

Certificat d'analyse

CMRC-NRC

Matériau de référence certifié

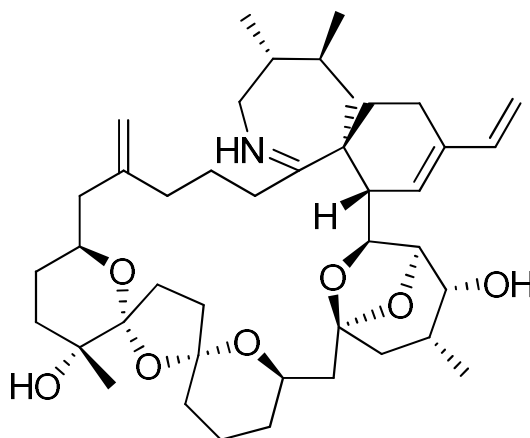
CRM-PnTX-G (lot numéro 20110421)

Solution d'étalonnage certifiée pour la pinnatoxine-G

Les pinnatoxines (PnTX) constituent un groupe de toxines imines cycliques à action rapide initialement identifiées dans des mollusques et crustacés provenant d'Asie [1-5]. Ultérieurement, d'autres nouveaux analogues de PnTX ont été détectés dans des mollusques et crustacés provenant d'Australie et de Nouvelle-Zélande [6]. Les PnTX sont produites par *Vulcanodinium rugosum* [7], un dinoflagellé initialement isolé de la Méditerranée [8]. Des études récentes ont mis en évidence une distribution étendue des PnTX dans des mollusques et crustacés provenant de la Norvège [9] et du Canada [10], où la PnTX-G était l'analogue prévalent. Le CRM-PnTX-G est une solution d'étalonnage certifiée de PnTX-G dans du méthanol (avec 0,01 % d'acide acétique) à une concentration de 2,77 $\mu\text{mol/L}$.

Tableau 1 : Concentrations certifiées pour le CRM-PnTX-G.

Composé	$\mu\text{mol/L}$ (à +20 °C)	$\mu\text{g/mL}$ (à +20 °C)	$\mu\text{g/g}$
Pinnatoxine-G	$2,77 \pm 0,13$	$1,92 \pm 0,09$	$2,43 \pm 0,11$



Pinnatoxine-G

N° de registre CAS : 1312711-74-2

Formule moléculaire : C₄₂H₆₃NO₇

Masse moléculaire : 693,95

[M+H]⁺ : *m/z* 694,4677

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

Conditions de stockage : -12 °C ou moins



Conseil national de
recherches Canada

National Research
Council Canada

Canada

Utilisation prévue

Le CRM-PnTX-G est une solution d'étalonnage certifiée conçue pour le développement de méthodes d'analyse et le dosage précis de la PnTX-G. La concentration du CRM-PnTX-G convient à la préparation d'une série de dilutions à des fins d'étalonnage de systèmes de chromatographie en phase liquide (CL) et de systèmes de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM), ainsi qu'au dopage d'échantillons de contrôle de mollusques et de crustacés à des fins de calcul de taux de récupération.

Instructions pour le stockage et l'utilisation

Afin d'assurer la stabilité du CRM-PnTX-G, ce matériau devrait être conservé non ouvert à -12 °C ou moins. De même, toute dilution de ce matériau devrait être conservée dans des flacons à faible espace de tête à -12 °C ou moins.

Avant de l'ouvrir, on devrait laisser chaque ampoule revenir à la température ambiante et mélanger à fond son contenu. L'ampoule devrait être ouverte au niveau de la marque. Une fois l'ampoule ouverte, des aliquotes précises devraient être prélevées au moyen d'équipement volumétrique étalonné et placées dans des fioles ou des flacons jaugés. Si la solution est laissée ouverte à l'air libre plus de quelques minutes, une augmentation de la concentration surviendra en raison de l'évaporation du méthanol. Il est recommandé de ne pas évaporer complètement les solutions du CRM-PnTX-G en raison de pertes potentielles sur les parois en verre. *Veuillez noter* : Le volume de la solution n'est pas certifié, seule la concentration l'est. Il ne faut donc pas simplement transférer le contenu entier d'une ampoule dans une fiole jaugée, puis diluer au volume désiré.

Préparation du CRM-PnTX-G

La PnTX-G a été isolée au Cawthron Institute, Nouvelle-Zélande, d'huîtres du Pacifique (*Crassostrea gigas*) contaminées naturellement, récoltées dans le sud de l'Australie [6]. La structure et la pureté de la PnTX-G utilisée pour la préparation du CRM-PnTX-G ont été confirmées par résonance magnétique nucléaire (RMN) de ^1H (figure 1). Un spectre des ions produits par CL-SM/SM a permis de montrer que la fragmentation était caractéristique de la PnTX-G (figure 2). Une analyse par CL-SM a aussi été réalisée pour estimer la pureté générale de la solution mère de PnTX-G (colonne Hypersil BDS C8, 3 μm , 150 $\times$ 2,1 mm; phase mobile d'eau (A) et d'acétonitrile/eau (95/5) (B), les deux contenant du formate d'ammonium 2 mM et de l'acide formique 50 mM (pH 2,3); élution avec gradient de 10 à 100 % de B en 20 min à un débit de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$; température de la colonne +20 °C). Aucune impureté majeure n'a été détectée. Toutefois, un certain nombre d'impuretés mineures reliées à la PnTX ($[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z$ 708) ont été détectées (figure 3). Grâce à une élution isocratique, il a été déterminé que la proportion totale des impuretés reliées à la PnTX est < 0,1 % par rapport à la PnTX-G (colonne : Hypersil Gold C18, 1,9 μm , 50 $\times$ 2,1 mm; solvants A et B comme ci-dessus; 35 % B à 300 $\mu\text{L}/\text{min}$; température de la colonne +20 °C).

Une solution mère a été préparée en dissolvant de la PnTX-G pure dans du CD_3OH à des fins d'analyse par RMN quantitative. La solution de MRC a été préparée en faisant une dilution précise de la solution mère dans du méthanol de haute pureté (contenant 0,01 % d'acide acétique), dégazé. Cette solution a été mélangée à fond au moyen d'un barreau aimanté recouvert de téflon et d'un agitateur magnétique, tout en étant refroidie dans un bain de glace sous une atmosphère d'argon. Des aliquotes ont été transférées dans des ampoules en verre ambré préalablement remplies d'argon, qui ont été immédiatement scellées à la flamme.

Méthodes d'analyse et attribution de la valeur

La valeur certifiée du CRM-PnTX-G est basée sur des résultats obtenus au CNRC grâce à deux méthodes d'analyse indépendantes : spectroscopie RMN quantitative (RMNq) [12] et CL avec détection de l'azote par chimiluminescence (CL-DNCL). Conditions : colonne Phenomenex Luna C8(2) 3 µm, 50 × 2,0 mm; température de la colonne +20 °C; méthanol/eau (45/55) avec de l'acide formique 50 mM à 200 µL/min; volume injecté 1,3 µL. Les étalonnages de la RMNq et de la CL-DNCL ont été réalisés au moyen d'étalons de caféine de haute pureté dilués avec précision.

Homogénéité

Parmi toutes les ampoules remplies, on a choisi au hasard un nombre représentatif d'ampoules ($n = 24$) afin de déterminer l'homogénéité du CRM-PnTX-G par CL-SM. La variation d'une ampoule à l'autre a été déterminée comme étant inférieure à la variation entre plusieurs analyses d'une même ampoule ($\text{ÉTR} < 3 \%$ pour $n = 11$), indiquant ainsi une homogénéité acceptable pour toutes les ampoules.

Étude sur la stabilité

Des études isochrones sur la stabilité [11] à court terme et à long terme ont été réalisées sur le CRM-PnTX-G. Après une période de 30 jours, aucune dégradation n'a été observée à des températures allant jusqu'à +37 °C, indiquant une excellente stabilité à court terme. Toutefois, l'étude à long terme a montré que la dégradation à cette température devient significative à partir de 9 mois. Des calculs de régression réalisés à chaque température de stockage sur les données de l'étude à long terme durant un an ont montré que la dégradation était non significative pour toutes les conditions jusqu'à +4 °C. L'incertitude associée à la stabilité à long terme (μ_{its}) a été déterminée afin de l'inclure lors du calcul de l'incertitude combinée finale en utilisant l'erreur-type de la pente à -12 °C.

Incertitude

Toutes les sources raisonnables d'erreur liées à la caractérisation du CRM-PnTX-G ont été prises en compte et quantifiées. Un élément d'incertitude combinée lié aux deux méthodes d'analyse utilisées est inclus (μ_{char}). L'estimation de l'incertitude globale (U_{CRM}) comprend des incertitudes associées à la caractérisation du lot (μ_{char}), à la variation d'une ampoule à l'autre (μ_{hom}) et à l'instabilité lors du stockage à long terme (μ_{stab}) [13]. Ces éléments sont donnés dans le tableau 2 et sont combinés de la manière suivante :

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

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

Tableau 2 : Bilan des incertitudes pour la valeur certifiée du CRM-PnTX-G.

Incertitudes	[$\mu\text{mol/L}$]
μ_{hom}	négligeable
μ_{stab}	0,049
μ_{char}	0,040
$U_{\text{CRM}} (k=2)$	0,13

Consignes de sécurité

Comme les spirolides de structure similaire, les PnTX sont classées comme toxines à action rapide, et des études ont montré que les PnTX ont une toxicité élevée pour les souris par injection intrapéritonéale et par gavage oral [14]. Aucune maladie humaine due aux PnTX n'a jusqu'à présent été rapportée. Néanmoins, des précautions devraient être prises quand on manipule le CRM-PnTX-G. L'inhalation et l'ingestion de méthanol sont dangereuses; l'ingestion peut entraîner la cécité ou la mort, alors qu'un contact cutané prolongé peut entraîner une dermatite et/ou des dommages aux reins. Seules des personnes qualifiées devraient manipuler cette solution et des méthodes d'élimination appropriées devraient être suivies. Il faudrait porter des gants épais et une protection pour les yeux quand on ouvre une ampoule, en cas de brisure du verre. Une fiche signalétique (FS) est disponible pour le CRM-PnTX-G.

Période de validité

Quand il est conservé non ouvert dans les conditions de stockage recommandées, la concentration certifiée du CRM-PnTX-G 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 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. Zheng S, Huang F, Chen S, Tan X, Zuo J, Peng J, Xie R (1990). The isolation and bioactivities of pinnatoxin. *Chin J Mar Drugs* 9:33-35.
2. Chou T, Haino T, Kuramoto M, Uemura D (1996). Isolation and structure of Pinnatoxin D, a new shellfish poison from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Tetrahedron Lett* 37:4027-4030.
3. Takada N, Uemura N, Suenaga K, Chou T, Nagatsu A, Haino T, Yamada K, Uemura D (2001). Pinnatoxins B and C, the most toxic components in the pinnatoxin series from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Tetrahedron Lett* 42:3491-3494.
4. Matsuura F, Hao J, Reents R, Kishi Y (2006). Total synthesis and stereochemistry of pinnatoxins B and C. *Org Lett* 8:3327-3330.
5. Uemura D, Chou T, Haino T, Nagatsu A, Fukuzawa S, Zheng S, Chen H (1995). Pinnatoxin A: a toxic amphoteric macrocycle from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *J Am Chem Soc* 117:1155-1156.
6. Selwood AI, Miles CO, Wilkins AL, van Ginkel R, Munday R, Rise F, McNabb P (2010). Isolation, structural determination and acute toxicity of pinnatoxins E, F and G. *J Agric Food Chem* 58:6532-6542.
7. Rhodes L, Smith K, Selwood A, McNabb P, Munday R, Suda S, Molenaar S, Hallegraeff G (2011). Dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* identified as the causative organism of pinnatoxins in Australia, New Zealand and Japan. *Phycologia* 50:624-628.
8. Nézan E, Chomérat N (2011). *Vulcanodinium rugosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae), un nouveau dinoflagellé marin de la côte méditerranéenne française. *Cryptogamie, Algologie* 32:3-18.
9. Rundberget T, Aasen JAB, Selwood AI, Miles CO (2011). Pinnatoxins and spirolides in Norwegian blue mussels and seawater. *Toxicon* 58:700-711.
10. McCarron P, Rourke WA, Hardstaff W, Pooley B, Quilliam MA (2012). Identification of pinnatoxins and discovery of their fatty acid ester metabolites in mussels (*Mytilus edulis*) from Eastern Canada. *J Agric Food Chem* 60:1437-1446.
11. Lamberty A, Schimmel H, Pauwels J (1998). The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. *Fresenius J Anal Chem* 360:359-361.
12. 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.
13. Pauwels J, Lamberty A, Schimmel H (2000). Evaluation of uncertainty of reference materials. *Accred Qual Assur* 5:95-99.
14. Munday R (2008). Toxicology of cyclic imines: gymnodimine, spirolides, pinnatoxins, pteriattoxins, prorocentrolide, spiro-prorocentrimine, and symbioimines. In: Botana LM (ed) *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 581-594.

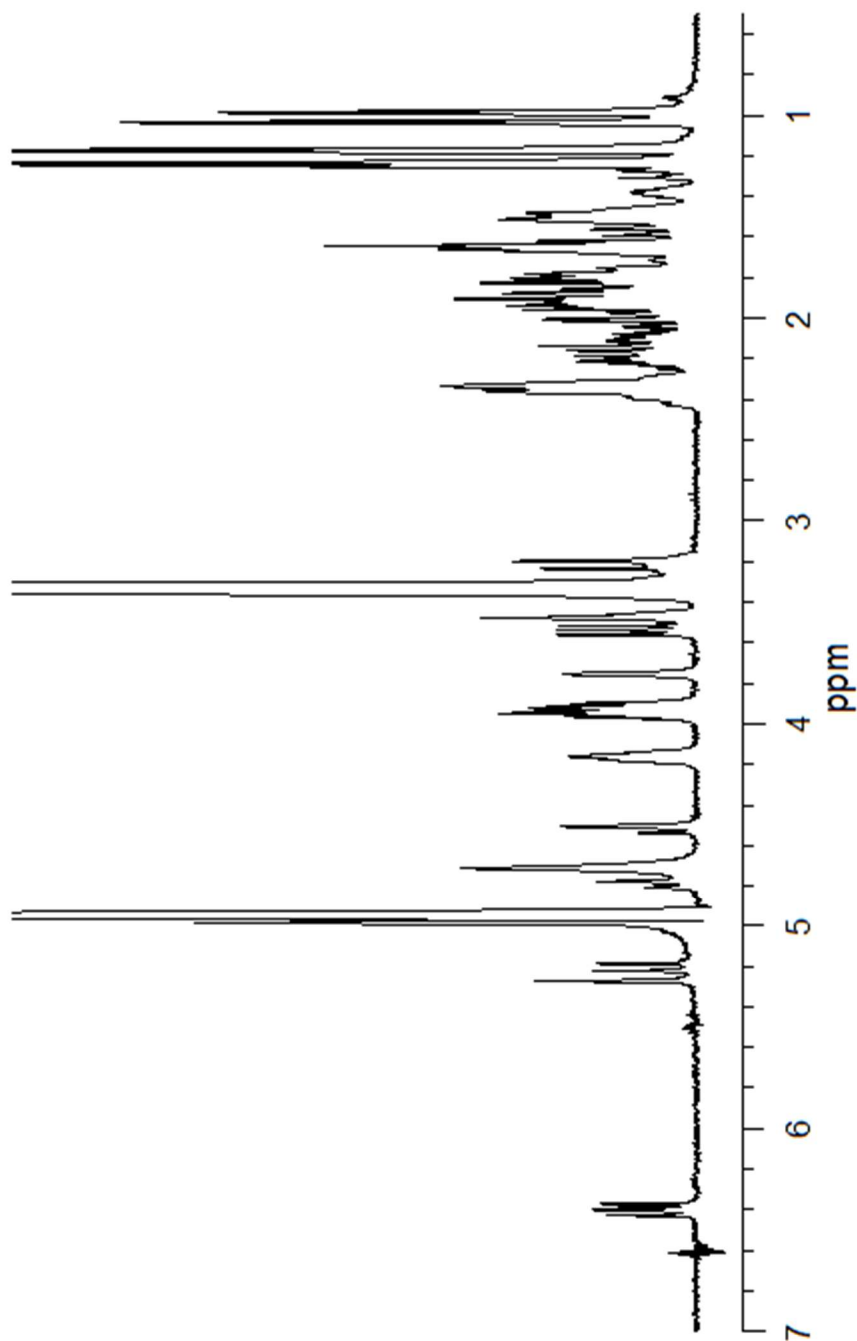


Figure 1 : Spectre RMN ^1H de la PnTX-G dissoute dans du méthanol- d_3 (99,5 % D , Cambridge Isotope Laboratories).

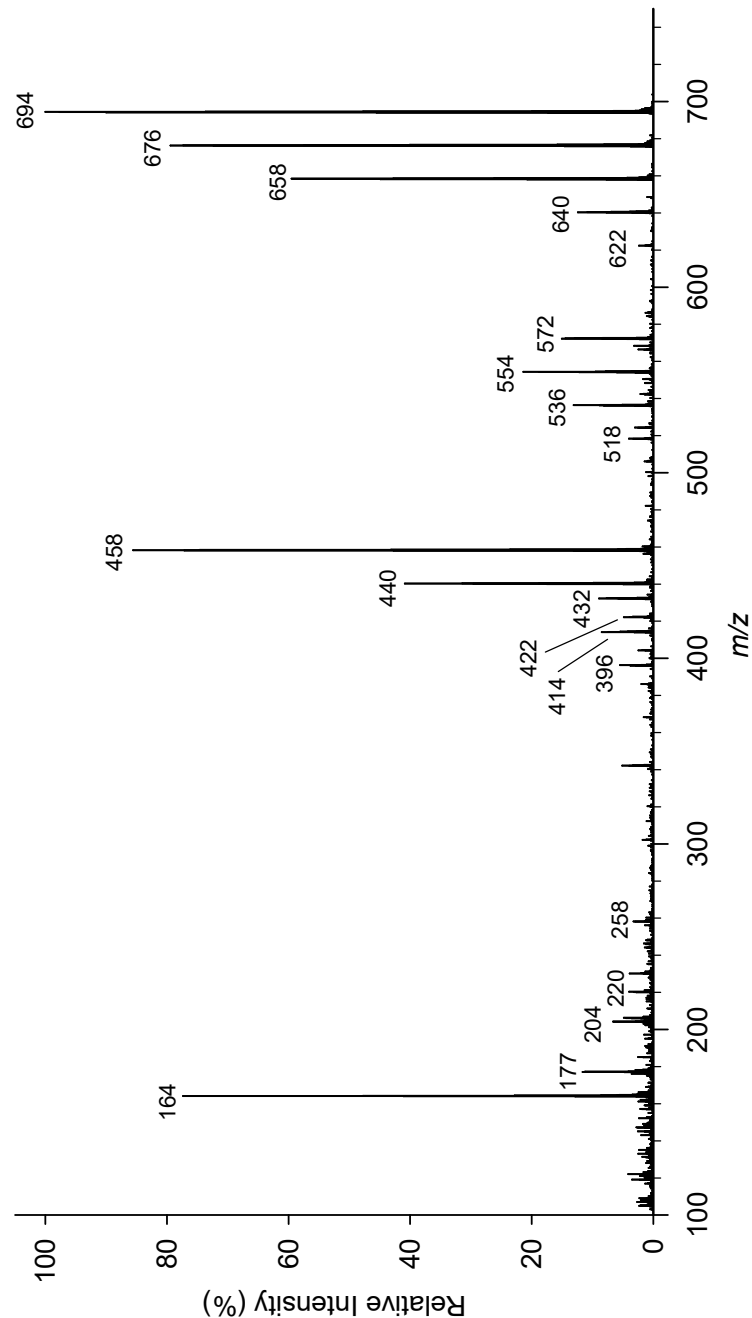


Figure 2 : Spectre de SM en tandem des ions produits de l'ion $[M+H]^+$ (m/z 694) de la PnTX-G acquis au moyen d'un spectromètre de masse AB SCIEX 5500 QTRAP, avec une énergie de collision de 65 eV.

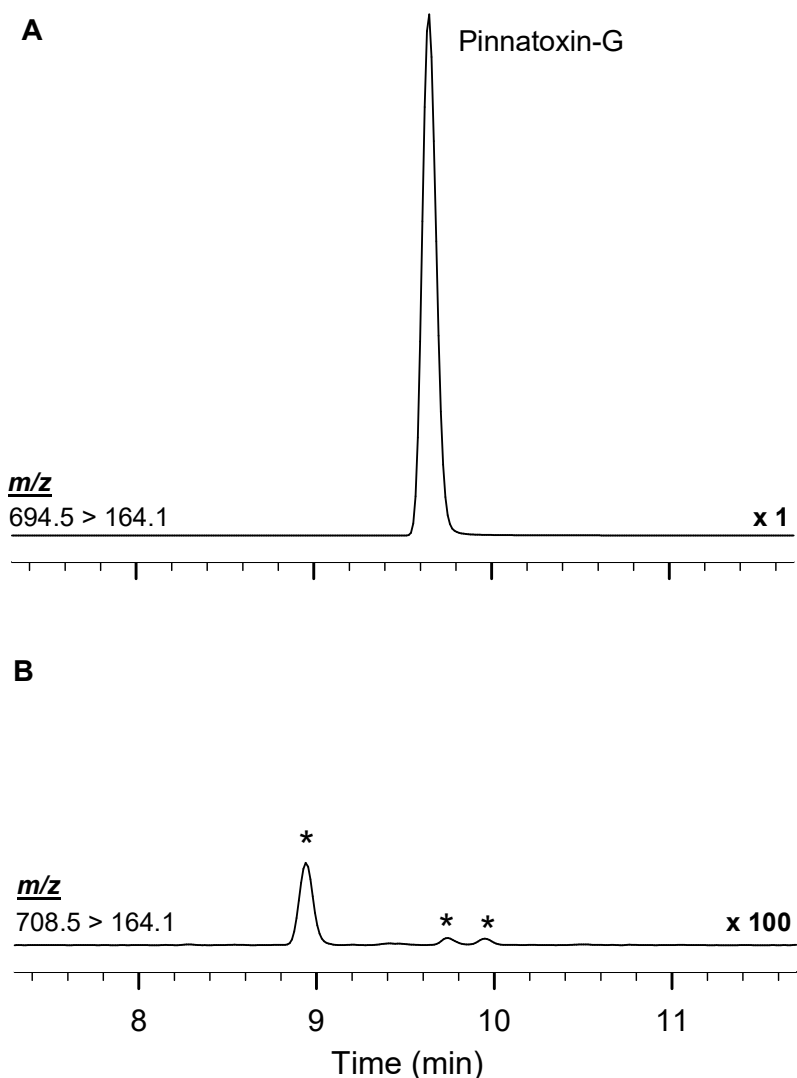


Figure 3 : Analyse par CL-SM du CRM-PnTX-G et détection des impuretés mineures de m/z 708 (indiquées par un astérisque). Conditions : colonne Waters Acquity, 1,7 μ m, 100 $\times$ 2,1 mm, maintenue à +20 °C; eau (A) et acétonitrile/eau (95/5) (B), les deux contenant de l'acide formique 50 mM et du formate d'ammonium 2 mM; élution par gradient de 25 à 75 % de B en 15 min à 200 μ L/min; volume injecté 1,0 μ L; spectromètre de masse AB SCIEX 5500 QTRAP opéré en mode ion positif avec la mesure de réactions sélectionnées.

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-PnTX-G : S. Crain, S.D. Giddings, P. LeBlanc, W. Hardstaff, D. Marciniak, P. McCarron, M.A. Quilliam, K.L. Reeves, K. Thomas et E. Wright.

Une assistance financière pour la production du CRM-PnTX-G a été fournie par Ifremer (Nantes, France). Nous remercions également le Cawthron Institute (Nelson, Nouvelle-Zélande) pour son assistance. Les collaborateurs pour ce projet étaient Philipp Hess (Ifremer), Andrew Selwood et Paul McNabb (Cawthron).

Le présent document devrait être cité comme suit :

P. McCarron, S.D. Giddings, S. Crain, K. Thomas and M.A. Quilliam, "CRM-PnTX-G, a certified calibration solution for Pinnatoxin-G" Biotoxin Metrology Technical Report CRM-PnTX-G-20110421, National Research Council Canada, Halifax, December 2014.

DOI <https://doi.org/10.4224/crm.2014.pntx-g.20110421>

Date de délivrance : décembre 2014

Version du document : 20220225

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

