



Certificat d'analyse

Matériau de référence certifié

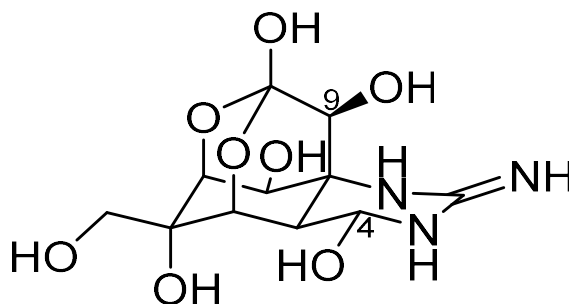
CRM-TTX (Lot n° 20170328)

Solution d'étalonnage certifiée pour la tétrodotoxine

La tétrodotoxine (TTX) est une toxine naturelle associée à des cas d'empoisonnement dus à la consommation d'espèces marines contaminées, notamment le poisson-globe (aussi appelé fugu) [1,2]. Le CRM-TTX du CNRC est une solution d'étalonnage certifiée de TTX dans de l'acide acétique aqueux 1 mM. Il est conçu comme solution pour l'étalonnage d'appareils à des fins d'identification et de dosage de la TTX.

Tableau 1 : Fraction en masse et concentrations certifiées du CRM-TTX.

Composé	µg/g	µg/mL (15-30 °C)	µmol/L (15-30 °C)
Tétrodotoxine (TTX)	6,75 ± 0,24	6,74 ± 0,24	21,10 ± 0,76



Tétrodotoxine

N° CAS : 4368-28-9

InChIKey : CFMYXEVWODSLAX-QOZOJJKESA-N

Formule moléculaire : C₁₁H₁₇N₃O₈

Masse moléculaire : 319,27 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-TTX est une solution d'étalonnage certifiée conçue pour le développement de méthodes d'analyse et le dosage précis de la TTX. La concentration convient à la préparation d'une série de dilutions pour l'étalonnage d'appareils d'analyse, comme 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-TTX, les ampoules devraient être conservées à -12 °C ou moins.

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 solvant aura lieu si la solution est laissée à l'air libre au-delà de quelques minutes. Il est recommandé de ne pas faire évaporer totalement les solutions de ce matériau de référence certifié, en raison d'une décomposition ou de pertes potentielles. *Remarque* : Le volume de la solution n'est pas certifié. En conséquence, il ne faudrait pas simplement transférer le contenu total de l'ampoule dans une fiole jaugée, puis compléter cette dernière.

Préparation du CRM-TTX

La TTX purifiée a été obtenue auprès de Latoxan (Portes-lès-Valence, France). Un m/z mesuré avec précision de 320,1088, correspondant à la masse théorique de $C_{11}H_{18}N_3O_8^+$ ($\Delta = 0$ ppm), et des ions fragments caractéristiques de TTX [2] ont été obtenus pour l'ion $[M+H]^+$ de la TTX au moyen d'un spectromètre de masse haute résolution (figure 1). Les impuretés ont été évaluées par résonance magnétique nucléaire du proton (1H -RMN), chromatographie en phase liquide avec détection de l'azote par chimiluminescence (CPL-DNCL) [3] et CPL-SM. Les analyses ont mis en évidence de petites quantités de produits à l'équilibre de la TTX, 4,9-anhydro-TTX et 4-*épi*-TTX, inférieures à 1 % de la TTX (figure 2). Les concentrations approximatives des analogues individuels sont données à titre d'information dans le tableau 2, en tant que valeurs non certifiées.

La solution de CRM-TTX a été préparée en faisant une dilution précise de la solution mère (RMNq) avec de l'acide acétique dégazé 1 mM. Des aliquotes ont été transférées 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.

Tableau 2 : Valeurs à titre d'information des produits à l'équilibre de la TTX dans le CRM-TTX, mesurées par 1H -RMN.

Composé	Masse moléculaire (g/mol)	Concentration ($\mu\text{g/g}$)*
4,9-anhydro-TTX	301,26	0,04
4- <i>épi</i> -TTX	319,27	0,06

* Ces concentrations ne sont pas certifiées.

Méthodes d'analyse et attribution de valeur

La valeur certifiée pour le CRM-TTX (tableau 1) est basée sur des résultats obtenus au CNRC au moyen de la RMNq [4]. Un matériau de référence certifié provenant de NIST, l'hydrogénophthalate de potassium (NIST SRM 84L), a été utilisé pour l'étalonnage.

Homogénéité

Un nombre représentatif d'ampoules de CRM-TTX a été prélevé parmi toutes les ampoules, et les concentrations relatives de TTX ont été mesurées par CPL-SM. Aucune hétérogénéité n'a été observée.

Stabilité

Des études sur un an (long terme) et sur un mois (transport) ont montré une bonne stabilité du CRM-TTX conservé dans des ampoules scellées à +4 °C ou moins, sans décomposition détectable observée dans les limites d'incertitude de la méthode de CPL-SM. En se basant sur ces résultats, une période de validité d'un an à partir de la date de vente a été établie pour les ampoules conservées à -12 °C ou moins.

Incertainitude

Toutes les sources raisonnables d'erreur liées à la caractérisation du CRM-TTX ont été prises en compte et quantifiées. L'incertitude globale estimée (U_{CRM}) comprend les incertitudes associées à la caractérisation du lot (u_{char}), à l'instabilité lors du stockage (u_{stab}) et à la variation d'une ampoule à l'autre (u_{hom}) [5-8]. Ces éléments sont donnés dans le tableau 3 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).

Les incertitudes sur les concentrations de solution mentionnées dans le tableau 1 ($\mu\text{mol/L}$ et $\mu\text{g/mL}$) comprennent un élément d'incertitude supplémentaire pour la correction de la masse volumique couvrant la gamme de températures de +15 à +30 °C.

Tableau 3 : Éléments d'incertitude pour la valeur certifiée du CRM-TTX.

Incertitude	Relative*
u_{char}	0,011
u_{hom}	négligeable
u_{stab}	0,014

* Relative à la fraction en masse et aux concentrations indiquées dans le tableau 1

Consignes de sécurité

L'ingestion d'une quantité suffisante de TTX peut provoquer une paralysie ou même la mort [9,10]. Seules des personnes qualifiées devraient manipuler cette solution et des méthodes d'élimination appropriées devraient être suivies. Il faudrait porter un équipement de protection personnelle approprié quand on ouvre une ampoule en cas de brisure du verre. Une fiche de données de sécurité (FDS) est disponible pour le CRM-TTX.

Période de validité

Si l'ampoule est conservée non ouverte dans la condition recommandée de -12 °C (ou moins), la concentration certifiée du CRM-TTX 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 de NIST, l'hydrogénophthalate de potassium (NIST SRM 84L).

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

Ce matériel 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. U.S. Department of Health and Human Services. Tetrodotoxin Poisoning Associated With Eating Puffer Fish Transported from Japan - California, 1996. Volume 45: 389-391. Centers for Disease Control and Prevention; Atlanta, GA, USA. *Morbidity and Mortality Weekly Report*.
2. Bane V, Lehane M, Dikshit M, O'Riordan A, Furey A (2014). Tetrodotoxin: Chemistry, Toxicity, Source, Distribution. *Toxins* 6: 693-755.
3. Thomas K, Wechsler D, Chen YM, Crain S, Quilliam MA (2016). Analysis of natural toxins by liquid chromatography-chemiluminescence nitrogen detection and application to the preparation of certified reference materials. *J AOAC Int* 99: 1173-1184.
4. Burton IW, Quilliam MA, Walter JA (2005). Quantitative ^1H NMR with external standards: Use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products. *Anal Chem* 77: 3123-3131.
5. Pauwels J, Lamberty A, Schimmel H (2000). Evaluation of uncertainty of reference materials. *Accred Qual Assur* 5: 95-99.
6. 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.
7. 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.
8. Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM), JCGM 100:2008 (corrected version 2010), www.bipm.org. Printed as ISO/IEC Guide 98-3:2008, ISO Geneva.
9. Abal P, Louzao MC, Antelo A, Alvarez M, Cagide E, Vilariño N, Vieytes MR, Botana LM (2017). Acute Oral Toxicity of Tetrodotoxin in Mice: Determination of Lethal Dose 50 (LD50) and No Observed Adverse Effect Level (NOAEL). Vasconcelos V, ed. *Toxins* 9(3): 75.
10. EFSA CONTAM Panel (Knutsen HK et. al) 2017. Scientific opinion - Risks for public health related to the presence of tetrodotoxin (TTX) and TTX analogues in marine bivalves and gastropods. *EFSA Journal* 15(4): 4752.

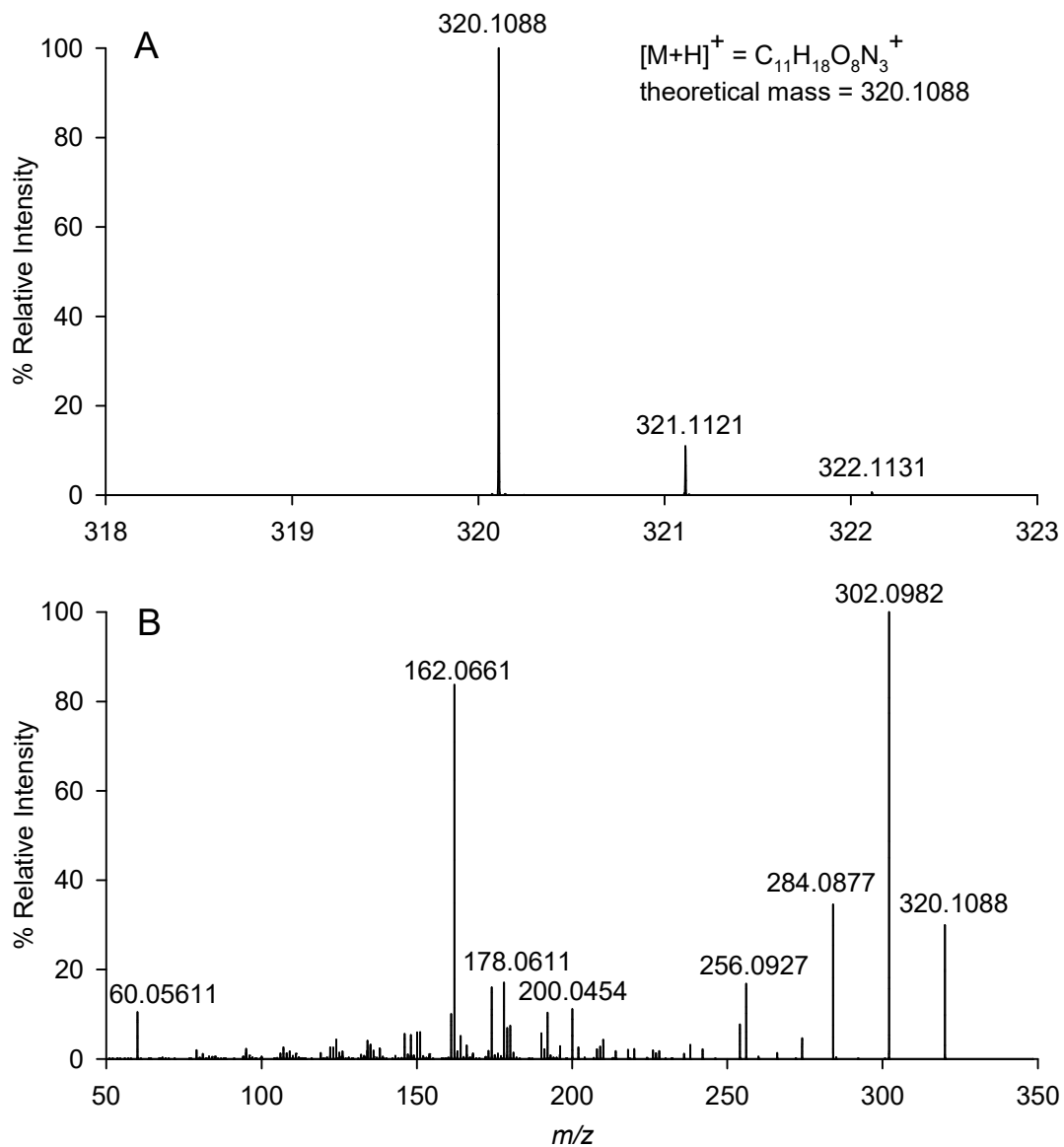


Figure 1 : Spectres de CPL-SMHR en balayage complet (A) et de dissociation induite par collision (SM/SM) (B) de la TTX du CRM-TTX, obtenus avec un spectromètre de masse QExactive-HF. Les données en mode de balayage complet ont été acquises avec une résolution réglée à 120 000, et celles en SM/SM ont 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 57 V.

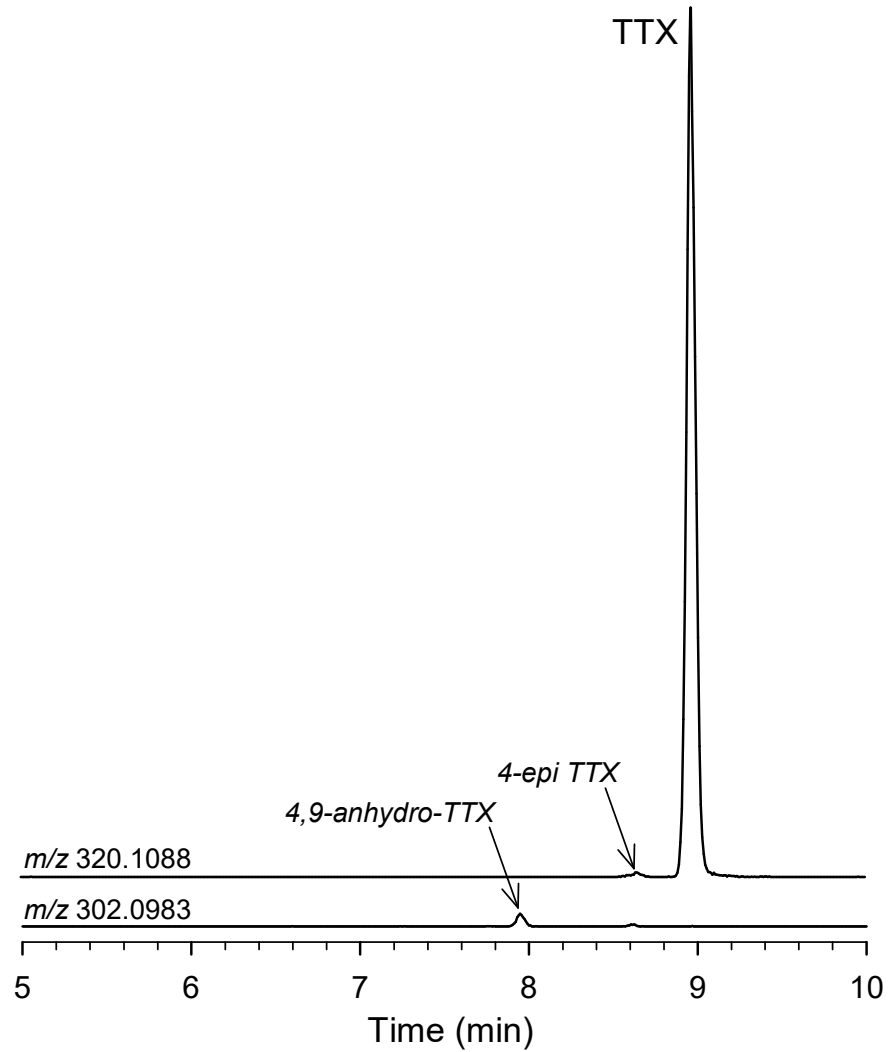


Figure 2 : Analyse par CPL-SMHR du CRM-TTX, avec un CPL Agilent 1200 connecté à un SM QExactive-HF. Conditions pour la CPL : Acquity UPLC BEH Amide (100 mm × 2 mm d.i.) à +35 °C; débit de 0,3 mL/min avec gradient d'élution de 10 % de A (eau) à 75 % de B (95 % acétonitrile) en 10 min, les deux avec du formate d'ammonium 2 mM et de l'acide formique 50 mM.

Remerciements

Les membres suivants du personnel du CNRC ont contribué à la production et à la certification du CRM-TTX : D. Beach, S. Crain, S. Giddings, W. Hardstaff, E. Kerrin, P. LeBlanc, M. MacArthur, P. McCarron, R. Perez, K. Reeves, K. Thomas et E. Wright.

Le présent document devrait être cité de la manière suivante :

D. Beach, R. Perez, E. Kerrin, S. Crain, P. McCarron "CRM-TTX, a certified calibration solution reference material for tetrodotoxin", Biotoxin Metrology Technical Report CRM-TTX-20170328, National Research Council Canada, Halifax.

DOI <https://doi.org/10.4224/crm.2017.ttx.20170328>

Date de délivrance : Juillet 2019

Version du document : 20220221

Date de révision : Octobre 2020 (DOI ajouté), Février 2022 (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, information ou 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-MRCBiotoxin-Biotoxines@nrc-cnrc.gc.ca