



# Certificat d'analyse

Matériau de référence certifié

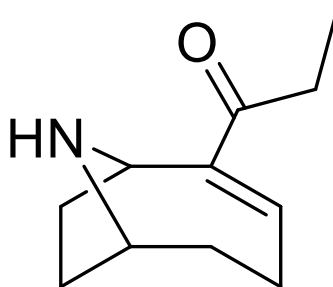
## CRM-hATX (lot 20230928)

Matériau de référence certifié d'une solution d'étalonnage pour l'homoanatoxine-a

L'homoanatoxine-a (hATX) est une toxine cyanobactérienne associée à la mortalité d'animaux dans le monde [1, 2]. Le CRM-hATX est une solution d'étalonnage certifiée de hATX dans le méthanol/eau (9:91, v/v) contenant 0,01 % d'acide acétique, conçue pour faciliter l'identification et la quantification de l'hATX.

Tableau 1 : Valeurs certifiées et incertitudes élargies ( $k = 2$ ) pour le CRM-hATX

| Composé         | Fraction massique<br>$\mu\text{g/g}$ | Concentration<br>massique<br>$\mu\text{g/mL}$ (15-30 °C) | Concentration<br>$\mu\text{mol/L}$ (15-30 °C) |
|-----------------|--------------------------------------|--|---|
| homoanatoxine-a | $5,13 \pm 0,26$                      | $5,05 \pm 0,26$  | $28,2 \pm 1,4$                                |



### (+) homoanatoxine-a

Numéro de registre CAS : [142926-86-1](#)

InChIKey : [VVMQRZZXKNDPOT-PSASIEDQSA-N](#)

Formule moléculaire :  $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}$

Masse molaire : 179,26 g/mol

$[\text{M}+\text{H}]^+$  :  $m/z$  180,1383

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

Conditions d'entreposage :  $-12$  °C ou moins

## Utilisation prévue

Le CRM-hATX est une solution d'étalonnage certifiée conçue pour la mise au point de méthodes d'analyse et le dosage précis de l'hATX. La concentration convient à la préparation d'une série de dilutions pour l'étalonnage d'instruments, comme un appareil de chromatographie en phase liquide couplé à un appareil de spectrométrie de masse (CL-SM), ainsi qu'à l'enrichissement d'échantillons témoins à des fins de mesure du taux de récupération.

## Préparation du matériau

L'hATX a été isolée d'une culture de la souche de cyanobactérie *Oscillatoria formosa* NIVA-CYA 92 [3]. La toxine a été extraite du milieu de culture, purifiée sur colonne ouverte et par chromatographie semi-préparative, puis deshydratée *in vacuo*.

La structure et la pureté de l'hATX ont été confirmées par CL avec détection par spectrométrie de masse à haute résolution (CL-SMHR, figures 1 et 2) [4,5], détection des aérosols chargés (CL-DAC), détection de l'azote par chimioluminescence (CL-DACL) [6], CL-UV et spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) 1D et 2D. Un  $m/z$  précis et mesuré de 180,1383 ( $\Delta = 0,07$  ppm pour  $C_{11}H_{18}NO^+$ ) a été obtenu pour l'ion  $[M+H]^+$  de l'hATX par CL-SMHR.

La solution mère a été préparée en dissolvant l'hATX purifiée dans du  $D_2O$  à des fins d'analyse quantitative par RMN de  $^1H$  (RMNq) [7]. La solution de CRM-hATX a été préparée en diluant avec précision la solution mère dans un mélange dégazé de méthanol/eau (9:91, v/v) ayant 0,01 % d'acide acétique. Des aliquotes ont été transférées dans des ampoules propres en verre ambré remplies d'argon, qui ont été immédiatement scellées à la flamme. Chaque ampoule contient environ 0,5 mL de solution.

## Caractérisation du matériau

La valeur certifiée pour le CRM-hATX (tableau 1) est basée sur les résultats obtenus au Conseil national de recherches du Canada (CNRC) en utilisant la méthode de RMNq [7]. Un matériau de référence certifié (MRC) à base d'hydrogénophthalate de potassium (NIST SRM 84L) a été utilisé pour l'étalonnage. Les valeurs justificatives ont été obtenues par CL-SMHR à l'aide d'un matériau de référence maison pour l'hATX (CNRC RM-hATX) et CL-UV à l'aide du CRM-ATX (lot 20100721) [8].

De faibles concentrations de dihydrohomoanatoxine-a (*cis*- $H_2$ hATX et de *trans*- $H_2$ hATX) et de 10-hydroxyhomoanatoxine-a (10-OH-hATX) [4] à une valeur de  $m/z$  de 182,1539, ainsi que plusieurs produits d'oxydation de l'hATX ( $m/z$  de 196,1332) sont présents dans le CRM-hATX (figure 2). La contribution totale des impuretés structurellement apparentées est estimée à 1,5 % par CL-SMHR, en supposant des réponses molaires similaires à celles de l'hATX.

## Traçabilité métrologique

Les résultats présentés dans le présent certificat sont traçables au Système international d'unités (SI) au moyen d'étalons préparés par gravimétrie composés d'un MRC à base d'hydrogénophthalate de potassium (NIST SRM 84L).

## Homogénéité

Un nombre représentatif d'ampoules de CRM-hATX a été prélevé dans la série d'ampoules préparées, puis elles ont été analysées par CL-SMHR. Aucune hétérogénéité n'a été observée.

## Stabilité

Des études sur le CRM-hATX ont démontré une stabilité à des températures jusqu'à 23 °C pendant un an, incluant à la température d'entreposage recommandée de -12 °C.

## Incertitude

L'incertitude élargie ( $U$ ) pour toutes les valeurs est égale à  $U = ku_c$ ,  $u_c$  étant l'incertitude type composée calculée conformément au Comité commun pour les guides en métrologie (JCGM) [9] et  $k$  étant le facteur de couverture. Un facteur de couverture de  $k = 2$  a été appliqué, ce qui correspond à un niveau de confiance d'environ 95 %.

Toutes les sources raisonnables d'incertitude liées aux valeurs certifiées du tableau 1 ont été prises en compte. L'estimation de l'incertitude combinée comprend les incertitudes dues à la caractérisation du lot, à la variation possible inter-unité et à la stabilité du matériau.

## Entreposage

Le matériau doit être entreposé à une température inférieure ou égale à -12 °C. L'ampoule devrait être entreposée non ouverte.

## Instructions de manipulation et d'utilisation

Avant l'ouverture, chaque ampoule doit d'abord être équilibrée à la température ambiante et le contenu doit être soigneusement mélangé. L'ampoule doit être ouverte à la marque prélimée juste avant son utilisation. Un dispositif étalonné doit être utilisé pour transférer de façon précise la solution du MRC. La valeur certifiée n'est garantie que si l'ampoule est échantillonnée immédiatement après l'ouverture afin de limiter l'évaporation du solvant. Il est important de noter que le volume de la solution n'est pas certifié; seules sa fraction massique et sa concentration le sont. En conséquence, tout le contenu de l'ampoule ne peut être dilué de façon volumétrique.

Après la première ouverture de l'ampoule, un sous-échantillonnage répétitif de la solution du MRC et son entreposage peuvent avoir un impact sur les valeurs certifiées. Il incombe aux utilisateurs de démontrer que leurs procédures de sous-échantillonnage et d'entreposage n'ont aucune incidence sur les valeurs certifiées.

## Renseignements sur la santé et la sécurité

Seul un personnel qualifié devrait manipuler ce matériau et des méthodes d'élimination appropriées doivent être suivies. Une Fiche de données de sécurité (FDS) est disponible à l'adresse [doi.org/10.4224/crm.2024.hatx.20230928](https://doi.org/10.4224/crm.2024.hatx.20230928). Réserve à l'usage du laboratoire uniquement; non destiné à la consommation humaine, aux usages thérapeutiques, aux médicaments, aux usages domestiques ou à tout autre usage.

## Période de validité

Les valeurs certifiées sont valides pendant 1 an à compter de la date de vente, pourvu que les conditions d'entreposage et les instructions de manipulation et d'utilisation précisées dans le présent certificat soient respectées.

## Système de gestion de la qualité

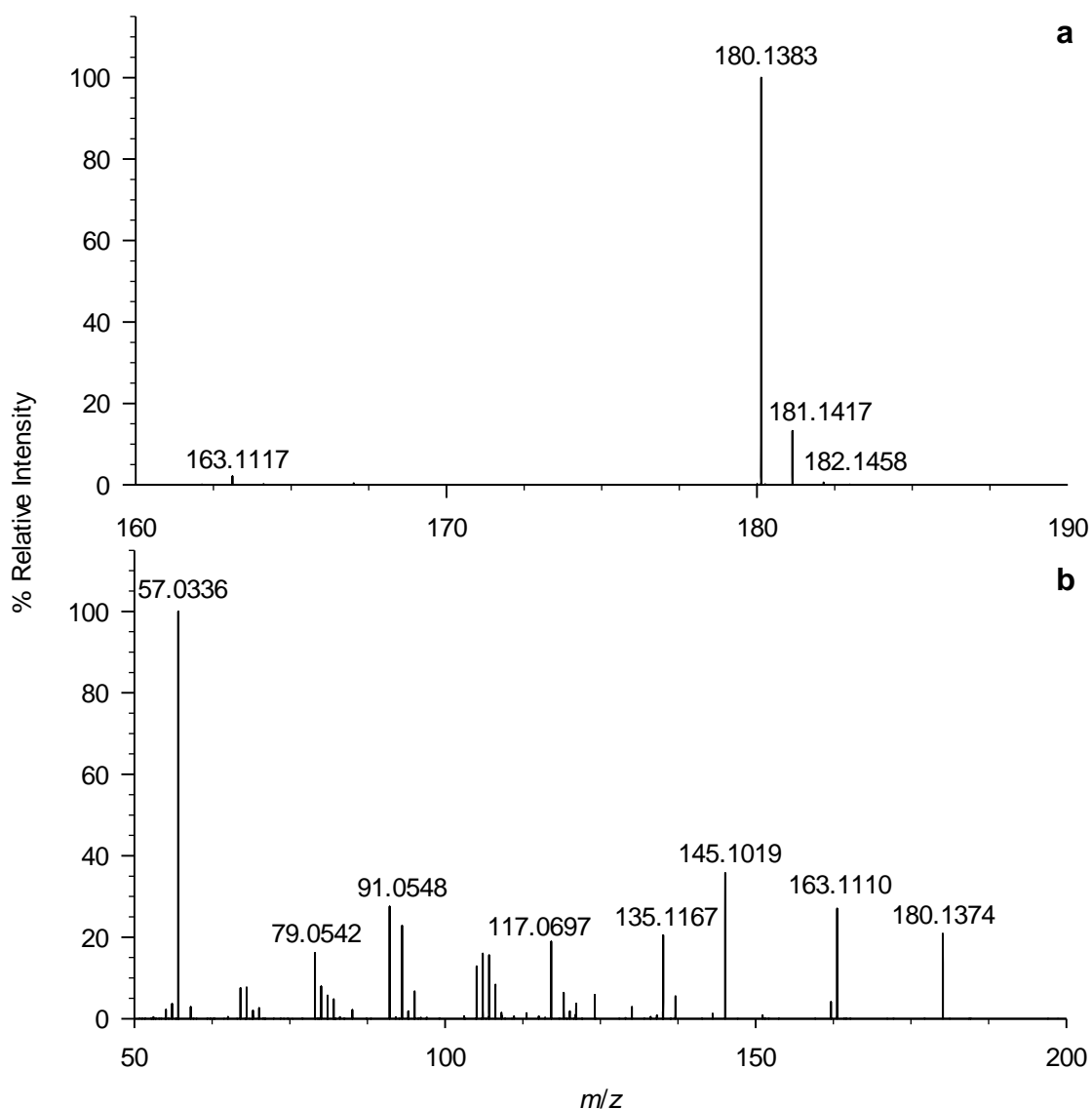
Le CNRC est l'institut national de métrologie (INM) du Canada et est signataire de l'Arrangement de reconnaissance mutuelle du Comité international des poids et mesures (CIPM MRA). Le CIPM MRA a été développé en réponse à un besoin croissant d'un système ouvert, transparent et complet pour donner aux utilisateurs des informations quantitatives fiables sur la comparabilité des services nationaux de métrologie et de fournir la base technique des accords plus larges négociés pour les échanges internationaux, le commerce et les affaires réglementaires. Notre Système de gestion de la qualité pour les services de mesure et les matériaux de référence certifiés est conforme aux exigences des normes ISO/IEC 17025 et ISO 17034.

## Références

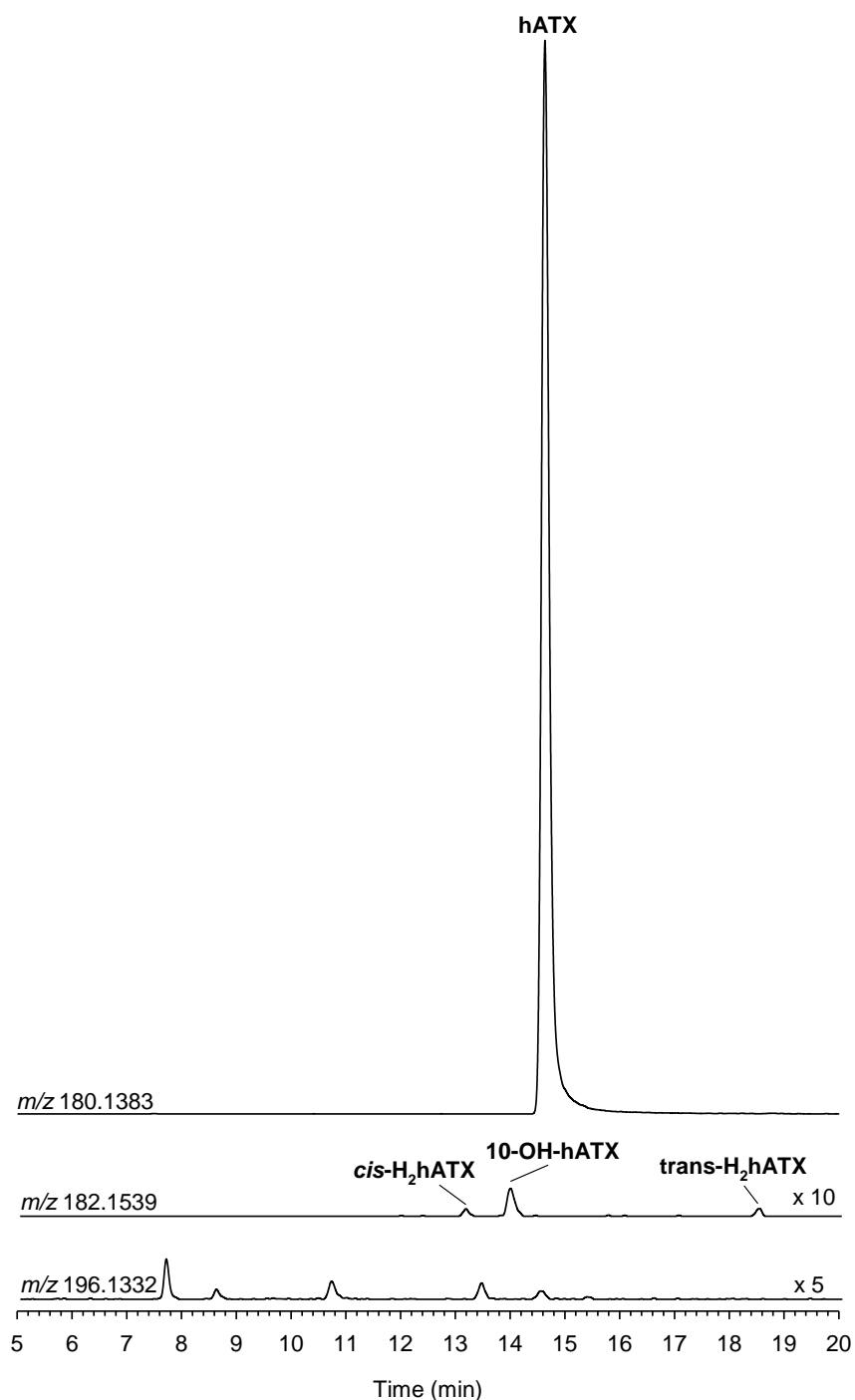
1. McCarron P, Rafuse C, Scott S, Lawrence J, Bruce MR, Douthwright E, Murphy C, Reith M, Beach DG. Anatoxins from benthic cyanobacteria responsible for dog mortalities in New Brunswick, Canada. *Toxicon*. 2023; 227:107086. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107086>
2. Wood SA, Selwood AI, Rueckert A, Holland PT, Milne JR, Smith KF, Smits B, Watts LF, Cary CS. First report of homoanatoxin-a and associated dog neurotoxicosis in New Zealand. *Toxicon*. 2007; 50 (2): 292-301. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.03.025>
3. Skulberg OM, Carmichael WW, Andersen RA, Matsunaga S, Skulberg R. Investigations of a neurotoxic oscillatoriacean strain (Cyanophyceae) and its toxin. Isolation and characterization of homoanatoxin-a. *Environ Toxicol Chem*. 1992; 11 (3): 321-329. <https://doi.org/10.1002/etc.5620110306>
4. Beach DG, Zamlynny L, MacArthur M, Miles CO. Liquid Chromatography–High-Resolution Tandem Mass Spectrometry of Anatoxins, Including New Conjugates and Reduction Products. *Anal Bioanal Chem*. 2023; 415 : 5281-5296. <https://doi.org/10.1007/s00216-023-04836-y>
5. D'Agostino PM, Boundy MJ, Harwood TD, Carmichael WW, Neilan BA, Wood SA. Re-evaluation of paralytic shellfish toxin profiles in cyanobacteria using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Toxicon*. 2019; 158 : 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.11.301>
6. Thomas K, Wechsler D, Chen YM, Crain S, Quilliam MA. Analysis of natural toxins by liquid chromatography-chemiluminescence nitrogen detection and application to the preparation of certified reference materials. *J AOAC Int*. 2016; 99 (5): 1173-1184. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0146>
7. Burton IW, Quilliam MA, Walter JA. Quantitative <sup>1</sup>H NMR with external standards: Use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products. *Anal Chem*. 2005; 77 (10): 3123-3131. <https://doi.org/10.1021/ac048385h>
8. Thomas K, Selwood A, Wood S, Chen YM, Crain S, Walter JA, Quilliam M. CRM-ATX, a certified calibration solution reference material for anatoxin-a. *Rapport technique de Métrologie*

*des biotoxines* : CRM-ATX-20100721 (NRCC no : 51829); 2011. <https://nrc-digital-repository.canada.ca/fra/voir/objet/?id=28563f77-efca-4cb8-a6ff-efea89089840>

9. JCGM 100:2008. Évaluation des données de mesure – Guide pour l’expression de l’incertitude de mesure. Comité commun pour les guides en métrologie (JCGM); 2008. <https://doi.org/10.59161/JCGM100-2008F>



**Figure 1 :** Spectre de masse en balayage complet (a) et de dissociation induite par collision (SM/SM) (b), obtenus au moyen d'une analyse par CL-SMHR de l'hATX utilisée pour la préparation du CRM-hATX, à l'aide d'un spectromètre de masse Thermo QExactive-HF en mode positif. Toutes les données ont été acquises avec une résolution de 120 000. Les données de SM/SM ont été acquises en mode suivi de réactions en parallèle à une énergie de collision de 35 eV.



**Figure 2:** Analyse CL-SMHR du CRM-hATX à l'aide d'un instrument CL Agilent 1200 couplé à un spectromètre de masse QExactive-HF. Conditions de CL : Waters Acquity 1,8  $\mu\text{m}$  HSS T3 (2,1 mm x 150 mm) à 40 °C; phase mobile : 0,1 % d'acide formique dans l'eau (A) et dans l'acétonitrile (B); gradient 0,2 mL/min d'élution de 2 % à 11 % de B en 25 min, à 25,1 min, B a augmenté à 95 % et s'est maintenu à 30 min, suivi d'un rééquilibrage de 10 min à 2 % de B; volume d'injection de 0,2  $\mu\text{L}$ . Chromatogrammes d'ions extraits ( $\pm 5$  ppm) montrant hATX, 10-OH-hATX, *cis*-H<sub>2</sub>hATX, *trans*-H<sub>2</sub>hATX et les produits d'oxydation de hATX à *m/z* de 196,1332.

## Auteurs

Daniel G. Beach, Callie J. McAulay, Krista M. Thomas, Sabrina D. Giddings et Pearse McCarron.

Centre de recherche en métrologie, Conseil national de recherches du Canada, 1411, rue Oxford, Halifax (Nouvelle-Écosse) B3H 3Z1, Canada

## Remerciements

Les membres du personnel du CNRC suivants ont contribué à la production et à la certification du CRM-hATX : Daniel G. Beach, Sheila M. Crain, Sabrina D. Giddings, Patricia LeBlanc, Callie J. McAulay, Pearse McCarron, Christopher O. Miles, Elizabeth M. Mudge, Ruth A. Perez Calderon, Cheryl Rafuse, Kelley L. Reeves, Krista M. Thomas et Lydia Zamlyny.

Date d'émission : décembre 2024

Version du document : 20241202

Approuvé par :

\_\_\_\_\_  
Pearse McCarron, Ph. D.  
Chef d'équipe, Métrologie des biotoxines

Ce certificat est valide uniquement si le matériau correspondant a été obtenu directement auprès du CNRC ou d'un revendeur autorisé. Les utilisateurs doivent s'assurer que le certificat à leur disposition est à jour. Pour les mises à jour, veuillez consulter le site suivant : [doi.org/10.4224/crm.2024.hatx.20230928](https://doi.org/10.4224/crm.2024.hatx.20230928).

**Veillez adresser tout commentaire, renseignement ou demande au :**

Conseil national de recherches du Canada  
Centre de recherche en métrologie  
1411, rue Oxford  
Halifax (Nouvelle-Écosse) B3H 3Z1

**Téléphone :** 902-426-8281

**Télécopieur :** 902-426-5426

**Courriel :** [CRM.sales-ventes.MRC@nrc-cnrc.gc.ca](mailto:CRM.sales-ventes.MRC@nrc-cnrc.gc.ca)

The logo for Canada, featuring the word "Canada" in a serif font with a small Canadian flag above the letter "a".