Certificat d'analyse

CNRC·NRC Matériau de référence certifié

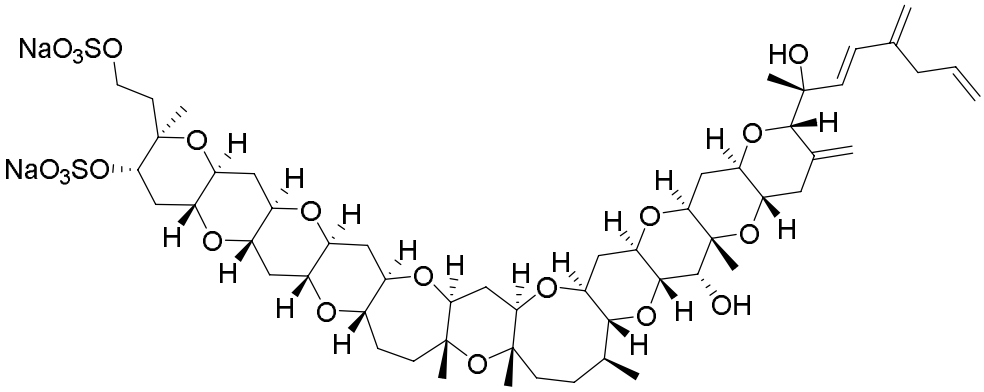
CRM-YTX-c (lot numéro 20151125)

Solution d'étalonnage certifiée pour la yessotoxine

Les yessotoxines (YTX) constituent un groupe de composés de type éthers polycycliques, produits par divers dinoflagellés (algues), incluant *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* et *Gonyaulax spinifera* [1]. Les niveaux maximaux acceptables de certaines YTX dans les mollusques et crustacés destinés à la consommation humaine sont réglementés [2]. Le CRM-YTX-c est une solution d'étalonnage certifiée de YTX dans du méthanol et remplace le CRM-YTX-b, qui avait été mis sur le marché en 2012.

Tableau 1 : Valeur de la concentration certifiée pour le CRM-YTX-c

Composé	µmol/L (à +20 °C)
Yessotoxine (forme protonée)	4,3 ± 0,2



Yessotoxine (forme protonée)
Numéro de registre CAS : 112514-54-2
Formule moléculaire : $C_{55}H_{82}O_{21}S_2$
Masse moléculaire : 1143,4 g/mol
$[M-H]^-$: *m/z* 1141,4717
$[M-2H]^{2-}$: *m/z* 570,2322

Yessotoxine (forme sel de sodium)
Formule moléculaire : $C_{55}H_{80}O_{21}S_2Na_2$
Masse moléculaire : 1187,3 g/mol

Période de validité : 1 an à partir de la date de vente
Conditions d'entreposage : -12 °C ou moins

Conseil national de recherches Canada National Research Council Canada

Canada

Utilisation prévue

Le CRM-YTX-c est une solution d'étalonnage certifiée conçue pour le développement de méthodes d'analyse et le dosage précis de la YTX. La concentration du CRM-YTX-c fait qu'il convient à la préparation d'une série de dilutions pour l'étalonnage de systèmes de chromatographie en phase liquide (CPL) et de systèmes de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (CPL-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 l'entreposage et l'utilisation

Afin d'assurer la stabilité du CRM-YTX-c, les ampoules devraient être entreposées à une température de -12 °C ou moins.

Avant d'ouvrir une ampoule, il faut 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 calibré, puis transférées dans des fioles ou des flacons jaugés. Une augmentation de la concentration due à l'évaporation du méthanol surviendra si la solution est laissée ouverte à l'air libre pendant quelques minutes. Il est recommandé de ne pas évaporer complètement les solutions de CRM-YTX-c, 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 de l'ampoule dans une fiole jaugée, puis diluer.

Préparation du CRM-YTX-c

La YTX a été isolée d'une culture d'un dinoflagellé *(Protoceratium reticulatum*) cultivée au Cawthron Institute en Nouvelle-Zélande. L'extraction et la purification préparative de la YTX ont été réalisées au Cawthron Institute [3]. Les étapes finales pour l'évaluation de la pureté ont été réalisées au CNRC, à Halifax. La structure et la pureté de la YTX ont été confirmées par RMN de ^{1}H et CPL-SM à haute résolution. Une masse exacte mesurée *m/z* de 1141,4704 ± 0,0001 (Δ = -1,1 ppm pour $C_{55}H_{81}O_{21}S_2^-$) a été obtenue pour l'ion $[M-H]^-$ de la YTX (figure 1A). Le spectre de dissociation induite par collision (figure 1B) correspond à ceux des MRC de YTX précédents et aux données de la littérature [4].

Une solution mère a été préparée en dissolvant la YTX purifiée dans du CD_3OH, à des fins d'analyse par RMN quantitative (RMNq) [5]. La solution du MRC a été préparée en faisant une dilution précise de la solution mère de RMNq dans du méthanol dégazé de haute pureté. 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-YTX-c est basée sur les résultats obtenus au CNRC en suivant deux méthodes : RMNq de la solution mère de YTX en utilisant de l'acide benzoïque (SRM du NIST) comme étalon et la CPL-SM/SM avec une phase mobile de pH acide en utilisant le CRM-YTX-b (lot n° 20120328) comme étalon. Le CRM-YTX-c contient des traces d'autres analogues de YTX (< 3 % au total, par rapport à la YTX) (tableau 2, figure 2).

Tableau 2 : Valeurs à titre d'information pour d'autres analogues de YTX présents dans le CRM-YTX-c

Analogue	$[M-H]^-$	TRR**	µmol/L*
9-Mé-41a-homoyessotoxine	1169,6	1,01	0,06
41a-homoyessotoxine	1155,6	1,00	0,02
Nor-ring-A-yessotoxine	1085,6	1,00	0,05

* Ces concentrations ne sont pas certifiées.
** Temps de rétention relatifs (TRR), par rapport à celui de la YTX (figure 2).

Homogénéité

Un nombre représentatif d'ampoules de CRM-YTX-c (n = 25) ont été prélevées parmi toutes les ampoules remplies et la concentration de YTX mesurée par CPL-SM/SM. Les résultats ont été évalués au moyen d'ANOVA. Aucune hétérogénéité significative n'a pu être détectée.

Étude sur la stabilité

Des études à court et à long terme sur la stabilité ont été réalisées pour le CRM-YTX (lot n° 20060308). Étant donné que le processus de production et la gamme de concentration sont équivalents pour le CRM-YTX-c, il est raisonnable de s'attendre à une stabilité comparable. Les résultats de ces études sur la stabilité n'indiquaient aucune dégradation significative de la YTX dans du méthanol, à -12 °C, pendant une période d'un an.

Incertitude

Toutes les sources raisonnables d'erreur liées à la caractérisation du CRM-YTX-c ont été prises en compte et quantifiées. Une incertitude combinée reliée aux deux méthodes d'analyse utilisées est incluse (u_{char}). L'estimation de l'incertitude globale (U_{CRM}) comprend des incertitudes associées à la caractérisation du lot (u_{char}), à la variation d'une ampoule à l'autre (u_{hom}) et à l'instabilité durant le stockage à long terme (u_{stab}) [6-8]. 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).

Tableau 3 : Éléments d'incertitude pour la valeur certifiée du CRM-YTX-c

Incertitudes	[µmol/L]
u_{char}	0,09
u_{hom}	négligeable
u_{stab}	0,09
U_{CRM} (k = 2)	0,2

Consignes de sécurité

Les YTX ont initialement été classées comme toxines diarrhéiques des mollusques et crustacés, mais l'activité biologique de ces composés ne montre aucun effet diarrhéique et les YTX ont depuis été classées comme groupe distinct de toxines d'algues [9]. Aucune toxicité pour les humains n'a été rapportée suite à la consommation de crustacés et mollusques contaminés par des YTX [10]. Néanmoins, des précautions devraient être prises lorsqu'on manipule le CRM-YTX-c. L'inhalation et l'ingestion du méthanol sont dangereuses; l'ingestion peut entraîner la cécité ou être fatale, alors qu'une exposition cutanée prolongée peut conduire à une dermatite et/ou à 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 de données de sécurité (FDS) est disponible pour le CRM-YTX-c.

Période de validité

Si l'ampoule non ouverte est conservée dans la condition recommandée de -12 °C ou moins, la concentration certifiée du CRM-YTX-c 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 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) (http://kcdb.bipm.org/default_fr.asp), 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. Hess P, Aasen JAB (2007). Chemistry, origins, and distribution of yessotoxin and its analogues. In: Botana L.M. (Ed.) *Phycotoxins: chemistry and biochemistry*. Blackwell Publishing, Oxford, pp 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. Miles CO, Wilkins AL, Jensen DJ, Cooney JM, Quilliam MA, Aasen J, MacKenzie AL (2004). Isolation of 41a-Homoyessotoxin and the Identification of 9-Methyl-41a-homoyessotoin and Nor-ring A-yessotoxin from *Protoceratium reticulatum*. *Chem Res Toxicol* 17:1414-1422.
4. 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.
5. Burton IW, Quilliam MA, Walter JA (2005). Quantitative ^{1}H NMR with external standards: Use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products. *Anal Chem* 77:3123-3131.
6. ISO Guide 35 (2006). Reference materials - general and statistical principles for certification. ISO/REMCO.
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. Pauwels J, Lamberty A, Schimmel H (2000). Evaluation of uncertainty of reference materials. *Accred Qual Assur* 5:95-99.
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 L.M. (Ed.) *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection*, 2nd edition. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, pp 329-339.

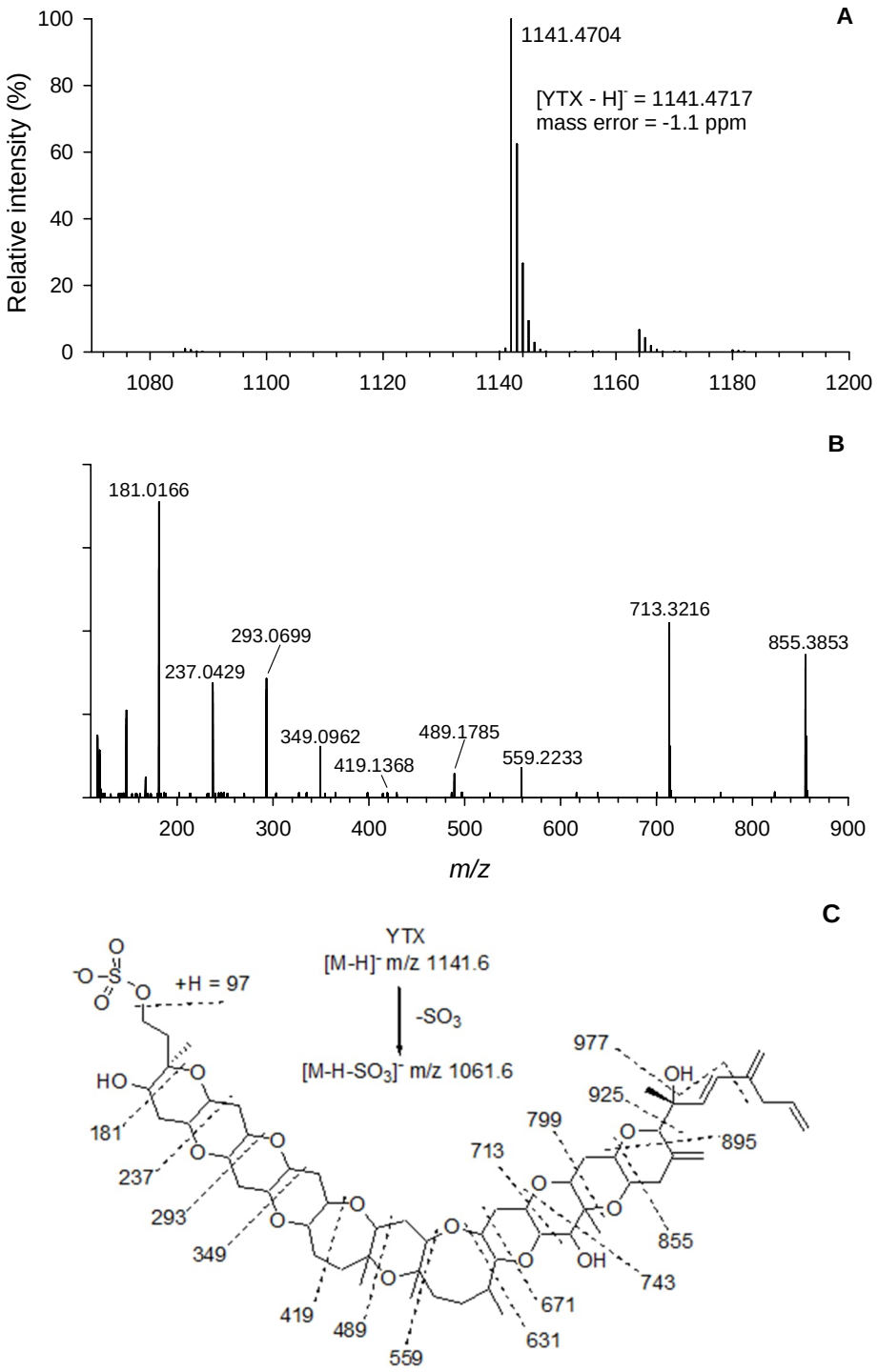


Figure 1 : Spectres de masse avec balayage complet à haute résolution (A) et de dissociation induite par collisions (B) de l'ion $[M-H]^-$, *m/z* 1141, de la YTX présente dans le CRM-YTX-c, mesurés au moyen d'un spectromètre de masse Thermo Exactive Orbitrap muni d'une sonde chauffée d'ionisation par électronébulisation. Données acquises en mode ion négatif avec une tension de nébulisation de -2,7 kV, température du capillaire de +360 °C, et température de l'élément chauffant de +250 °C. Énergie de collision HCD de 120 V pour (B). Mécanisme de fragmentation pour la dissociation induite par collisions de l'ion $[M-H]^-$ (*m/z* 1141) de la YTX (C).

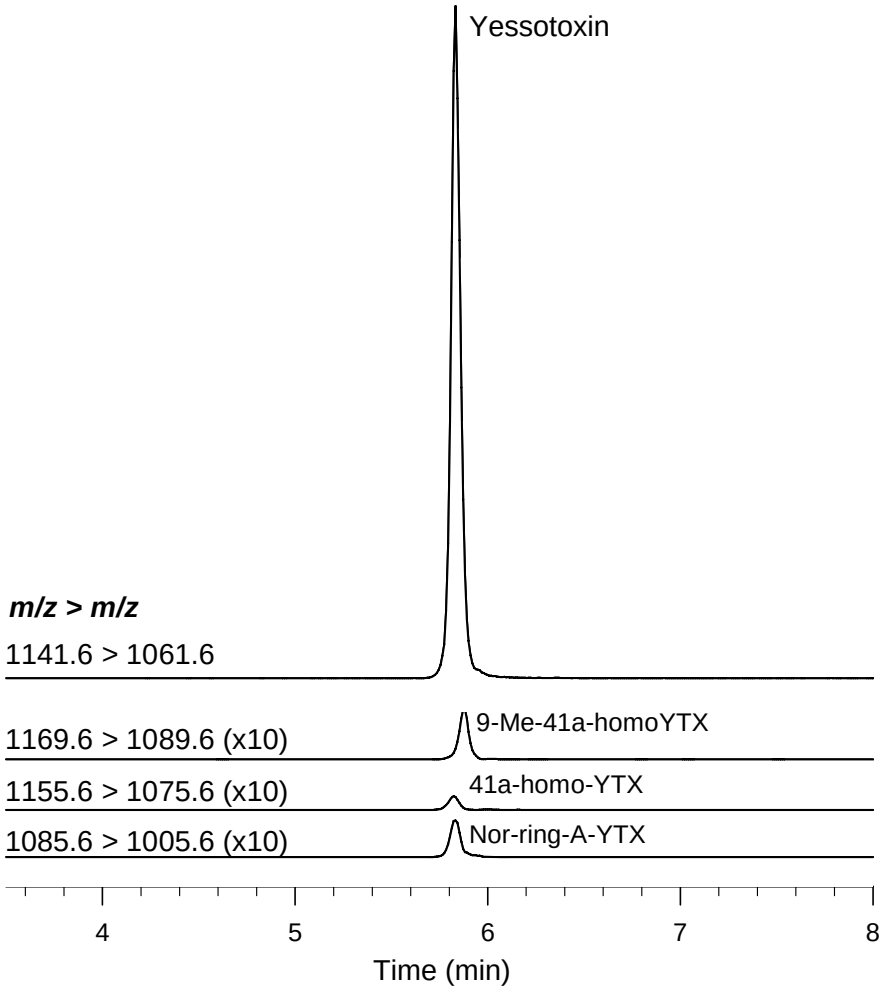


Figure 2 : Analyse par CPL-SM du CRM-YTX-c. Conditions : colonne Phenomenex Luna C18(2), 2.5 µm, 50 × 2,1 mm, maintenue à +20 °C; phase mobile : acide formique 50 mM et formate d'ammonium 2 mM, dans A) eau, et dans B) acétonitrile à 95 % avec élution par gradient de 5 à 50 % de B en 1 min, puis 50 à 100 % de B en 4 min à 0,3 mL/min; volume injecté : 2 µL; SM opéré en mode négatif 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-YTX-c : D.G. Beach, S. Crain, R.A. Perez, W. Hardstaff, E. Kerrin, E. Wright, P. LeBlanc, N. Lewis, P. McCarron, S.D. Giddings, K. Thomas, C. Rafuse, T.V. Chan, M. MacArthur et K. Reeves. J. Hui du CNRC à Halifax est remercié pour sa contribution.

La YTX a été purifiée par Andrew Selwood du Cawthron Institute, à Nelson, Nouvelle-Zélande.

Le présent document devrait être cité comme suit :

S.D. Giddings, S. Crain, P. McCarron, “CRM-YTX-c, certified calibration solution for Yessotoxin”, Biotoxin Metrology Technical Report CRM-YTX-c-20151125, National Research Council Canada, Halifax, February 2016.
DOI https://doi.org/10.4224/crm.2016.ytx-c.20151125

Date de délivrance : février 2016
Version du document : 20220405

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

Approuvé par :

Pearse McCarron, Ph.D.
Chef d’équipe, 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