

# Certificat d'analyse

**CNRC-NRC**

Matériau de référence

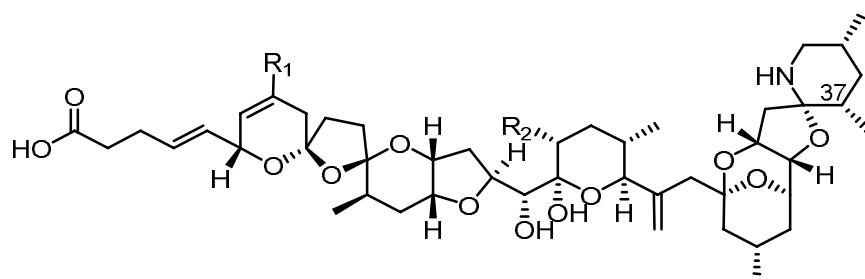
RM-AZA123 (lot numéro 20040422)

Solution d'étalonnage pour les azaspiracides-1, -2 et -3

Les azaspiracides (AZA) constituent une classe de toxines découvertes en Irlande en 1995, après un événement d'intoxication humaine lié à la consommation de mollusques [1,2]. Les AZA possèdent des assemblages spiro uniques avec des groupements carboxyliques et aminés [3,4]. L'origine des AZA a été identifiée comme étant le dinoflagellé *Azadinium spinosum* [5]. Les symptômes d'intoxication peuvent comprendre la nausée, des crampes d'estomac, des maux de tête, le vomissement et de la diarrhée. Le niveau total maximal permis pour les AZA (AZA1, AZA2 et AZA3) dans les mollusques et crustacés est actuellement de 0,16 mg/kg de tissu entier [6]. Le RM-AZA123 est une solution d'étalonnage non certifiée d'AZA1, -2 et -3 dans du méthanol.

**Tableau 1 :** Valeurs des concentrations pour le RM-AZA123

Composé	nmol/L (à +20 °C)
Azaspiracide-1 (somme AZA1 + 37-épi-AZA1)	200 ± 18
Azaspiracide-2 (somme AZA2 + 37-épi-AZA2)	147 ± 13
Azaspiracide-3 (somme AZA3 + 37-épi-AZA3)	141 ± 12



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	[M+H] <sup>+</sup> m/z	CAS Reg No.
Azaspiracid-1	H	CH <sub>3</sub>	842.5	214899-21-5
Azaspiracid-2	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	856.5	265996-92-7
Azaspiracid-3	H	H	828.5	265996-93-8
Azaspiracid-6	CH <sub>3</sub>	H	842.5	629656-47-9

**Tableau 2 :** Valeur à titre d'information pour l'AZA6 présent dans le RM-AZA123

Composé	[M+H] <sup>+</sup> , m/z	Concentration (nmol/L) (à +20 °C)
Azaspiracide-6 (AZA6)	842,5	8,6 ± 1,3

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 RM-AZA123 est une solution d'étalonnage non certifiée conçue afin d'aider au développement de méthodes analytiques pour la quantification des AZA. La concentration du RM-AZA123 convient à la préparation d'une série de dilutions à des fins d'étalonnage d'instruments de CL ou d'un système de CL-SM, ainsi que pour le dopage d'échantillons de contrôle de mollusques et crustacés à des fins d'études du taux de récupération.

## Instructions pour l'entreposage et l'utilisation

Le RM-AZA123 devrait être entreposé non ouvert, dans un congélateur (à -12 °C ou moins) pour assurer sa stabilité. De même, toute aliquote ou dilution de ce matériau devrait être entreposée dans un flacon à faible espace de tête, à -12 °C.

Avant d'ouvrir une ampoule, il faut la laisser revenir à la température ambiante et bien mélanger son contenu. Les ampoules devraient être ouvertes au niveau de la marque. Une fois l'ampoule ouverte, des aliquotes précises devraient être prélevées au moyen d'un dispositif volumétrique calibré, puis transférées 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. *Veillez noter* : Le volume de la solution n'est pas certifié. Il ne faut donc pas simplement transférer le contenu entier de l'ampoule dans une fiole jaugée, puis diluer.

## Préparation du RM-AZA123

Les AZA1, -2 et -3 ont été purifiés au CNRC à partir de tissu de mollusques naturellement contaminés en utilisant une procédure à étapes multiples, y compris la répartition liquide-liquide et plusieurs étapes chromatographiques sur un extrait d'éthanol à 95 %, concentré [7]. Les masses exactes mesurées des ions  $[M+H]^+$  d'AZA1, -2 et -3 étaient de  $842,5021 \pm 0,0005$  ( $\Delta = -3,3$  ppm pour  $C_{47}H_{72}NO_{12}$ ),  $856,5178 \pm 0,0004$  ( $\Delta = -3,2$  ppm pour  $C_{48}H_{74}NO_{12}$ ), et  $828,4863 \pm 0,0007$  ( $\Delta = -3,5$  ppm pour  $C_{46}H_{70}NO_{12}$ ), respectivement, par la SM à haute résolution. Les structures ont aussi été confirmées par l'examen des spectres de SM à haute résolution des ions produits.

La solution pour les ampoules a été préparée dans du méthanol de haute pureté, puis bien mélangée sous une atmosphère d'argon. Des aliquotes (environ 0,5 mL) de cette solution ont été placées dans des ampoules de verre ambré préalablement remplies d'argon. Ces ampoules ont été immédiatement scellées à la flamme.

## Méthodes d'analyse et attribution de la valeur

Les valeurs de concentration (tableau 1) ont été assignées par quantification par rapport aux divers MRC d'étalonnage pour AZA1, -2 et -3. Le RM-AZA123 a été analysé par CL-SM/SM en utilisant deux phases mobiles : à pH acide et pH neutre (figure 1). Les valeurs présentées sont la somme des pics principaux et de leurs épimères C-37, en présumant une réponse équimolaire de l'épimère comparé au pic principal [8]. Le RM-AZA123 contient également de l'AZA6 (présence confirmée par SM à haute résolution) et une valeur à titre d'information a été attribuée à l'aide d'un étalon d'AZA6 produit à l'interne (tableau 2). Un certain nombre d'analogues et d'isomères supplémentaires des AZA sont présents dans le RM-AZA123 à des niveaux de traces.



## Homogénéité

L'homogénéité a été évaluée en sélectionnant des ampoules parmi la série complète de remplissage ( $n = 6$ ), et en analysant chacune en triple. Une contribution à l'incertitude qui représente la quantité d'inhomogénéité potentielle masquée par la variabilité de la méthode d'analyse ou une contribution de toute inhomogénéité détectable a été appliquée à l'incertitude combinée finale.

## Étude sur la stabilité

Une étude sur la stabilité a été effectuée à +4 °C, +20 °C et +37 °C sur une période de 478 jours. Une dégradation a été observée pour les trois toxines à +20 °C et +37 °C (significative aux deux conditions après 100 jours). L'AZA3 était la moins stable des trois toxines avec une dégradation significative observée à +4 °C. Une stabilité similaire a été observée pour les MRC individuels des AZA produits par le CNRC. Les contributions à l'incertitude sont tirées d'études sur la stabilité réalisées pour les MRC individuels des AZA.

## Incertainité

Toutes les sources raisonnables d'erreur liées à la caractérisation du RM-AZA123 ont été prises en compte et quantifiées. Un élément d'incertitude combinée lié aux deux méthodes d'analyse utilisées est inclus ( $U_{char}$ ). L'estimation de l'incertitude globale ( $U_{RM}$ ) 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 lors de l'entreposage à long terme ( $U_{stab}$ ) [9]. Ces éléments sont donnés dans le tableau 3 et sont combinés de la manière suivante :

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

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

**Tableau 3** : Éléments d'incertitude pour les valeurs de concentrations du RM-AZA123

Composé	$U_{char}$ [nmol/L]	$U_{hom}$ [nmol/L]	$U_{stab}$ [nmol/L]	$U_{RM}(k = 2)$ [nmol/L]
AZA1 + 37-épi-AZA1	8,7	2,0	2,4	18
AZA2 + 37-épi-AZA2	6,2	0,6	0,9	13
AZA3 + 37-épi-AZA3	5,8	1,5	0,6	12

## Consignes de sécurité

Les AZA sont toxiques en cas d'ingestion et peuvent provoquer des symptômes gastro-intestinaux graves [10]. L'inhalation et l'ingestion du méthanol sont dangereuses; l'ingestion peut entraîner la cécité ou être mortelle, alors qu'un contact cutané prolongé peut causer une dermatite et/ou des dommages aux reins. Seules les personnes qualifiées devraient manipuler la solution, et des méthodes appropriées d'élimination devraient être employées. Il faudrait porter des gants épais et une protection pour les yeux lors de l'ouverture de l'ampoule, en cas de brisure du verre. Une fiche signalétique (FS) est disponible pour le RM-AZA123.



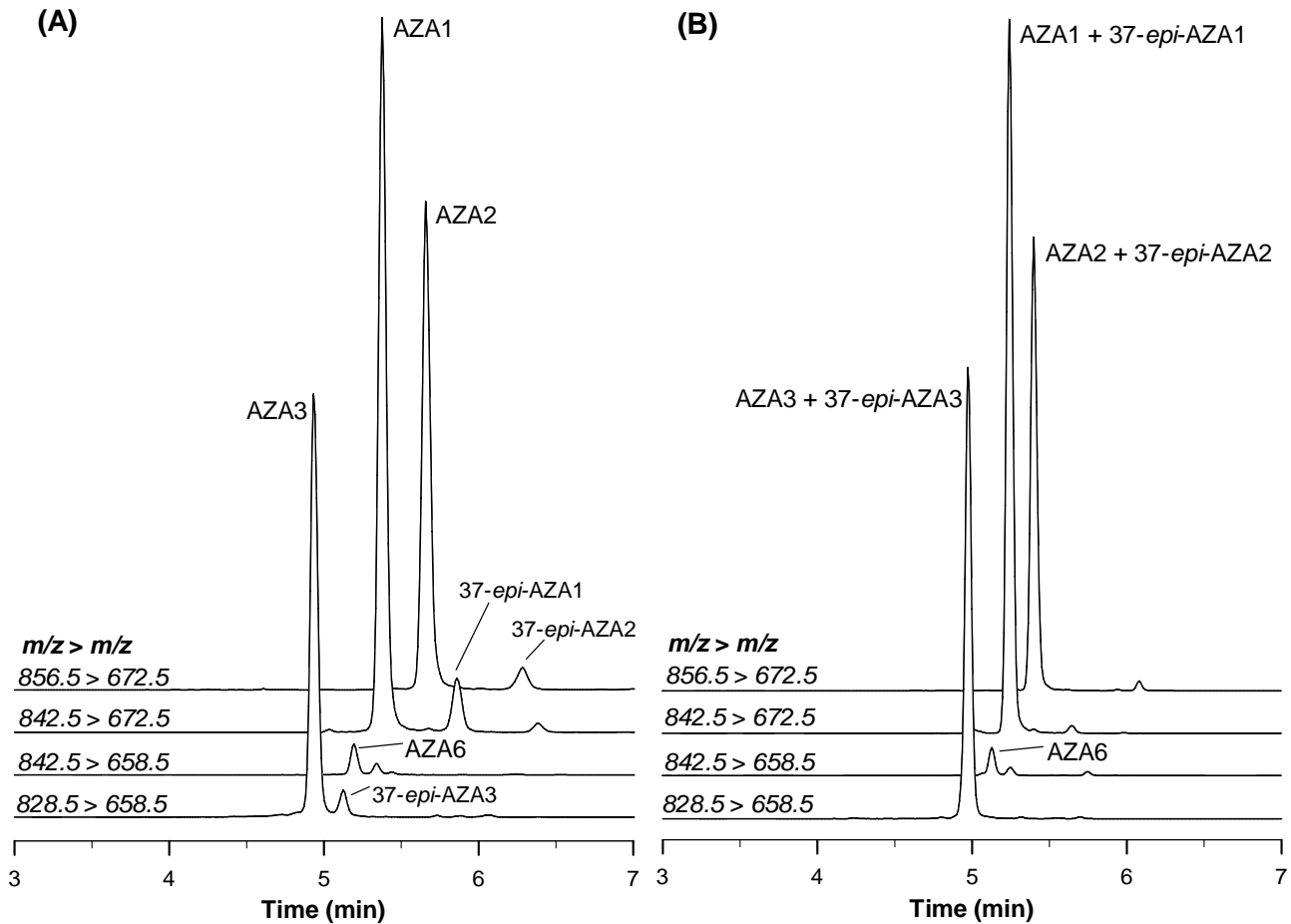
## Période de validité

Quand les ampoules non ouvertes sont stockées dans les conditions recommandées, les concentrations présentées pour le RM-AZA123 sont valides pendant un an à partir de la date de vente.

## Références

1. McMahon T, Silke J (1996). Winter toxicity of unknown aetiology in mussels. *Harmful Algae News* 14:2.
2. Kilcoyne J, Jauffrais T, Twiner MJ, Doucette GJ, Aasen Bunæs JA, Sosa S, Krock B, Séchet V, Nulty C, Salas R, Clarke D, Geraghty J, Duffy C, Foley B, John U, Quilliam MA, McCarron P, Miles CO, Silke J, Cembella A, Tillmann U, Hess P (2014). *AZASPIRACIDS – Toxicological Evaluation, Test Methods and Identification of the Source Organisms (ASTOX II)*. Marine Research Sub-Programme (NDP 2007-'13) Series, vol ISSN: 2009-3195. Marine Institute, Ireland.
3. Satake M, Ofuji K, Naoki H, James KJ, Furey A, McMahon T, Silke J, Yasumoto T (1998). Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*. *J Am Chem Soc* 120: 9967-9968.
4. Nicolaou KC, Koftis TV, Vyskocil S, Petrovic G, Tang W, Frederick MO, Chen DYK, Li Y, Ling T, Yamada YMA (2006). Total synthesis and structural elucidation of azaspiracid-1. Final assignment and total synthesis of the correct structure of azaspiracid-1. *J Am Chem Soc* 128: 2859-2872.
5. Tillmann U, Elbrachter M, Krock B, John U, Cembella A (2009). *Azadinium spinosum* gen. et sp. nov. (*Dinophyceae*) identified as a primary producer of azaspiracid toxins. *Eur J Phycol* 44: 63-79.
6. 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.
7. Quilliam MA, Reeves K, MacKinnon SL, Craft C, Whyte H, Walter JA, Stobo L, Gallacher S (2006). Preparation of reference materials for azaspiracids. In: 5th International Conference of Molluscan Shellfish Safety, 14-18 June 2004, Galway, Ireland, *Molluscan Shellfish Safety*, 2006. vol ISBN: 1902895339, p 111-115.
8. 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.
9. Pauwels J, Lambert A, Schimmel H (2000). Evaluation of uncertainty of reference materials. *Accred Qual Assur* 5: 95-99.
10. Twiner MJ, Rehmann N, Hess P, Doucette GJ (2008). Azaspiracid shellfish poisoning: A review on the chemistry, ecology, and toxicology with an emphasis on human health impacts. *Mar Drugs* 6: 39-72.





**Figure 1 :** Chromatogrammes CL-SM/SM du RM-AZA123 en utilisant des phases mobiles à pH neutre (A) et à pH acide (B), montrant la résolution et la co-élution des AZA et des 37-épi-AZA, respectivement. Conditions pour la phase neutre : colonne Luna C18(2) (2,0 × 50 mm, 2,5 µm); phase mobile : acétate d'ammonium 5 mM (pH 6,8) à la fois dans de l'eau désionisée (A) et dans 95 % d'acétonitrile (B); gradient : 25-100 % de B en 5 min, 350 µL/min à +15 °C; volume injecté : 5 µL. Conditions pour la phase acide : colonne Luna C18(2) (2,0 × 50 mm, 2,5 µm); phase mobile : formate d'ammonium 2 mM et 50 mM d'acide formique (pH 2,3) à la fois dans de l'eau désionisée (A) et dans 95 % d'acétonitrile (B); gradient : 25 -100 % de B en 5 min, 300 µL/min à +20 °C; volume injecté : 5 µL.

## Remerciements

Les membres suivants du personnel au CNRC ont contribué à la production et à la caractérisation du RM-AZA123 : C. Craft, S. Crain, S.D. Giddings, W. Hardstaff, D. Marciniak, P. McCarron, R.A. Perez, M.A. Quilliam, K.L. Reeves, K. Thomas, H. Whyte, E.J. Wright.

Remerciements également à Lesley Stobo et Susan Gallagher du FRS Marine Laboratory, Aberdeen, au Royaume-Uni, pour leur contribution au projet.

Les tissus contaminés aux azaspiracides ont été fournis par le Marine Institute, en Irlande, et un financement partiel a été fourni par UK Food Standards Agency.

## Le présent document devrait être cité comme suit :

E.J. Wright, K.L. Reeves, S.D. Giddings, W. Hardstaff, M.A. Quilliam, P. McCarron, "RM-AZA123, calibration solution for Azaspiracid-1, -2, and -3" Biotoxin Metrology Technical Report RM-AZA123-20040422, National Research Council Canada, Halifax, September 2016.

DOI <https://doi.org/10.4224/crm.2016.aza123.20040422>

*Date de délivrance : septembre 2016*

*Version du document : 20220408*

*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

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

