# **Certificat d'analyse**

# CNRC·NRC

Matériau de référence certifié

# CRM-FDMT1 (lot numéro 20070717)

Matériau de référence certifié de tissu de moule lyophilisé pour de multiples toxines marines

Les toxines algales marines peuvent s'accumuler dans les mollusques et crustacés filtreurs à des concentrations dangereuses pour la santé humaine. Il est nécessaire d'en surveiller la présence pour protéger les consommateurs et l'industrie des fruits de mer [1,2]. Le CRM-FDMT1 est un tissu de moule lyophilisé (*Mytilus edulis*) contenant des toxines de six groupes importants de toxines de mollusques et crustacés. Il a été préparé en mélangeant des tissus de moules contaminés et le fortifiant avec des algues cultivées et des toxines purifiées [3]. Des valeurs certifiées et des incertitudes totales ( $U_{CRM}$ ) ont été établies pour ce qui suit : acide domoïque, azaspiracide-1, -2 et -3, acide okadaïque, dinophysistoxine-1 et -2, yessotoxine, pecténotoxine-2 et 13-déméthylspirolide C (tableaux 1 et 2). Des valeurs à titre d'information ont également été attribuées à un certain nombre d'analytes supplémentaires provenant de chaque groupe de toxines (tableaux 4 et 5).

Composé	Concentration <sup>1</sup> (mg/kg)
Acide domoïque (AD + 5'- <i>épi</i> -AD)	126 ± 10
Azaspiracide-1 (AZA1 + 37- <i>épi</i> -AZA1)	4,10 ± 0,40
Azaspiracide-2 (AZA2 + 37- <i>épi</i> -AZA2)	1,13 ± 0,10
Azaspiracide-3 (AZA3 + 37- <i>épi</i> -AZA3)	0,96 ± 0,10
Acide okadaïque (AO)	1,59 ± 0,18
Dinophysistoxine-1 (DTX1)	0,68 ± 0,07
Dinophysistoxine-2 (DTX2)	3,57 ± 0,33
Yessotoxine (YTX)	2,49 ± 0,28
Pecténotoxine-2 (PTX2)	0,66 ± 0,06
13-déméthylspirolide C (13-déMé-SPX C)	2,70 ± 0,26

Tableau 1 : Valeurs de concentrations certifiées et incertitudes associées pour le CRM-FDMT1.

<sup>1</sup> Les valeurs certifiées sont fondées sur la masse de la poudre lyophilisée telle qu'elle est reçue.

Période de validité : 3 ans à partir de la date de vente Conditions de stockage : -12 °C ou moins





# CRM-FDMT1

# Tableau 2 : Renseignements sur les toxines avec des valeurs certifiées pour le CRM-FDMT1.

Acide domoïque : C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>6</sub> Nº CAS : 14277-97-5 Masse moléculaire : 311,3 Masse monoisotopique : 311,1369	ноос
<b>Azaspiracide-1</b> : C <sub>47</sub> H <sub>71</sub> NO <sub>12</sub> N° CAS : 214899-21-5 Masse moléculaire : 842,1 Masse monoisotopique : 841,4976	
<b>Azaspiracide-2</b> : C <sub>48</sub> H <sub>73</sub> NO <sub>12</sub> Nº CAS : 265996-92-7 Masse moléculaire : 856,1 Masse monoisotopique : 855,5133	
<b>Azaspiracide-3</b> : C46H69NO12 Nº CAS : 265996-93-8 Masse moléculaire : 828,0 Masse monoisotopique : 827,4820	
Acide okadaïque : C44H68O13 Nº CAS : 78111-17-8 Masse moléculaire : 805,0 Masse monoisotopique : 804,4660	
Dinophysistoxine-1 : C <sub>45</sub> H <sub>70</sub> O <sub>13</sub> N° CAS : 81720-10-7 Masse moléculaire : 819,0 Masse monoisotopique : 818,4816	
<b>Dinophysistoxine-2</b> : C <sub>44</sub> H <sub>68</sub> O <sub>13</sub> N° CAS : 139933-46-3 Masse moléculaire : 805,0 Masse monoisotopique : 804,4660	
<b>Yessotoxine</b> : C <sub>55</sub> H <sub>82</sub> O <sub>21</sub> S <sub>2</sub> Nº CAS : 112514-54-2 Masse moléculaire : 1143,4 Masse monoisotopique : 1142,4790	
Pecténotoxine-2 : C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> O <sub>14</sub> N° CAS : 97564-91-5 Masse moléculaire : 859,1 Masse monoisotopique : 858,4766	
<b>13-déméthylspirolide C</b> : C <sub>42</sub> H <sub>61</sub> NO <sub>7</sub> N° CAS : 334974-07-1 Masse moléculaire : 691,9 Masse monoisotopique : 691,4448	HOW ON HOLE





Conseil national de Research recherches Canada Council Canada

# Utilisation prévue

Le CRM-FDMT1 est un MRC à matrice conçu pour tester la précision des méthodes d'analyse entières. Le MRC contient de nombreuses toxines de mollusques et crustacés qui sont réglementées dans les programmes de surveillance des biotoxines. La grande variété d'analytes dans ce matériau (des valeurs certifiées et des incertitudes ont été associées à certains, tandis que d'autres ont des valeurs à titre d'information) fait du CRM-FDMT1 un matériau de valeur pour développer des procédures efficaces d'extraction des échantillons, pour optimiser les méthodes de séparation et de détection et pour la mesure de justesse dans le contrôle de la qualité routine.

# Instructions pour l'entreposage et l'utilisation

Les flacons scellés de CRM-FDMT1 devraient être stockés dans le congélateur (≤ -12 °C) pour assurer la stabilité entre les sous-échantillonnages. Après avoir prélevé le montant désiré, les flacons doivent être de nouveau scellés, sous gaz inerte (azote ou argon) à l'aide du bouchon de caoutchouc et d'une capsule à sertir ou de la pellicule plastique de laboratoire, et doivent être immédiatement remis au congélateur.

Nous recommandons une taille minimale de sous-échantillon de 0,35 g, qui est l'équivalent d'environ 2 g de tissu humide après reconstitution [4]. Pour reconstituer la quantité de 0,35 g de CRM-FDMT1, un volume de 1,65 mL d'eau désionisée doit être ajouté puis le tout agité au vortex pendant 30 secondes; l'échantillon doit ensuite subir une sonication pendant 60 secondes [5,6]. Veuillez noter : Les valeurs certifiées pour le CRM-FDMT1 sont liées au matériau de référence certifié tel qu'il est reçu et non aux concentrations observées sur une base de masse complètement sèche. Il est de la plus haute importance que toutes les précautions soient prises pour éviter les changements dans le taux d'humidité de la poudre lyophilisée, car les changements pourraient avoir un impact considérable sur les concentrations mesurées en comparaison aux valeurs certifiées.

### Préparation de la matrice du MRC

La planification et la préparation du CRM-FDMT1 ont été décrites en détail [3]. Brièvement, un homogénat trempe initial a été produit en combinant divers tissus de mollusques et crustacés naturellement contaminés avec des matériaux de toxines purifiées ou semi-purifiées. Les toxines AZA, AO, DTX1, DTX2 et AD étaient présentes dans des moules contaminées naturellement (Mytilus edulis), qui ont été homogénéisées puis passées à l'autoclave pour réduire l'activité enzymatique et pour stabiliser le profil de toxines [7,8]. Le PTX2 a été obtenu principalement à partir d'un extrait d'algue (Dinophysis spp.) [9]. La toxine YTX a été obtenue en tant que sel disodique purifié à partir d'une culture d'algues [10]. Le 13-déMé-SPX C [11] a été ajouté à l'aide d'une culture d'Alexandrium ostenfeldii. Des stabilisants (éthoxyquine, ampicilline, oxytétracycline et érythromycine) ont été ajoutés à l'homogénat trempe en vrac [12]. Le matériau a été bien mélangé au Marine Institute (Galway, Irlande) avant d'être envoyé à l'Institut des matériaux et mesures de référence (Geel, Belgique) aux fins de lyophilisation et de remplissage des flacons. Le tissu lyophilisé a été soumis à un broyage cryogénique et à un tamisage à travers une grille maillée de 250 µm, avant d'être une fois de plus homogénéisé sous forme de poudre sèche. La poudre a été distribuée par portions de 3 g dans des flacons en verre ambré de 30 mL sous azote sec et scellés à l'aide de bouchons de caoutchouc et de capsules à sertir.

### Méthodes d'analyse et attribution des valeurs

Les méthodes d'extraction et de CL-SM ont été optimisées pour des groupes spécifiques de toxines dans le CRM-FDMT1 afin d'atteindre les plus hauts niveaux d'exactitude. Des valeurs certifiées (tableau 1) ont été attribuées à l'aide de deux approches d'analyse indépendantes. Des flacons de CRM-FDMT1 couvrant la série de remplissage ont été choisis aux fins de certification. Les échantillons







ont été extraits à l'aide de procédures d'extraction liquide-solide (ELS) ou de dispersion complète en phase à matrice solide (DPMS). Les extraits ont été quantifiés par analyse CL-SM soit à l'aide d'étalonnage apparié à la matrice ou par des additions connues d'un étalon [4]. Lorsque la réponse à l'analyse CL-SM était suffisante, les extraits ont été dilués pour éliminer les effets de la matrice, ce qui permet une détermination directe à l'aide de solutions étalons préparées dans du solvant pur. Toutes les solutions d'étalonnage et les solutions pour les additions connues ont été préparées à partir des matériaux de référence certifiés (MRC) fournis par le Conseil national de recherches du Canada (CNRC), Science des mesures et étalons.

# Acide domoïque

Les échantillons ont été extraits à l'aide d'une procédure par ELS (méthanol/eau, 1:1/v:v). Les extraits ont été quantifiés par CL-UV et par CL-SM (figure 1). Aucuns effets de matrice significatifs n'ont été détectés lors de l'analyse de l'AD par CL-SM dans les conditions utilisées. La valeur certifiée a été attribuée en tant que somme de l'AD et de l'épi-AD dans le CRM-FDMT1, à partir de la moyenne des déterminations effectuées par CL-UV et CL-SM.

# Azaspiracides

Des échantillons ont été extraits à l'aide de procédures d'ELS (méthanol à 100 %) et de DPMS (méthanol à 100 %). Des additions connues d'un étalon ont été effectuées pour compenser les effets de la matrice dans l'analyse des échantillons d'ELS par CL-SM. Une procédure d'étalonnage apparié à la matrice a été utilisée pour quantifier les extraits de la procédure DPMS. Ce dernier a été effectué en dopant les MRC étalons dans un extrait de tissus de moules « blanc » (CRM-Zero-Mus) préparé en suivant la même méthode de DPMS utilisée pour le CRM-FDMT1. Les niveaux certifiés d'AZA1, AZA2 et AZA3 constituent la moyenne des données obtenues par ELS-additions connues d'un étalon et DPMS-étalonnage apparié à la matrice. Ils ont été calculés pour chaque analogue en tant que somme du pic principal et du pic d'un isomère structurel [4] (figure 2). Ils ont été identifiés en tant qu'épimères 37 des analogues d'AZA respectifs [13]; par ailleurs, il convient de noter que dans certaines conditions de séparation, les épimères ne sont pas résolus [4]. Des facteurs de réponse équimolaires ont été utilisés lors de la combinaison des surfaces des pics de l'AZA principal et de son isomère.

### Acide okadaïque et dinophysistoxines

Des échantillons ont été extraits à l'aide de procédures d'ELS (méthanol à 100 %) et de DPMS (méthanol à 100 %). Des additions connues d'un étalon ont été effectuées pour compenser les effets de la matrice. Des solutions de dopage indépendantes ont été préparées pour l'addition connue d'étalons pour les extraits d'ELS et de DPMS. Les échantillons ont été analysés par CL–SM (figure 3) et les résultats moyens ont été utilisés afin d'attribuer des concentrations certifiées pour les acides libres d'AO, DTX1 et DTX2.

# Yessotoxine et pecténotoxine-2

Des échantillons ont été extraits à l'aide de procédures d'ELS (méthanol/eau, 90:10) et de DPMS (méthanol/eau, 80:20). Des additions connues d'un étalon ont été effectuées pour compenser les effets de la matrice dans l'analyse par CL-SM et des solutions de dopage indépendantes ont été utilisées pour les extraits issus de l'ELS et de DPMS. La toxine YTX a été suivie en mode d'ions négatifs et le PTX2 a été analysé en mode d'ions positifs (figure 4). Des valeurs certifiées pour l'YTX et le PTX2 sont un moyen des resultats obtenus à partir des expériences avec additions connues d'étalons menées sur les extraits issus de l'ELS et de DPMS.





# 13-Déméthylspirolide C

Des échantillons ont été extraits à l'aide de procédures d'ELS (méthanol à 100 %) et de DPMS (méthanol à 100 %). Afin d'éliminer les effets de la matrice, des dilutions 1:15 des extraits ont été préparées pour l'analyse par CL-SM [4]. Cette démarche a été facilitée par la concentration relativement élevée de 13-déMé-SPX C et par la réponse importante à l'analyse SM pour cet analyte. Les extraits dilués ont été quantifiés directement par rapport au CRM-SPX1. La valeur certifiée pour le 13-déMé-SPX C dans le CRM-FDMT1 a été attribuée en tant que moyenne des résultats de l'ELS et de DPMS.

# Homogénéité

L'homogénéité d'un flacon à l'autre des toxines lipophiles dans le CRM-FDMT1 a été évaluée par échantillonnage aléatoire stratifié de flacons provenant de à travers la série de remplissage (n = 20) [5,14]. L'homogénéité du CRM-FDMT1 dans un même flacon a été évaluée en utilisant l'AD en tant qu'analyte modèle. Huit flacons ont été choisis pour représenter la série complète de remplissage, en prélevant quatre sous-échantillons dans chaque flacon [5]. Des aliquotes de tailles différentes ont été analysées pour déterminer la quantité minimale de l'échantillon requis pour garantir des souséchantillons représentatifs. D'après ces résultats, une dose minimale d'échantillon de 0,35 g est recommandée lorsque l'on utilise le CRM-FDMT1 [5]. Les contributions des incertitudes découlant d'essais relatifs à l'homogénéité des divers analogues sont incluses dans le bilan des incertitudes totales pour le CRM-FDMT1 (tableau 3).

# Étude sur la stabilité

Des études sur la stabilité à court et long termes ont été réalisées sur le CRM-FDMT1. Des études sur la stabilité à court terme ont démontré que les analytes certifiés sont stables dans les conditions d'expédition utilisées par Métrologie des biotoxines du CNRC. La stabilité à long terme a été évaluée à -20 °C, +4 °C et +18 °C et aucune dégradation n'a été observée pendant une période d'un an, quelle que soient les conditions. Au moyen de l'erreur-type de la pente à -20 °C au cours d'une période de trois ans, on a déterminé l'incertitude associée à la stabilité à long terme ( $u_{ts}$ ) afin de l'utiliser lors du calcul de l'incertitude combinée finale (tableau 3). Le suivi de la stabilité du CRM-FDMT1 est encore en cours [15].

La teneur en eau du CRM-FDMT1 a été mesurée à l'aide d'une méthode validée de titrage Karl Fischer qui a donné un résultat de 3,9 % (m/m) ± 0,6. D'après les vérifications, la teneur en eau du matériau est stable après trois ans de stockage dans les conditions recommandées. Les flacons qui ont été ouverts, échantillonnés, de nouveau scellés et stockés conformément aux consignes susmentionnées ont maintenu des niveaux d'humidité stables pendant cette période.

### Incertitude

Toutes les contributions significatives d'incertitudes liées à la caractérisation du CRM-FDMT1 sont décrites en détail ailleurs [16]. L'estimation de l'incertitude globale ( $U_{CRM}$ ) comprend des incertitudes associées à la caractérisation du lot  $(u_{char})$ , à l'aide des deux méthodes d'analyse, à la variation d'un flacon à l'autre ( $u_{hom}$ ) et à l'incertitude associée au stockage à long terme ( $u_{stab}$ ) [17]. 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 % (k = 2).



National Research



Composé	<b>U</b> caractérisation	<b>U</b> homogénéité	Ustabilité	Incertitude combinée (k = 2)
AD + 5'- <i>épi</i> -AD	1,7	0,9	4,4	10,0
AZA1 + 37-épi-AZA1	0,10	0,05	0,17	0,40
AZA2 + 37-épi-AZA2	0,03	0,01	0,04	0,10
AZA3 + 37-épi-AZA3	0,02	0,03	0,04	0,10
AO	0,04	0,02	0,08	0,18
DTX1	0,02	0,01	0,03	0,07
DTX2	0,07	0,05	0,14	0,33
YTX	0,06	0,10	0,08	0,28
PTX2	0,01	0,02	0,02	0,06
13-déMé-SPX C	0,06	0,10	0,05	0,26

Tableau 3 : Bilan d'incertitude pour les valeurs certifiées du CRM-FDMT1.

# Caractérisation d'autres toxines présentes dans le CRM-FDMT1

Le CRM-FDMT1 a été préparé en utilisant des tissus naturellement contaminés et contient donc divers analogues supplémentaires provenant des différents groupes de toxines. Le CRM-FDMT1 a été examiné et des concentrations indicatives ont été attribuées pour un certain nombre d'analogues non certifiés (tableaux 4 et 5). *Veuillez noter :* Ces concentrations ne sont pas certifiées et sont fournies à titre informatif. En l'absence d'étalons individuels pour ces diverses toxines, des réponses équimolaires et des efficacités d'extraction égales ont été présumées pour les analogues des catégories spécifiques. Le profil des toxines du CRM-FDMT1 a également été caractérisé en profondeur par chromatographie liquide–spectrométrie de masse à haute résolution [18].

# Esters acyliques du groupe de toxines de l'acide okadaïque

Il y a des concentrations significatives de divers esters acyliques d'acides gras d'AO, de DTX1 et de DTX2 dans le CRM-FDMT1. Une procédure d'hydrolyse basique [19] a été utilisée pour déterminer indirectement les niveaux d'esters acyliques en utilisant les conditions d'extraction et de CL–SM appliquées pour la certification de l'AO et des DTX. Les niveaux d'AO, de DXT1 et de DXT2 ont augmenté d'environ 20 à 60 % à la suite de l'hydrolyse basique (tableau 4).

Analogue parent	Avant l'hydrolyse (mg/kg) <sup>1</sup>	Après l'hydrolyse (mg/kg)²	Estérifié (%)
AO	1,59	3,91	59
DTX1	0,68	0,85	20
DTX2	3,57	5,41	34

**Tableau 4 :** Niveaux d'esters acyliques du groupe acide okadaïque dans le CRM-FDMT1.

<sup>1</sup> Valeurs certifiées (tableau 1); <sup>2</sup> Les valeurs totales (incluant les esters) ne sont pas certifiées.





# Isomères de l'acide domoïque

L'analyse a été effectuée par CL (Agilent 1100) et SM (AB Sciex 4000 à triple quadripôle), colonne : Luna C18(2), 100 × 2,0 mm, 2,5 µm; phase mobile : eau (A) et acétonitrile (B) contenant chacun 0,1 % d'acide formique; de 5 à 20 % de B en 30 min; 200 µL/min à +35 °C; injection 0,5 µL. Le CRM-FDMT1 contient des formes isomériques d'AD en raison des traitements thermiques utilisés dans les étapes de préparation préliminaire [3,19] (tableau 5). Des solutions d'étalonnage précises ne sont pas disponibles pour les isomères. Ainsi les concentrations ont été estimées en assumant que leurs réponses en SM (mode de détection d'ions sélectionnés, SIM) étaient égales à celle du 5'-épi-AD.

# Azaspiracides

Les conditions utilisées étaient comme décrites pour la certification des AZA1–3, mais le gradient a été prolongé à 12 min pour parvenir à une meilleure séparation. Divers analogues d'AZA sont présents dans le CRM-FDMT1, ce qui correspond avec la littérature qui décrit en détail la complexité de ce groupe de toxines [20]. Les analogues détectés des AZA (tableau 4) ont été quantifiés par rapport à la valeur certifiée de l'AZA1 + 37-épi-AZA1 dans le CRM-FDMT1, en assumant une réponse équimolaire pendant les transitions en mode de réactions sélectionnées avec perte d'eau. Outre les AZA rapportées dans le tableau 5, divers analogues d'AZA supplémentaires et des isomères ont été détectés à des niveaux de traces (données non présentées).

# Pecténotoxines

Les analogues de PTX ont été examinés par CL avec un système Agilent 1260 couplé à un SM, AB Sciex QTRAP 5500, colonne : Halo C18, 50 x 2,1 mm, 2,7 µm; phase mobile binaire : eau (A) et 95 % d'acétonitrile (B) contenant chacun 5 mM de acétate d'ammonium; 60 - 100 % de B en 30 min, 300 µL/min à +20 °C; volume injecté : 2 µL. Le PTX2 séco acide (PTX2sa) et le 7-épi-PTX2sa ont été détectés dans le CRM-FDMT1, ainsi qu'un certain nombre d'isomères du PTX2 à des niveaux de traces (figure 4). Le PTX2sa et le 7-épi-PTX2sa ont été quantifiés à l'aide d'un étalon maison pour le PTX2sa, assumant des réponses équimolaires.

### Yessotoxines

Les conditions étaient les mêmes que celles décrites pour la certification de la YTX (figure 4). Bien que la toxine YTX ait été ajoutée au CRM-FDMT1 en tant que toxine purifiée, il a été déterminé que certains des tissus utilisés dans la préparation avaient de faibles niveaux d'autres analogues divers d'YTX. La valeur certifiée de la toxine YTX dans le CRM-FDMT1 a été utilisée pour quantifier les niveaux des analogues d'YTX, assumant des réponses équimolaires (tableau 5).

### Imines cycliques

Les extraits de CRM-FDMT1 ont été examinés en mode de réactions sélectionnées pour déceler les spirolides, les pinnatoxines (PnTX) et les gymnodimines par CL avec un Agilent 1260 couplé à un SM, AB Sciex QTRAP 5500, colonne : KBDS Hypersil C8, 150 x 2 mm, 3 µm; phase mobile : eau (A) et 95 % d'acétonitrile (B), contenant chacun 50 mM d'acide formique et 2 mM de formate d'ammonium; gradient : 25-55 % de B en 10 min, 200 µL/min à +20 °C; volume injecté : 5 µL (figure 5). La valeur certifiée pour le 13-déMé-SPX C dans le CRM-FDMT1 a été utilisée aux fins de quantification des analogues des spirolides en assumant des réponses équimolaires. La Pinnatoxine G (PnTX-G) a été quantifié à l'aide du CRM-PnTX-G (tableau 5).



National Research



Tableau 5 : Valeurs à titre d'information pour des analogues de toxines sélectionnées dans le CRM-FDMT1.

Composé	[M+H]⁺	Temps de rétention relatif (TRR) (relatif à l'AD)	Concentration (mg/kg)
Acide isodomoïque E	312,1	0,83	3
Acide isodomoïque D	312,1	0,85	8
Acide isodomoïque A	312,1	0,92	6
Acide domoïque	312,1	1,00	124
Acide C5'- <i>épi</i> -domoïque	312,1	1,06	2
Composé	[M+H]⁺	TRR (relatif à l'AZA1)	Concentration (mg/kg)
AZA4	844,5	0,72	0,42
AZA9	858,5	0,75	0,11
AZA5	844,5	0,76	0,06
AZA7	858,5	0,78	0,06
AZA8	858,5	0,81	0,09
AZA10	858,5	0,82	0,03
AZA3	828,5	0,90	0,89
37-épi-AZA3	828,5	0,94	0,07
AZA6	842,5	0,96	0,19
AZA1	842,5	1,00	3,83
AZA2	856,5	1,06	1,05
37-épi-AZA1	842,5	1,09	0,27
37-épi-AZA2	856,5	1,18	0,08
Composé	[M-H] <sup>-</sup>	TRR (relatif à l'YTX)	Concentration (mg/kg)
COOH-YTX	1173,5	0,72	0,29
45-OH-YTX	1157,5	0,87	0,56
Composé	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	TRR (relatif à la PTX2)	Concentration (mg/kg)
PTX2sa	894,5	0,67	0,68
7 <i>-épi</i> -PTX2sa	894,5	0,72	1,04
Composé	[M+H]⁺	TRR (relatif au 13-déMé-SPX C)	Concentration (mg/kg)
Isomère de 13-déMé-SPX C	692,5	0,99	0,05
SPX C	706,5	1,01	0,11
13-déMé-SPX D	694,5	1,04	0,11
20-Mé-SPX G	706,5	1,09	0,04
PnTX-G	694,5	1,24	0,02





# Consignes de sécurité

Le CRM-FDMT1 contient une variété de biotoxines marines qui peuvent provoquer des maladies gastro-intestinales et des maux de tête si elles sont ingérées en quantités suffisantes. Seules des personnes qualifiées devraient manipuler ce matériau en utilisant un équipement de protection adéquat. Des moyens appropriés d'élimination devraient être utilisés pour les extraits d'échantillons. Une fiche de données de sécurité (FDS) est disponible pour le CRM-FDMT1.

#### Période de validité

S'il est entreposé non ouvert dans les conditions recommandées, les concentrations certifiées du CRM-FDMT1 sont valides pour 3 ans 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 par gravimétrie.

# Système qualité (ISO/CEI 17025, Guide ISO 34)

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

Le système qualité de SME, à l'appui des aptitudes en matière de mesures et d'étalonnages du CNRC énumérées dans la base de données sur les comparaisons clés du Bureau international des poids et mesures (BIPM) (<u>http://kcdb.bipm.org/default\_fr.asp</u>), 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

- 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
- Anonymous (2011). Commission Regulation (EU) No 15/2011 of 10 January 2011 amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards recognised testing methods for detecting marine biotoxins in live bivalve molluscs. Off J Eur Union L006 of 11 January 2011: 3-6
- 3. McCarron P, Emteborg H, Nulty C, Rundberget T, Loader JI, Teipel K, Miles CO, Quilliam MA, Hess P (2011). A mussel tissue certified reference material for multiple phycotoxins. Part 1: design and preparation. *Anal Bioanal Chem* 400:821-833.
- 4. McCarron P, Giddings SD, Quilliam MA (2011). A mussel tissue certified reference material for multiple phycotoxins. Part 2: liquid chromatography–mass spectrometry, sample extraction and quantitation procedures. *Anal Bioanal Chem* 400:835-846.
- 5. McCarron P, Emteborg H, Giddings SD, Wright E, Quilliam MA (2011). A mussel tissue certified reference material for multiple phycotoxins. Part 3: homogeneity and stability. *Anal Bioanal Chem* 400:847-858.
- 6. McCarron P, Emteborg H, Hess P (2007). Freeze-drying for the stabilisation of shellfish toxins in mussel tissue (*Mytilus edulis*) reference materials. *Anal Bioanal Chem* 387:2475-2486.





- 7. Suzuki T, Mackenzie L, Stirling D, Adamson J (2001). Pectenotoxin-2 seco acid: a toxin converted from pectenotoxin-2 by the New Zealand Greenshell mussel, Perna canaliculus. Toxicon 39:507-514.
- 8. McCarron P, Giddings SD, Reeves KL, Hess P, Quilliam MA (2015). A mussel (Mytilus edulis) tissue certified reference material for the marine biotoxins azaspiracids. Anal Bioanal Chem 407:2985-2996.
- 9. Rundberget T, Sandvik M, Larsen K, Pizarro G, Reguera B, Castberg T, Gustad E, Loader J, Rise F, Wilkins A, Miles CO (2007). Extraction of microalgal toxins by large-scale pumping of seawater in Spain and Norway, and isolation of okadaic acid and dinophysistoxin-2. Toxicon 50:960-970.
- 10. Loader JI, Hawkes AD, Beuzenberg V, Jensen DJ, Cooney JM, Wilkins AL, Fitzgerald JM, Briggs LR, Miles CO (2007). Convenient large-scale purification of yessotoxin from Protoceratium reticulatum culture and isolation of novel furanoyessotoxin. J Agric Food Chem 55:11093-11100.
- 11. Cembella A, Lewis N, Quilliam MA (2000). The marine dinoflagellate Alexandrium ostenfeldii (Dinophyceae) as the causative organism of spirolides shellfish toxins. *Phycologia* 39:67-74.
- 12. 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.
- 13. Kilcoyne J, McCarron P, Twiner MJ, Nulty C, Crain S, Quilliam MA, Rise F, Wilkins AL, Miles CO (2014). Epimers of azaspiracids: isolation, structural elucidation, relative LC-MS response, and in vitro toxicity of 37-epi-azaspiracid-1. Chem Res Toxicol 27:587-600.
- 14. Linsinger TPJ, Pauwels J, Van der Veen AMH, Schimmel H, Lamberty A (2001). Homogeneity and stability of reference materials. Accred Qual Assur 6:20-25.
- 15. ISO-guide-35 (2006) Reference materials general statistics and principles for certification. REMCO.
- 16. McCarron P, Wright E, Emteborg H, Quilliam MA (2017). A mussel tissue certified reference material for multiple phycotoxins. Part 4: certification. Anal Bioanal Chem 409:95-106.
- 17. Pauwels J, Lamberty A, Schimmel H (2000). Evaluation of uncertainty of reference materials. Accred Qual Assur 5:95-99.
- 18. Wright EJ, McCarron P (2021). A mussel tissue certified reference material for multiple phycotoxins. Part 5: profiling by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 413:2055-2069.
- 19. McCarron P, Wright E, Quilliam MA (2014). Liquid chromatography-mass spectrometry of domoic acid and lipophilic shellfish toxins with selected reaction monitoring and optional confirmation by library searching of product ion spectra. J AOAC Int 97:316-324.
- 20. Quilliam MA, Sim PG, McCulloch AW, McInnes AG (1989). High performance liquid chromatography of domoic acid, a marine neurotoxin, with application to shellfish and plankton. Int J Environ Anal Chem 36:139-154.
- 21. Hess P, McCarron P, Krock B, Kilcoyne J, Miles CO (2014) Azaspiracids: chemistry, biosynthesis, metabolism, and detection. In: Botana LM (Ed) Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection, 3rd Edition. 3rd. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp 799-823





Canada



Figure 1 : Analyses de l'AD dans le CRM-FDMT1 par CL-UV (A) et CL-SM/SM (B). Conditions pour la CL-UV : CL Agilent 1100; longueur d'onde : 242 nm; colonne : Luna C18 (150 × 4,6 mm, 3 µm) à +35 °C; phase mobile : 10 % d'acétonitrile et 0,1 % d'acide trifluoroacétique dans l'eau; débit : 0,9 mL/min; volume injecté : 10 µL. Conditions pour la CL-SM : CL Agilent 1100 et SM AB Sciex API4000 à triple quadripôle opéré en mode positif avec la mesure de réactions sélectionnées (312 > 266); énergie de collision : 25 V; potentialité de défragmentation : 50 V; colonne : Luna C18 (150 × 4,6 mm, 3 µm) à +35 °C; phase mobile : 10 % d'acétonitrile et 0,1 % d'acide formique dans l'eau; débit : 0,9 mL/min; volume injecté : 5 µL.



National Research Council Canada



Figure 2 : Analyse CL–SM/SM du CRM-FDMT1 pour les AZA. Conditions : CL Agilent 1200 et SM AB Sciex QTRAP 4000; énergie de collision : 70 V; potentialité de défragmentation : 50 V; colonne : Luna C18(2) (50 × 2 mm, 2,5 µm) à +15 °C; phase mobile binaire : 5 mM acétate d'ammonium dans l'eau à un pH de 7 (A) et dans 95 % d'acétonitrile (B); gradient : 25– 100 % de B en 5 min; débit : 0,35 mL/min; volume injecté : 5 µL. Les surfaces de pic pour les épimères des AZA-1, -2 et -3 sont combinées avec celles des pics principaux pour obtenir les valeurs certifiées. L'AZA6 n'est pas certifié. Les pics d'élution dans les traces d'AZA3 et d'AZA6 (\*) sont des produits de dégradation des AZA découlant de la stérilisation thermique du CRM-FDMT1 [5].







Figure 3 : Analyse CL–SM/SM du CRM-FDMT1 pour l'AO, le DTX2 et le DTX1. Conditions : CL Agilent 1200 et SM AB Sciex QTRAP 4000; énergie de collision : – 65 V (AO/DTX2) et – 70 V (DTX1); potentialité de défragmentation : – 80 V (AO/DTX2) et – 70 V (DTX1); colonne : Luna C18(2) (50 × 2 mm, 2,5 µm) à +20 °C; phase mobile binaire : 50 mM d'acide formique, 2 mM de formate d'ammonium dans l'eau (A) et dans 95 % d'acétonitrile (B); gradient : 25–100 % de B en 8 min; débit : 0,25 mL/min; volume injecté : 5 µL. Les pics d'isomères indiqués de l'AO et du DTX2 (\*) ne sont pas inclus dans les valeurs certifiées.



National Research Council Canada





Figure 4 : Analyse CL–SM/SM du CRM-FDMT1 pour les toxines YTX, 45-OH-YTX et PTX2. L'analyse a été réalisée en deux périodes successives, avec une période d'ionisation négative pour les YTX (2 à 4,8 minutes), suivie d'une période d'ionisation positive pour le PTX2 (de 4,8 à 7 minutes). Conditions : CL Agilent 1200 et SM AB Sciex QTRAP 4000; énergie de collision : – 55 V (YTX) et 35 V (PTX2); potentialité de défragmentation : – 80 V (YTX) et 60 V (PTX2); colonne : Synergi MaxRP C12 (50 × 2 mm, 2,5 µm) à +20 °C; phase mobile binaire : 5 mM d'acétate d'ammonium dans l'eau à un pH de 7 (A) et dans 95 % d'acétonitrile (B); gradient : 25–100 % de B en 5 min; débit : 0,3 mL/min; volume injecté : 5 µL. Les isomères de PTX2 (\*) et 45-OH-YTX ne sont pas certifiés.







Figure 5 : Analyse CL–SM/SM du CRM-FDMT1 pour le 13-déMé-SPX C. Conditions : CL Agilent 1200 et SM AB Sciex 5500 QTRAP; énergie de collision : 70 V; potentialité de défragmentation : 75 V; colonne : KBDS Hypersil C8 (150 × 2 mm, 3 µm) à +20 °C; phase mobile binaire : 50 mM acide formique, 2mM formate d'ammonium dans l'eau (A) et dans 95 % d'acétonitrile (B); gradient : 25–55 % de B en 10 min, maintien 10 min; débit : 0,2 mL/min; volume injecté : 5 µL. Les isomères des SPX sont représentés avec des astérisques (\*).





# Remerciements

Les membres suivants du personnel de Science des mesures et étalons au CNRC ont contribué à la production et à la certification du CRM-FDMT1 du CNRC : S.D. Giddings, P. McCarron, R. Perez, M.A. Quilliam, K.L. Reeves et E. Wright.

Le CRM-FDMT1 du CNRC est le résultat d'une collaboration internationale incluant le Centre commun de recherche de la Commission européenne, l'Institut des matériaux et mesures de référence<sup>1</sup> (Geel, Belgique), le Marine Institute<sup>2</sup> (Galway, Irlande), le Norwegian Veterinary Institute<sup>3</sup> (Oslo, Norvège) et AgResearch Ltd.<sup>4</sup> (Hamilton, Nouvelle-Zélande).

Les chercheurs collaborateurs étaient : H. Emteborg<sup>1</sup>, K. Teipel<sup>1</sup>, C. Nulty<sup>2</sup>, P. Hess<sup>2</sup>, T. Rundberget<sup>3</sup>, J.I. Loader<sup>4</sup> et C.O. Miles<sup>4</sup>.

### Le présent document devrait être cité comme suit :

E. Wright, K.L. Reeves, S.D. Giddings, M.A. Quilliam, P. McCarron, "CRM-FDMT1, a Freeze-dried Mussel Tissue Certified Reference Material for Multiple Marine Toxins", Biotoxin Metrology Certificate of Analysis CRM-FDMT1-20070717, National Research Council Canada, Halifax. DOI https://doi.org/10.4224/crm.2016.fdmt1.20070717

Les publications détaillant la production (#3), le développement de méthodes (#4), l'évaluation de l'homogénéité et de la stabilité (#5), la certification (#16) et le profilage des analogues de toxines (#18) sont incluses dans la liste de références.

Date de délivrance : février 2016 Version du document : 20220221

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

Approuvé par : <u>Vear</u>ge Mc Can.

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 Canada 1411, rue Oxford Halifax (Nouvelle-Écosse) B3H 3Z1



National Research



Téléphone : 1-902-426-8281 Télécopieur : 1-902-426-5426 Courriel : <u>CRM-MRCHalifax@nrc-cnrc.gc.ca</u>

