Conseil national de recherches Canada | National Research Council Canada

Certificat d'analyse

Matériau de référence certifié

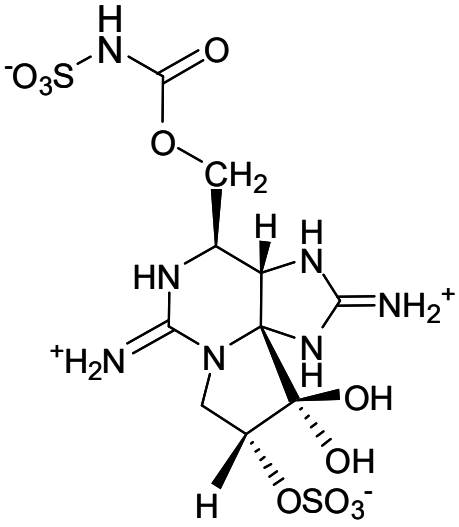
CRM-C1&2-c (Lot numéro 20201208)

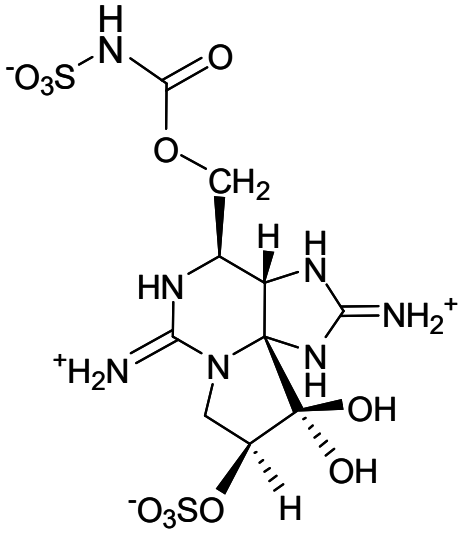
Solution d'étalonnage certifiée de *N*-sulfocarbamoylgonyautoxine-2 et -3

Les *N*-sulfocarbamoylgonyautoxine-2 et -3 (C1&2) sont des analogues de saxitoxine [1] présentes dans des microalgues marines [2] et des cyanobactéries d'eau douce [3]. Le CRM-C1&2-c est une solution d'étalonnage certifiée de C1 et de C2 dans de l'acide acétique dilué (20 µM, pH 5), conçu pour l'identification et le dosage du C1 et du C2. Il remplace la solution d'étalonnage CRM-C1&2-b.

Tableau 1 : Concentrations certifiées et incertitudes du CRM-C1&2-c.

Composé	µmol/L (15-30 °C)
C1	94,4 ± 6,8
C2	26,8 ± 1,9





_N_-Sulfocarbamoylgonyautoxine-2 (C1)

Numéro CAS : 80173-30-4 (base libre)
InChIKey : OKSSKVHGKYJNLL-XXKOCQOQSA-N
Formule moléculaire : $C_{10}H_{17}N_7O_{11}S_2$
Masse moléculaire : 475,4 g/mol

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

_N_-Sulfocarbamoylgonyautoxine-3 (C2)

Numéro CAS : 80226-62-6 (base libre)
InChIKey : OKSSKVHGKYJNLL-LJRZAWCWSA-N
Formule moléculaire : $C_{10}H_{17}N_7O_{11}S_2$
Masse moléculaire : 475,4 g/mol

Canada

Utilisation prévue

Le CRM-C1&2-c est une solution d'étalonnage certifiée conçue pour le développement de méthodes d'analyse et le dosage précis du C1 et du C2. Sa concentration convient à la préparation d'une série de dilutions pour l'étalonnage de systèmes tels qu'un système de chromatographie en phase liquide avec oxydation pré/post-colonne et détection de fluorescence (CPL-ox-FL) ou par spectrométrie de masse (CPL-SM), ainsi qu'au dopage d'échantillons à des fins d'analyse du taux de récupération.

Instructions pour le stockage et l'utilisation

Afin d'assurer la stabilité du CRM-C1&2-c, les ampoules devraient être stockées à -12 °C ou moins.

Avant d'ouvrir une ampoule, il faut la laisser revenir à la température ambiante et bien mélanger son contenu. Les ampoules doivent être ouvertes au niveau de la marque à cet effet. Pour assurer un transfert précis des aliquots, un dispositif étalonné devrait être utilisé. Une augmentation de la concentration due à l'évaporation du solvant se produira si l'ampoule de solution est laissée à l'air libre plus de quelques minutes. Il est recommandé de ne pas évaporer le MRC complètement en raison d'une perte potentielle sur les parois en verre. *Remarque* : le volume de la solution n'est pas certifié. Seule sa concentration l'est. Tout le contenu de l'ampoule ne devrait donc pas être simplement transféré dans une fiole jaugée et dilué au volume.

Préparation du CRM-C1&2-c

Les *N*-sulfocarbamoylgonyautoxine-2 et -3 (C1 et C2) ont été isolées d'une culture en laboratoire à grande échelle d'*Alexandrium tamarense*, puis purifiées en suivant plusieurs étapes chromatographiques [4]. La structure et la pureté du C1 et du C2 ont été confirmées par CPL-SM/SM [5,6] (figures 1 et 2) et par RMN de ^{1}H. Un *m*/*z* mesuré précis de 476,04998 (Δ = 0,2 ppm pour $C_{10}H_{18}N_7O_{11}S_2^+$) a été établi pour l'ion $[M+H]^+$ de C1 et C2 par CPL-SM haute résolution (CPL-SMHR). La pureté a été également vérifiée par CPL-ox-FL [7] (figure 3), électrophorèse capillaire avec détection UV (EC-UV) [8] et CPL avec détection de l'azote par chimiluminescence (CPL-CLN) [9].

La solution mère a été préparée en diluant le C1 et le C2 purifiés dans de l'acide acétique dilué (20 µM, pH 5) pour son dosage par RMN de ^{1}H-RMN (RMNq) [10]. La solution de CRM-C1&2-c a été préparée en faisant une dilution précise de la solution mère dans de l'acide acétique dilué dégazé (20 µM, pH 5). Des aliquotes ont été mises dans des ampoules en verre ambré remplies au préalable d'argon, qui ont été immédiatement scellées à la flamme. Chaque ampoule contient environ 0,5 mL de solution.

Méthodes d'analyse et détermination des concentrations

Les valeurs certifiées du CRM-C1&2-c (tableau 1) sont basées sur des résultats obtenus au CNRC au moyen de trois méthodes d'analyse : RMNq en utilisant de l'hydrogénophtalate de potassium (NIST SRM 84L) pour l'étalonnage; CPL-CLN en utilisant de la caféine (NMIA M724d) pour l'étalonnage; CPL-pcox-FL en utilisant le CRM-C1&2-b comme étalon.

À titre informatif, de faibles niveaux de décarbamoylgonyautoxine-2 (dcGTX2) et de décarbamoylgonyautoxine-3 (dcGTX3) ont été déterminés par CPL-ox-FL en utilisant comme étalons pour ces analogues des matériaux de référence certifiés du CNRC (tableau 2).

Tableau 2 : Valeurs informatives pour d'autres saxitoxines présentes dans le CRM-C1&2-c au moment du conditionnement.

Composé	$[M+H]^+$, *m/z*	Concentration (µmol/L)*
Décarbamoylgonyautoxine-2 (dcGTX2)	353,1	1,4
Décarbamoylgonyautoxine-3 (dcGTX3)	353,1	0,1

* Ces concentrations ne sont pas certifiées.

Homogénéité

Nous avons prélevé un nombre représentatif d'ampoules parmi la série d'ampoules produites et en avons déterminé les concentrations de C1 et de C2 par CPL-ox-FL. Aucune hétérogénéité n'a pu être mise en évidence.

Stabilité

Les études sur la stabilité des CRM-C1&2-b et -c ont montré une bonne stabilité du C1 et du C2 en solution aqueuse d'acide acétique (20 µM, pH 5) quand les ampoules scellées sont conservées à moins 12 °C ou moins.

Incertitude

Toutes les sources d'erreur raisonnables reliées à la caractérisation du CRM-C1&2-c ont été prises en compte et quantifiées. L'incertitude globale estimée (U_{CRM}) comprend les incertitudes associées à la caractérisation du lot (u_{char}), et à l'instabilité lors du stockage (u_{stab}) [11-14]. 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 des valeurs certifiées du CRM-C1&2-c.

Incertitudes	C1*	C2*
u_{char}	0,03	0,03
u_{hom}	négligeable	négligeable
u_{stab}	0,02	0,02

*Concentration relative à la concentration donnée dans le tableau 1.

Consignes de sécurité

En cas d'ingestion de quantités suffisantes, le C1, le C2 ou des toxines de ce type peuvent provoquer une paralysie et même la mort. Seules les personnes qualifiées devraient manipuler cette solution, et des méthodes appropriées d'élimination devraient être employées. Il faudrait porter un équipement de protection personnelle adéquat 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-C1&2-c.

Période de validité

Quand l'ampoule non ouverte est conservée à la température recommandée de -12 °C ou moins, les concentrations certifiées du CRM-C1&2-c sont valides pendant 1 an à partir de la date de vente.

Traçabilité métrologique

Les résultats présentés dans le présent certificat sont traçables dans le cadre du SI (*Système international d'unités*), au moyen d'étalons d'hydrogénophtalate de potassium MRC (NIST SRM 84L), de caféine MRC (NMIA M724c) et d'un MRC de C1 et de C2 (CRM-C1&2-b du CNRC), préparés par gravimétrie.

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. Hall S, Strichartz GR, Moczydlowski E, Ravindran A, Reichardt PB (1990). The saxitoxins: sources, chemistry, and pharmacology. In: Hall S and Strichartz GR (Eds) *Marine Toxins. ACS Symposium Series* 418: 29-65. Washington DC, *Am Chem Soc.*
2. Shumway SE (1990). A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. *J. World Aquacult Soc* 21 (2): 65-104.
3. D'Agostino PM, Boundy MJ, Harwood TD, Carmichael WW, Neilan BA, Wood SA (2019). Re-evaluation of paralytic shellfish toxin profiles in cyanobacteria using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Toxicon* 158: 1-7.
4. Laycock MV, Thibault P, Ayer SW, Walter JA (1994). Isolation and purification procedures for the preparation of paralytic shellfish poisoning toxin standards. *Nat Toxins* 2: 175-183.
5. Dell'Aversano C, Hess P, Quilliam MA (2005). Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. *J Chromatogr A* 1081: 190-201.
6. Thomas K, Beach DG, Reeves KL, Gibbs RS, Kerrin ES, McCarron P, Quilliam MA (2017). Hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for quantitation of paralytic shellfish toxins: validation and application to reference materials. *Anal Bioanal Chem* 409: 5675-5687.
7. Anon. AOAC Official Method 2011.02. Paralytic shellfish toxins in mussels, clams, oysters, and scallops; post-column oxidation (PCOX) method (2009). *Official Methods of Analysis* 18th Ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
8. Thibault P, Pleasance S, Laycock MV (1991). Analysis of paralytic shellfish poisons by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 542: 483-501.
9. Thomas K, Wechsler D, Chen YM, Crain S, Quilliam MA (2016). Analysis of natural toxins by liquid chromatography-chemiluminescence nitrogen detection and application to the preparation of certified reference materials. *J AOAC Int* 99: 1173-1184.
10. 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.
11. Pauwels J, Lamberty A, Schimmel H (2000). Evaluation of uncertainty of reference materials. *Accred Qual Assur* 5: 95-99.
12. 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.
13. Ellison SLR, Burke S, Walker RF, Heydorn K, Mansson M, Pauwels J, Wegscheider W, te Nijenhuis B (2001). Uncertainty for reference materials certified by interlaboratory study: Recommendations of an international study group. *Accred Qual Assur* 6: 274-277.
14. Evaluation of measurement data – Supplement 1 to the "Guide to the expression of uncertainty in measurement" (GUM) – Propagation of distributions using a Monte Carlo method. JCGM 101:2008, www.bipm.org.

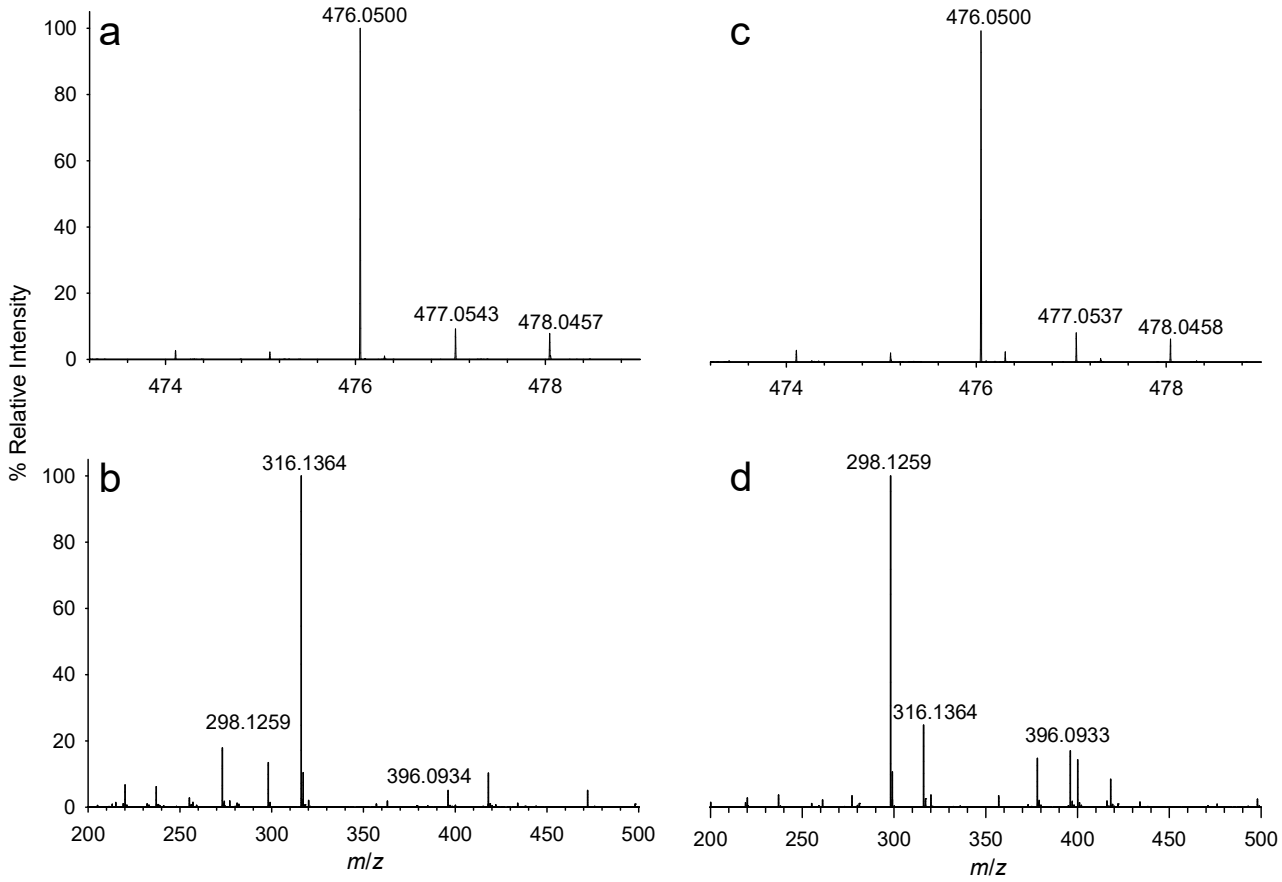


Figure 1 : Spectres de CPL-SMHR de C1 (a et b) et de C2 (c et d) en balayage complet avec dissociation induite par collision, utilisés pour l'analyse du CRM-C1&2-c, obtenus avec un spectromètre de masse Thermo QExactive-HF équipé d'une sonde chauffée à ionisation par électropulvérisation. Les données ont été collectées en mode positif avec une tension d'électropulvérisation de 2500 V, une température de capillaire de +275 °C et une température de chauffage de +375 °C. Les données en balayage complet ont été acquises avec un réglage de la résolution à 120 000. Des données en SM/SM ont été acquises en mode suivi de réactions parallèles avec la même résolution et une énergie de collision normalisée de 60 V.

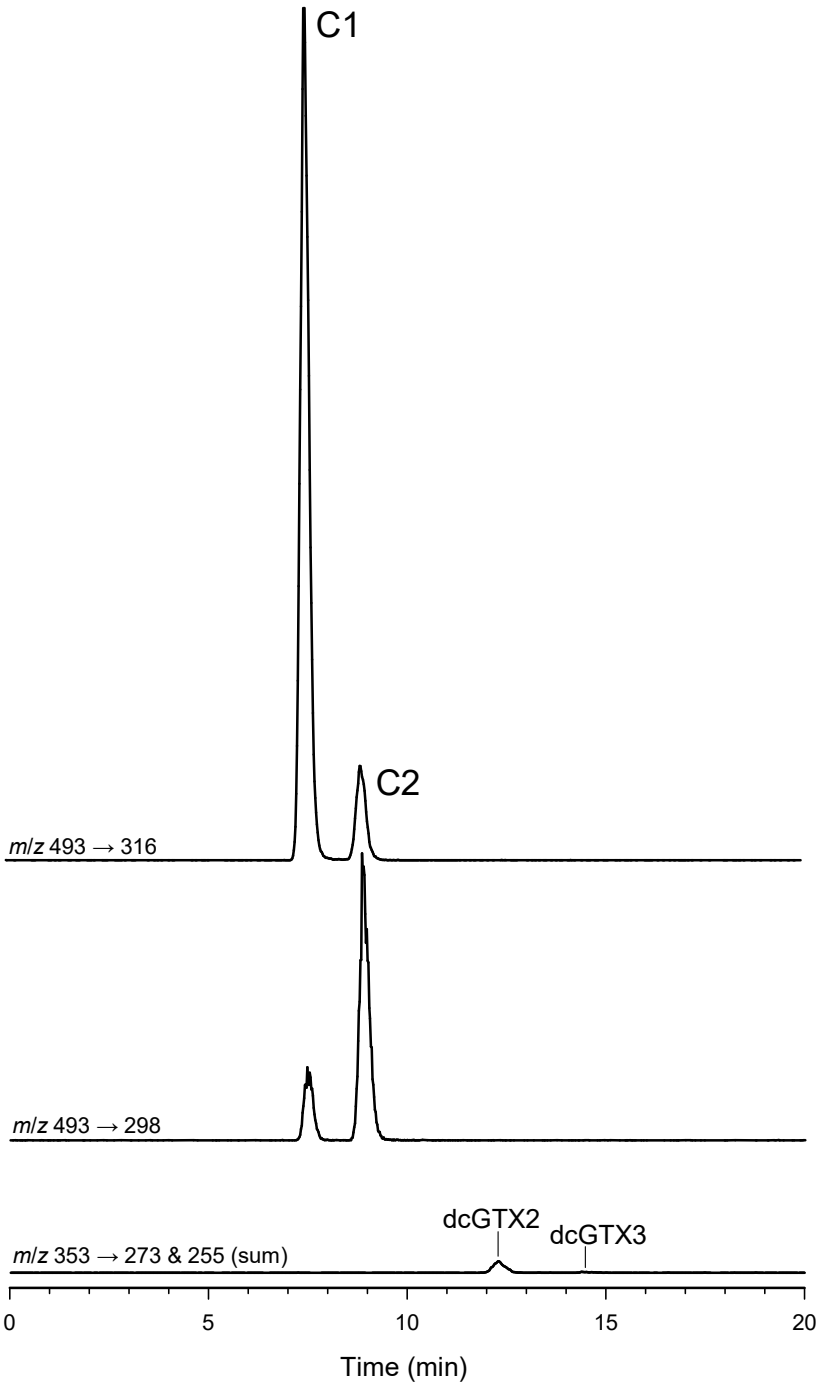


Figure 2 : Analyse par CPL-SM/SM du CRM-C1&2-c, en mode suivi de réaction choisie, avec un CPL Agilent 1260 connecté à un SM Sciex 4000 QTRAP avec ionisation par électropulvérisation. Conditions chromatographiques : colonne Toso-Haas Amide-80 (250 mm × 2 mm, 5 µm) à +40 °C; phase mobile : 70 % acétonitrile dans l'eau avec formate d'ammonium 2 mM et acide formique 50 mM, 0,3 mL/min; volume injecté : 1 µL. Conditions pour la SM : énergie de collision +25 V; potentiel de désagrégation + 40 V, température de la source +275 °C.

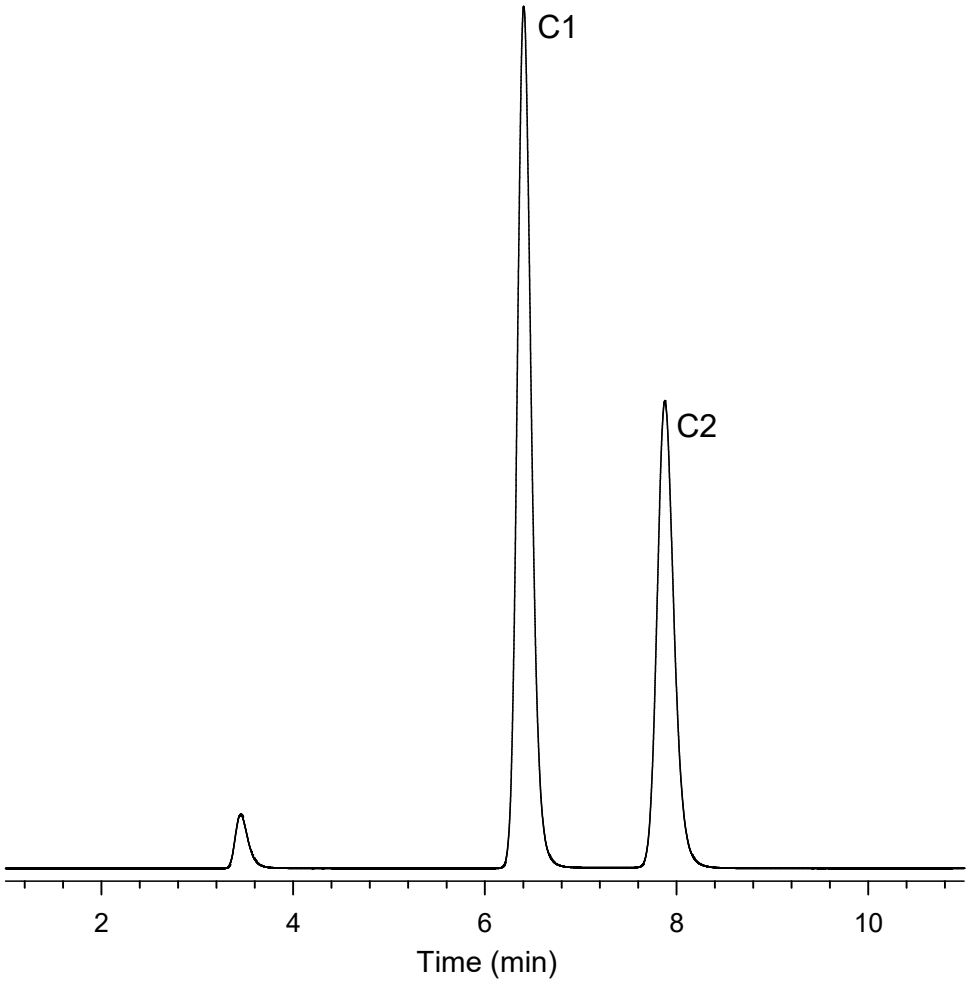


Figure 3 : Analyse par CPL-ox-FL du CRM-C1&2-c. Conditions : Thermo Beta Basic C8 250 × 4,6 mm d.i. à +10 °C; phase mobile : phosphate de tétrabutylammonium 2 mM dans l'eau (pH 7,1), 0,8 mL/min; volume injecté 5 µL; oxydation post-colonne : 0,4 mL/min d'acide périodique 5 mM dans du phosphate de sodium 100 mM à pH 7,8 avec boucle de réaction à +80 °C; effluent acidifié avec 0,4 mL/min d'acide nitrique 0,75 M; détection : fluorescence avec excitation à 330 nm et émission à 390 nm.

Remerciements

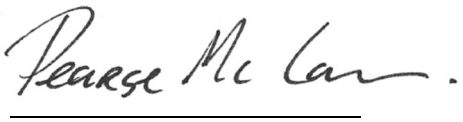
Les membres suivants du personnel du CNRC ont contribué à la production et à la certification du CRM-C1&2-c : Crain S, Giddings S, LeBlanc P, McCarron P, Mudge E, Perez Calderon RA, Reeves K, Thomas K et Wright E.

Le présent document devrait être cité de la manière suivante :

Thomas K, Reeves K, Giddings SD, McCarron P. “CRM-C1&2-c, a certified calibration solution reference material for N-Sulfocarbamoylygonyautoxin-2 and -3”, Biotoxin Metrology Technical Report CRM-C1&2-c-20201208, National Research Council Canada, Halifax.
DOI https://doi.org/10.4224/crm.2021.c1-2-c.20201208

Date de délivrance : mars 2021
Version du document : 20220606

Date de révision : juin 2022 (tableaux 1 et 3, DOI ajouté et mises à jour éditoriaux)

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 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

Canada