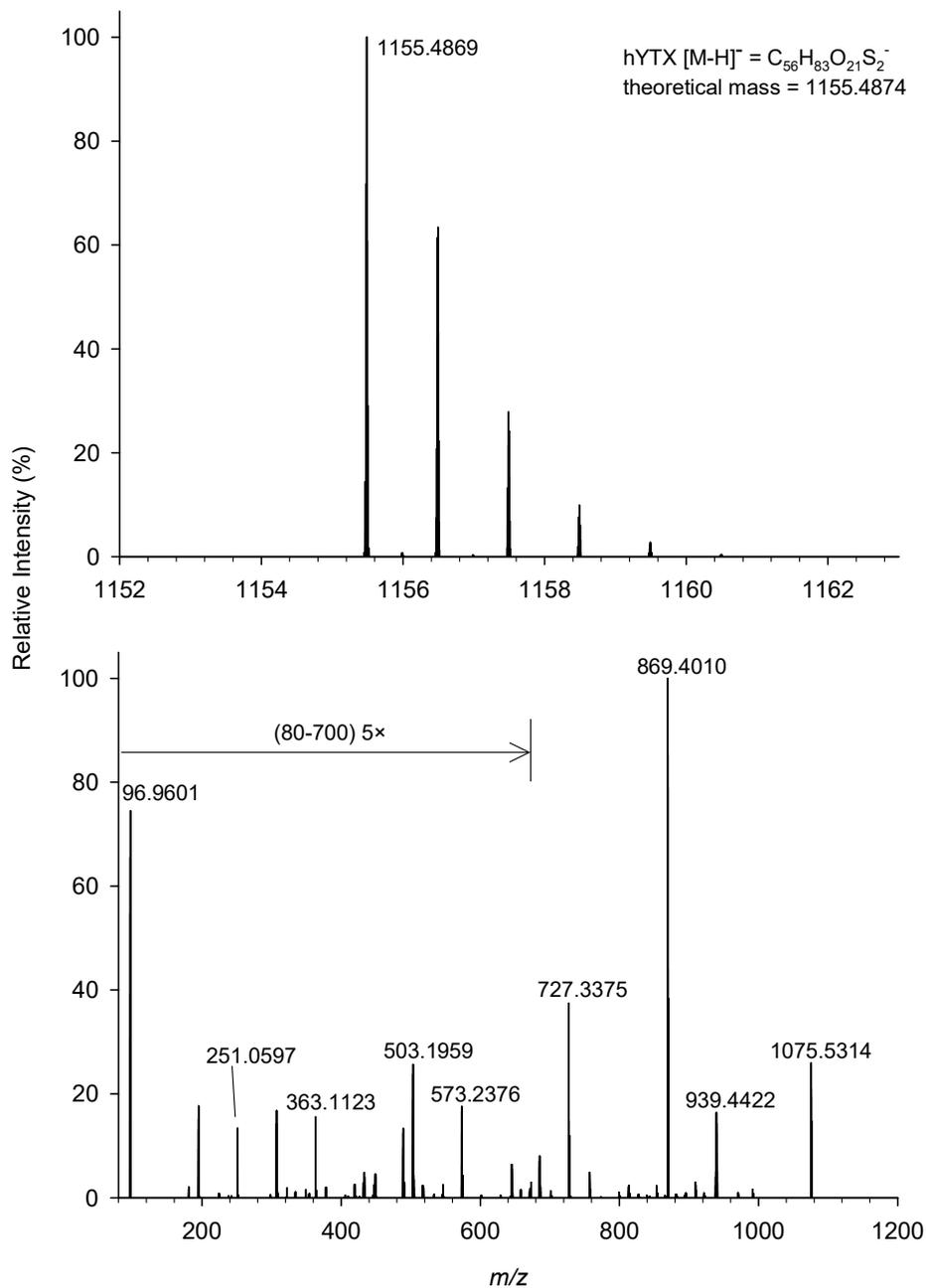
### **Système de gestion de la qualité (ISO 17034, ISO/CEI 17025)**

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.

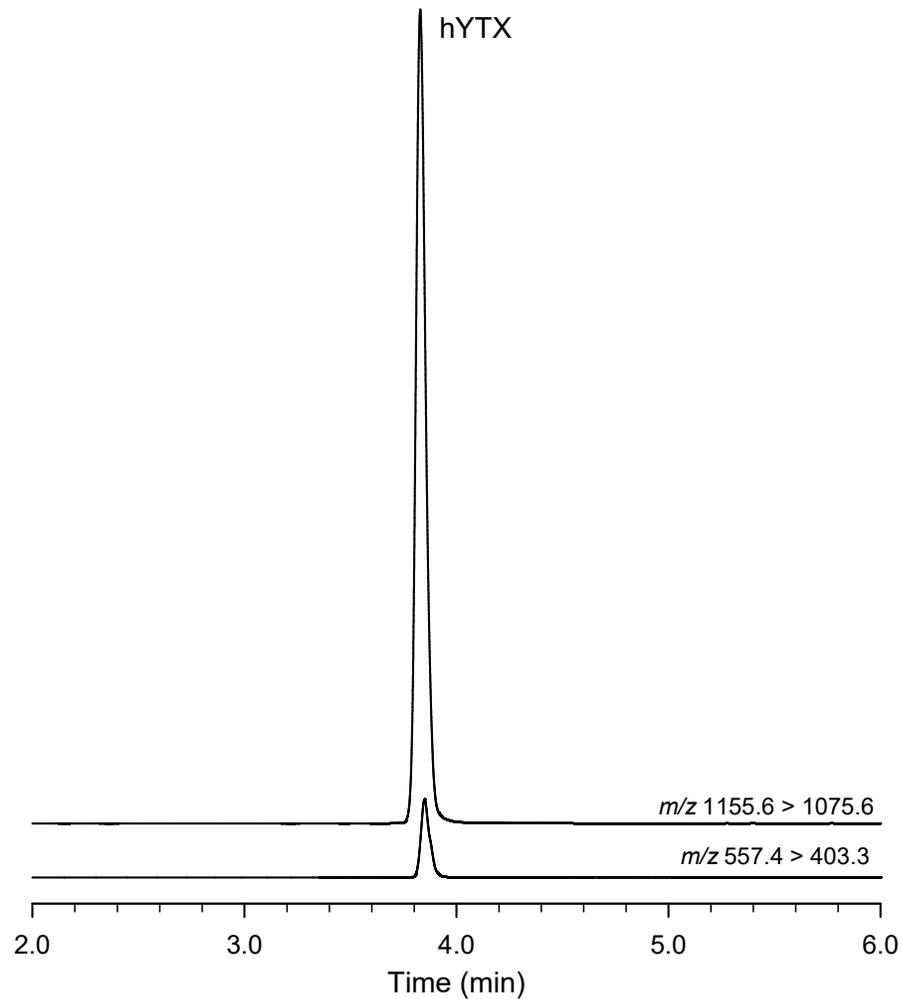
Le Système de gestion de la qualité de Métrologie qui appuie les aptitudes en matière de mesures et d'étalonnages du CNRC, telles qu'indiquées dans la base de données des comparaisons clés du Bureau international des poids et mesures (BIPM) ([http://kcdb.bipm.org/default\\_fr.asp](http://kcdb.bipm.org/default_fr.asp)), 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. Hess P, Aasen JAB (2007). Chemistry, origins, and distribution of yessotoxin and its analogues, in Botana LM (Ed) *Phycotoxins: Chemistry and origins*. Blackwell Publishing, Oxford, 187-202.
2. 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 Eur Union*, L 139 of 30 April 2004.
3. Satake M, Tubaro A, Lee JS, Yasumoto T (1997). Two new analogs of yessotoxin: homoyessotoxin and 45-hydroxyhomoyessotoxin, isolated from mussels of the Adriatic Sea. *Nat Toxins* 5: 107-110.
4. Burton IW, Quilliam MA, Walter JA (2005). Quantitative  $^1\text{H}$  NMR with external standards: Use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products. *Anal Chem* 77: 3123-3131.
5. de la Iglesia P, Giddings SD, Crain S, LeBlanc P, Quilliam MA and McCarron P (2012). CRM-hYTX, a certificate calibration solution for 1-Homoyessotoxin, Biotoxin Metrology Technical Report CRM-hYTX-20111102, National Research Council Canada, Halifax, March 2012.
6. Pauwels J, Lamberty A, Schimmel H (2000). Evaluation of uncertainty of reference materials. *Accred Qual Assur* 5: 95-99.
7. 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.
8. 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](http://www.bipm.org).
9. Tubaro A, Dell'Ovo V, Sosa S, Florio C (2010). Yessotoxins: A toxicological overview. *Toxicon* 56: 163-172.
10. Munday R, Aune T, Rossini GP (2008). Toxicology of the yessotoxins; in Botana LM (Ed) *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, physiology and detection, 2<sup>nd</sup> edition*, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, 329-339.



**Figure 1 :** Spectres de masse SM/SM en mode balayage complet (haut) et dissociation induite par collision (bas) de la hYTX du CRM-hYTX-b analysée avec un spectromètre de masse QExactive-HF. Les données en balayage complet ont été acquises avec une résolution réglée à 120 000 et celles en SM/SM ont été acquises en parallèle en mode de balayage avec la mesure de réactions sélectionnées avec une résolution réglée à 30 000 et une énergie de collision normalisée de 90 V. Données acquises en mode ion négatif avec tension de nébulisation de 2,7 kV, température du capillaire de 350 °C et une température de l'élément chauffant de 250 °C.



**Figure 2 :** Analyse par CPL-SM/SM de la hYTX du CRM-hYTX-b avec la mesure de réactions sélectionnées sur un appareil CPL Agilent 1260 connecté à un SM AB Sciex 4000 QTRAP avec ionisation par électronébulisation. Conditions pour la CPL : colonne Luna C18 (2) 50 × 2 mm d.i., 2,5 µm à +20 °C; 0,3 mL/min d'acétate d'ammonium 5 mM dans A) eau et B) 95 % acétonitrile. Gradient d'élution de 25 % à 75 % de B en 5 min. Conditions du SM (analyse d'ions simplement et doublement chargés) : mode négatif, plage d'énergies de collision de 45 à 102 V; potentialité de défragmentation à 57 V et température de la source de 350 °C.

## Remerciements

Les membres suivants du personnel du CNRC ont contribué à la production et à la certification du CRM-hYTX-b : S. Crain, S.D. Giddings, J.A. Hogenbom, P. LeBlanc, N.I. Lewis, M. MacArthur, P. McCarron, C.O. Miles, E.M. Mudge, R. Perez, C. Rafuse, I. Rajotte, K.L. Reeves, E. Weir et E.J. Wright.

## Le présent document devrait être cité de la manière suivante :

S.D. Giddings, I. Rajotte, P. McCarron "CRM-hYTX-b, a certified calibration solution reference material for 1-Homoyessotoxin", Biotoxin Metrology Technical Report CRM-hYTX-b-20190716, National Research Council Canada, Halifax.

DOI <https://doi.org/10.4224/crm.2020.hytx-b.20190716>

*Date de délivrance : Février 2020*

*Version du document : 20220307*

*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 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](mailto:CRM-MRCHalifax@nrc-cnrc.gc.ca)