



Certificat d'analyse

Matériau de référence certifié

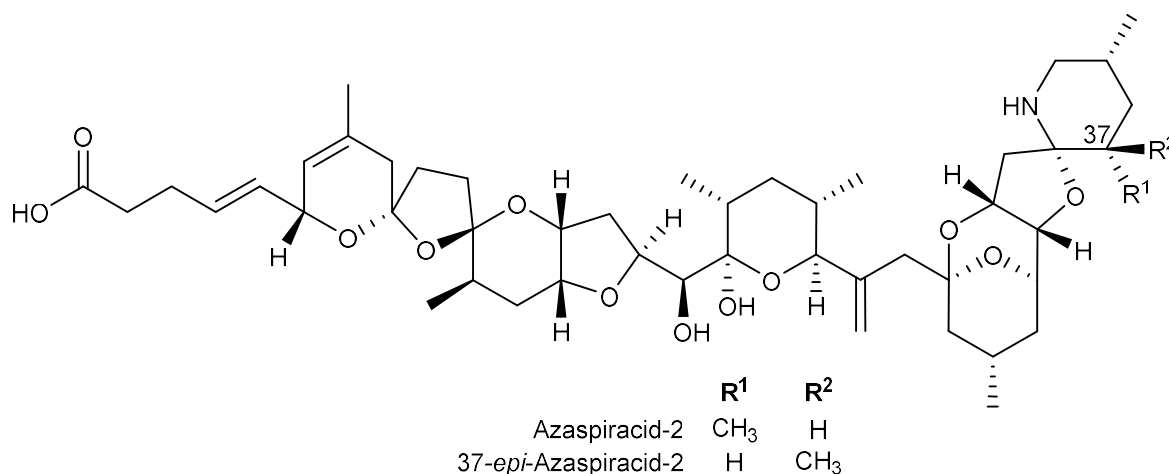
CRM-AZA2-C (Lot numéro 20220623)

Solution d'étalonnage certifiée pour l'azaspiracide-2

Les azaspiracides (AZA) constituent une classe puissante de toxines algales produites par le dinoflagellé *Azadinium spinosum* [1]. Les symptômes d'intoxication peuvent comprendre des nausées, des crampes d'estomac, des maux de tête, des vomissements et de la diarrhée. Les AZA possèdent des structures spiranniques uniques avec des entités carboxyles et amines [2,3]. Le CRM-AZA2-c est une solution d'étalonnage certifiée d'AZA2 dans du méthanol qui remplace le CRM-AZA2-b de 2014.

Tableau 1 : Concentration certifiée et incertitude pour le CRM-AZA2-c.

Composé	µg/g	µg/mL (entre 15 et 30 °C)	µmol/L (entre 15 et 30 °C)
Azaspiracide-2 (somme AZA2 + 37-épi-AZA2)	1,51 ± 0,08	1,19 ± 0,06	1,39 ± 0,07



Azaspiracide-2

Numéro CAS : 265996-92-7

InChIKey : FWMJPUBOGPIFOU-ITRIPTHSSA-N

Formule moléculaire : C₄₈H₇₃NO₁₂

Masse moléculaire : 856,1 g/mol

[M+H]⁺ : m/z 856,5206

Période de validité : 1 an après la date de vente.

Conditions de stockage : -12 °C ou moins

Utilisation prévue

Le CRM-AZA2-c est une solution d'étalonnage certifiée conçue pour le développement de méthodes d'analyse et le dosage précis de l'AZA2. La concentration convient à la préparation d'une série de dilutions pour l'étalonnage d'instruments, comme la chromatographie en phase liquide avec détection par spectrométrie de masse (CPL-SM), ainsi que le dopage d'échantillons de contrôle à des fins de calculs de taux de récupération.

Instructions pour le stockage et l'utilisation

Pour assurer la stabilité du CRM-AZA2-c, les ampoules doivent être conservées à une température de -12 °C ou moins.

Il est à noter que le volume de la solution n'est pas certifié; seule sa concentration l'est. Le contenu de l'ampoule ne devrait donc pas être simplement transféré dans un contenant volumétrique, puis dilué.

Avant d'ouvrir une ampoule, il faut la laisser revenir à la température ambiante et bien mélanger son contenu. Un dispositif étalonné devrait être utilisé pour faire des transferts précis de la solution de matériau de référence certifié (MRC). Le sous-échantillonnage répété et le stockage de la solution de MRC une fois ouverte peuvent influencer sur ses valeurs de concentration. Les utilisateurs peuvent cependant tenter de démontrer que leurs procédures de sous-échantillonnage et de stockage n'ont aucune incidence sur les concentrations.

Préparation du CRM-AZA2-c

L'azaspiracide-2 a été obtenu auprès du Marine Institute (Rinville, Oranmore, Co. Galway, Irlande). Sa structure et sa pureté ont été confirmées par CPL-SM (figures 1 et 2), CPL avec détection des aérosols chargés (CPL-DAC) et spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) unidimensionnelle et bidimensionnelle. Une valeur précise de m/z de 856,5186 ($\Delta = 2,3$ ppm pour $C_{48}H_{74}NO_{12}^+$) a été obtenue pour l'ion $[M+H]^+$ de l'AZA2 par CPL-SM haute résolution (CPL-SMHR).

La solution mère a été préparée en dissolvant l'AZA2 purifié dans du CD_3OD , à des fins de dosage par RMN de 1H (RMNq) [4]. La solution de CRM-AZA2-c a été préparée en diluant avec précision la solution mère dans du méthanol de haute pureté dégazé. Des aliquotes ont été mises dans des ampoules en verre ambré préalablement remplies d'argon, immédiatement scellées à la flamme. Chaque ampoule contient environ 0,5 mL de solution.

Méthodes d'analyse et attribution de valeur

La valeur certifiée du CRM-AZA2-c (tableau 1) est basée sur les résultats obtenus au Conseil national de recherches du Canada (CNRC) par RMNq avec de l'acide benzoïque pour l'étalonnage et par CPL-SM/SM avec le CRM-AZA2-b comme substance étalon.

Le CRM-AZA2-c comporte de faibles concentrations d'AZA1 et d'AZA3 qui, ensemble, représentent environ 1,2 % de la concentration d'AZA2. La proportion de 37-épi-AZA2 est d'environ 5 % de la concentration totale d'AZA2 et de 37-épi-AZA2.

Homogénéité

Un nombre représentatif d'ampoules de CRM-AZA2-c a été sélectionné parmi la série d'ampoules produites, et les concentrations d'AZA2 ont été déterminées par CPL-SM/SM. Aucune hétérogénéité n'a pu être mise en évidence.

Stabilité

Les études de stabilité réalisées sur l'AZA2 dans du méthanol ont démontré une bonne stabilité dans le cas d'ampoules scellées et stockées à une température de -12 °C ou moins.

Incertitude

Toutes les sources raisonnables d'incertitudes liées à la caractérisation du CRM-AZA2-c ont été prises en compte et mesurées. L'incertitude totale estimée (U_{CRM}) comprend les incertitudes associées à la caractérisation du lot (u_{char}) et à l'instabilité lors du stockage (u_{stab}) [5]. Ces éléments sont donnés dans le tableau 2 et sont combinés et élargis 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 2 : Éléments d'incertitude pour la valeur certifiée du CRM-AZA2-c.

Incertitudes	Relative*
u_{char}	0,025
u_{hom}	négligeable
u_{stab}	0,005

* Relative à la concentration donnée dans le tableau 1.

Consignes de sécurité

Seules des personnes qualifiées devraient manipuler cette solution, et des méthodes d'élimination appropriées devraient être employées. Il faut porter un équipement de protection individuelle approprié lors de l'ouverture d'une ampoule, en cas de bris du verre. Une fiche de données de sécurité (FDS) est disponible pour le CRM-AZA2-c.

Période de validité

Quand l'ampoule non ouverte est conservée à la température recommandée de -12 °C, la concentration certifiée de la solution de CRM-AZA2-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'un étalon préparé par gravimétrie d'un MRC d'acide benzoïque (PS1) du NIST et de CRM-AZA2-b (lot numéro 20131126) du CNRC.

Système de gestion de la qualité (ISO 17034, ISO/CEI 17025)

Ce matériau a été produit conformément au Système de gestion de la qualité de Métrologie du Conseil national de recherches du Canada (CNRC), qui est conforme aux exigences des normes ISO 17034 et ISO/CEI 17025.

Le Système de gestion de la qualité de Métrologie qui appuie les aptitudes en matière de mesures et d'étalonnages du CNRC, telles qu'indiquées dans la base de données des 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 s'est avéré conforme aux attentes de l'Arrangement de reconnaissance mutuelle du Comité international des poids et mesures (CIPM). L'approbation SIM est disponible sur demande.

Références

1. 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 (1):63-79. doi:10.1080/09670260802578534
2. Satake M, Ofuji K, Naoki H, James KJ, A. F, 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* 120:9967-9998. doi:10.1021/ja981413r
3. Kenton NT, Adu-Ampratwum D, Okumu AA, McCarron P, Kilcoyne J, Rise F, Wilkins AL, Miles CO, Forsyth CJ (2018). Stereochemical Definition of the Natural Product (6R,10R,13R,14R,16R,17R,19S,20S,21R,24S,25S,28S,30S,32R,33R,34R,36S,37S,39R)-Azaspiracid-3 by Total Synthesis and Comparative Analyses. *Angewandte Chemie* 57 (3):810-813. doi:10.1002/anie.201711008
4. 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. doi:10.1021/ac048385h
5. Pauwels J, Lamberty A, Schimmel H (2000). Evaluation of uncertainty of reference materials. *Accreditation and Quality Assurance* 5:95-99. doi:10.1007/s 007690050020

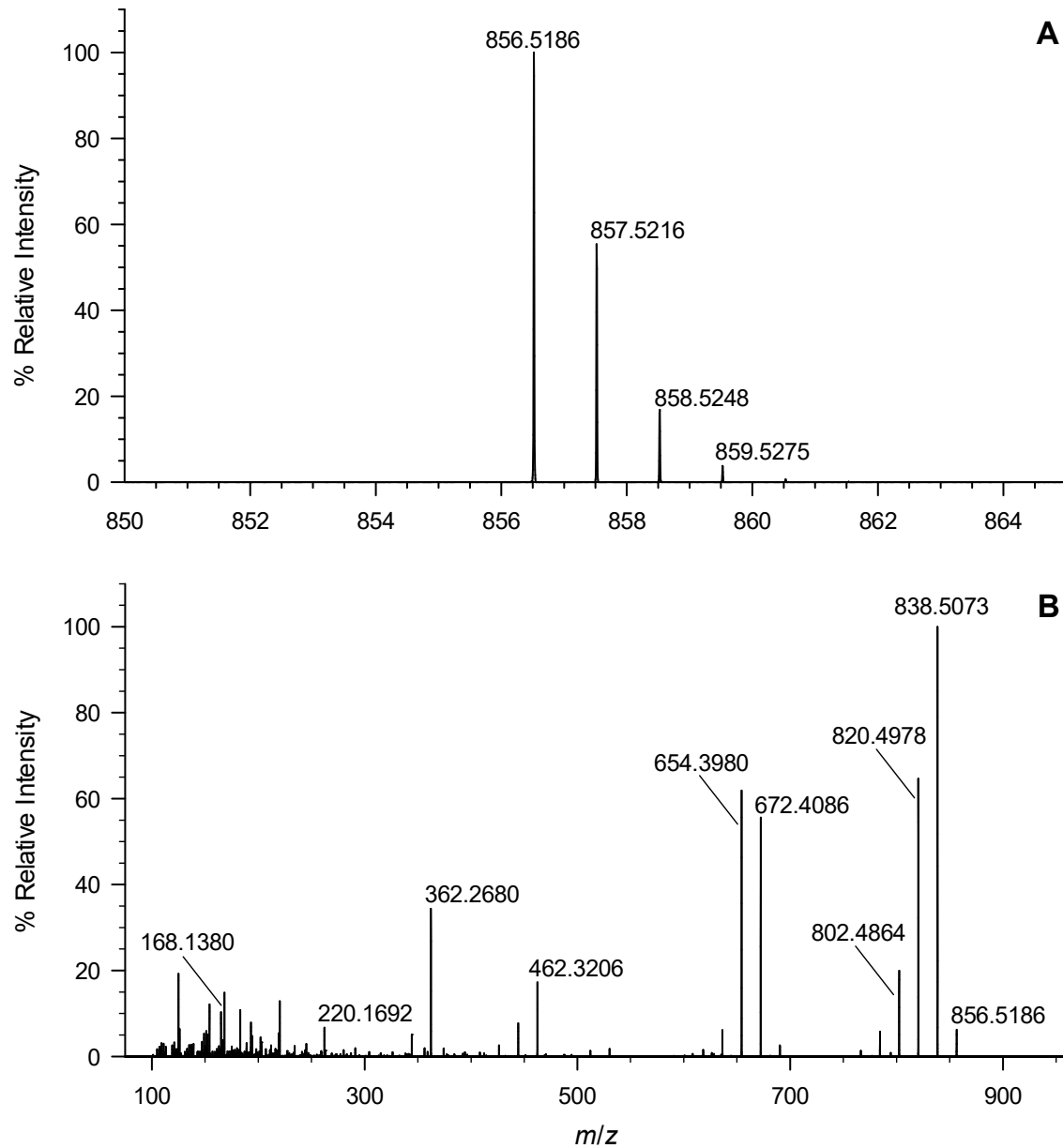


Figure 1 : Spectres de CPL-SMHR en balayage complet (A) et en dissociation induite par collision (SM/SM) (B) de l'AZA2 utilisés pour la préparation du CRM-AZA2-c, obtenus avec un spectromètre de masse Q Exactive-HF muni d'une sonde d'ionisation à électropulvérisation chauffée. Les données ont été collectées en mode positif avec une tension d'électropulvérisation de 3000 V, une température de capillaire de +350 °C et une température de chauffage de +300 °C. Les données en balayage complet ont été acquises avec une résolution de 120 000. Des données en SM/SM ont été acquises en mode balayage de suivi de réactions en parallèle à la même résolution et à une énergie de collision normalisée de 60, 65 et 70 V.

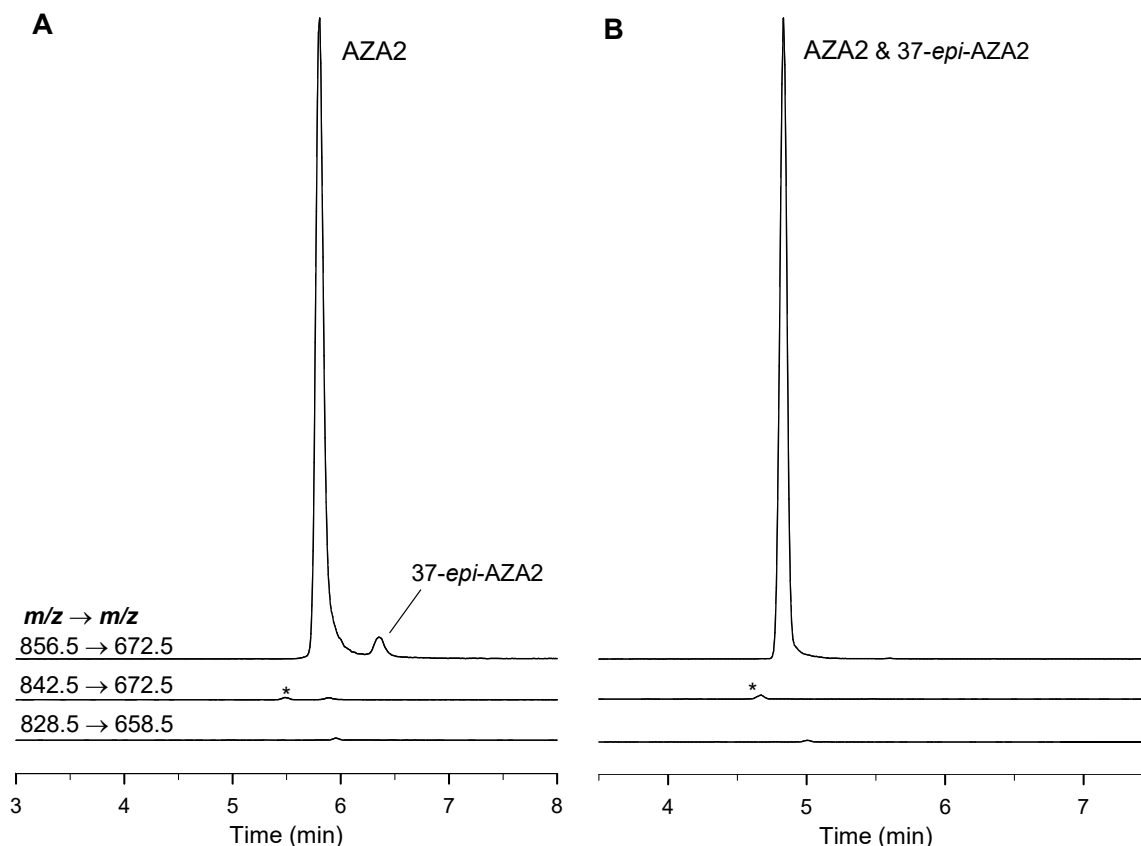


Figure 2 : Analyse par CPL-SM/SM du CRM-AZA2-c utilisant deux phases mobiles à pH neutre (A) et acide (B), montrant la résolution et la co-élution de l’AZA2 et du 37-épi-AZA2, respectivement. L’astérisque (*) désigne l’AZA1. Conditions : Les deux méthodes reposent sur une colonne de 2,5 μm Luna C18(2) de 50 sur 2,1 mm avec des volumes d’injection de 1 μL . Méthode à pH neutre : phase mobile : acétate d’ammonium 5 mM (pH 6,8) à la fois dans de l’eau désionisée (a) et dans une solution constituée à 95 % d’acétonitrile (b); gradient : 25-100 % de b pendant 5 min, 350 $\mu\text{L}/\text{min}$ à +20 °C. Méthode à pH acide : phase mobile : formate d’ammonium 2 mM et acide formique 50 mM (pH 2,3) à la fois dans de l’eau désionisée (a) et dans une solution constituée à 95 % d’acétonitrile (b); gradient : 25-100 % de b pendant 5 min, 350 $\mu\text{L}/\text{min}$ à +20 °C.

Remerciements

Les membres suivants du personnel du CNRC ont contribué à la production et à la certification du CRM-AZA2-c : Beach D, Bouteiller P, Brown-Sweeting S, Crain S, Gray TA, Giddings SD, LeBlanc P, McAulay CJ, McCarron P, Miles CO, Mudge EM, Perez Calderon RA, Rafuse C, Reeves KL, Thomas K, Wright EJ et Zamlyny L.

Le présent document devrait être cité de la manière suivante :

Giddings SD, Wright EJ, McCarron P « CRM-AZA2-c, un matériau de référence d'une solution d'étalonnage certifiée pour l'azaspiracide-2 », Certificat d'analyse de Métrologie des biotoxines CRM-AZA2-c-20220623, Conseil national de recherches Canada, Halifax.

<https://doi.org/10.4224/crm.2022.aza2-c.20220623>

Date de délivrance : 20 décembre 2022

Version du document : 20221130

Approuvé par :



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, toute information ou toute requête à :

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

Téléphone : 1-902-426-8281

Télécopieur : 1-902-426-5426

Courriel : CRM-MRCHalifax@nrc-cnrc.gc.ca