



Certificat d'analyse

Matériau de référence certifié

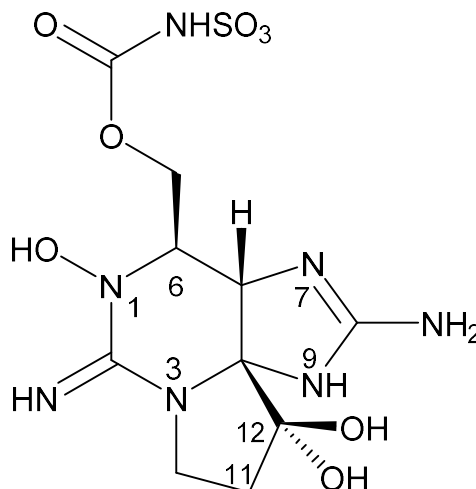
CRM-GTX6-b (lot n° 20181005)

Solution d'étalonnage certifiée pour la gonyautoxine-6

La gonyautoxine-6 (GTX6) est une toxine paralysante des mollusques et crustacés [1] que l'on trouve dans les microalgues marines [2] et les cyanobactéries d'eau douce [3]. Le CRM-GTX6-b est une solution d'étalonnage certifiée de GTX6 dans de l'acide acétique dilué (pH 6). Il est conçu comme solution pour l'étalonnage d'appareils à des fins d'identification et de dosage de la GTX6. Ceci est une solution de remplacement de la solution d'étalonnage CRM-GTX6.

Tableau 1: Concentration certifiée et incertitude du CRM-GTX6-b.

Composé	$\mu\text{mol/L}$ (à +20 °C)
GTX6	13,2 \pm 1,3



Gonyautoxine-6

N° CAS : 82810-44-4 (base libre)

InChIKey : ALRRPAKWGUBPBK-HGRQIUPRSA-N (base libre)

Formule moléculaire : C₁₀H₁₇N₇O₈S₁

Masse moléculaire : 395,35 g/mol

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

Conditions de stockage : -12 °C ou moins

Utilisation prévue

Le CRM-GTX6-b est une solution d'étalonnage certifiée conçue pour la mise au point de méthodes d'analyse et la quantification précise de la GTX6. La concentration convient à la préparation d'une série de dilutions pour l'étalonnage d'instruments d'analyse, comme la chromatographie en phase liquide avec détection par oxydation-fluorescence pré/post-colonne (CPL-ox-DFL) ou chromatographie en phase liquide avec spectrométrie de masse (CPL-SM), ainsi qu'au dopage d'échantillons de contrôle à des fins de mesures de taux de récupération.

Instructions pour le stockage et l'utilisation

Pour assurer la stabilité du CRM-GTX6-b, les ampoules devraient être conservées à -12 °C ou moins.

Avant d'ouvrir une ampoule, il faudrait 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. On devrait utiliser un équipement volumétrique étalonné pour transférer des aliquotes précises. Une augmentation de la concentration due à l'évaporation du solvant aura lieu si la solution est laissée à l'air libre au-delà de quelques minutes. Il est recommandé de ne pas faire évaporer totalement les solutions de ce matériau de référence certifié, pour éviter les pertes potentielles. *Remarque* : Le volume de la solution n'est pas certifié. Seule la concentration l'est. En conséquence, il ne faudrait pas simplement transférer le contenu total de l'ampoule dans une fiole jaugée, puis compléter cette dernière.

Préparation du CRM-GTX6-b

La gonyautoxine-6 a été isolée à partir de la biomasse cultivée d'*Alexandrium catenella*. L'extraction et l'isolation ont été effectuées à l'Institut Cawthron, en Nouvelle-Zélande. La purification finale par chromatographie préparative a été effectuée au Conseil national de recherches du Canada (CNRC) [4]. La structure et la pureté de la GTX6 ont été confirmées par CPL-SM/SM [5] (figures 1 et 2) et par RMN. Une m/z mesurée avec une précision de 396,0926 ($\Delta = -1,4$ ppm pour $C_{10}H_{18}N_7O_8S_1^+$) a été obtenue pour l'ion $[M+H]^+$ de la GTX6 en utilisant la CPL-SM haute résolution (CPL-SMHR). La pureté a été évaluée par CPL-ox-DFL [6] (figure 3), par électrophorèse capillaire avec UV (EC-UV) [7] et par chromatographie en phase liquide avec détection de l'azote par chimiluminescence (CPL-DNCL) [8]. Une concentration relativement faible de gonyautoxine-5 (GTX5) est présente dans le CRM-GTX6-b (tableau 2). Des quantités traces de gonyautoxine-1 et -4 ont également été détectées.

La solution mère a été préparée par dilution de la GTX6 purifiée dans du H₂O pour une mesure ¹H-RMN (RMNq) quantitative [9]. La solution du CRM-GTX6-b a été préparée par dilution précise de la solution mère RMNq dans de l'eau désionisée, dégazée et filtrée (0,2 µm), ajustée à un pH de 6 avec de l'acide acétique. Des aliquotes ont été transférées dans des ampoules propres en verre ambré préalablement remplies d'argon et immédiatement scellées à la flamme. Chaque ampoule contient environ 0,5 mL de solution.

Tableau 2 : Valeur à titre d'information de la GTX5 présente dans le CRM-GTX6-b, mesurée par CPL-SM.

Composé	$[M+H]^+$, m/z	Concentration (µmol/L)*
Gonyautoxine-5 (GTX5)	380,1	0,07

* La concentration n'est pas certifiée.

Méthodes d'analyse et attribution de valeur

La valeur certifiée pour le CRM-GTX6-b (tableau 1) est basée sur des résultats obtenus au CNRC au moyen de trois méthodes d'analyse : RMNq à l'aide de l'hydrogénophthalate de potassium (NIST SRM 84L) pour l'étalonnage [9]; CPL-DNCL à l'aide de la caféine (NMIA M724c) pour l'étalonnage [8]; et CPL-SM/SM à l'aide du CRM-GTX6 du CNRC pour l'étalonnage [5].

Homogénéité

Un nombre représentatif d'ampoules de CRM-GTX6-b a été prélevé parmi toutes les ampoules et la réponse de la GTX6 a été mesurée par CPL-SM/SM. Aucune hétérogénéité n'a été observée.

Stabilité

Les études réalisées sur le CRM-GTX6-b ont démontré une bonne stabilité, sans décomposition détectable à -12 °C ou à +4 °C après un stockage d'un mois.

Incertitude

Toutes les sources raisonnables d'erreur liées à la caractérisation du CRM-GTX6-b 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}) [10-13]. 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-GTX6-b.

Incertitudes	Relative*
u_{char}	0,05
u_{hom}	négligeable
u_{stab}	0,02

* Relative à la concentration indiquée dans le tableau 1.

Consignes de sécurité

L'ingestion d'une quantité suffisante de GTX6 et de toxines connexes peut provoquer une paralysie ou même la mort. Seules des personnes qualifiées devraient manipuler cette solution et des méthodes d'élimination appropriées devraient être suivies. Il faudrait porter un équipement de protection personnelle approprié quand on ouvre une ampoule en cas de brisure du verre. Une fiche de données de sécurité (FDS) est disponible pour le CRM-GTX6-b.

Période de validité

Si l'ampoule est conservée non ouverte dans la condition recommandée de -12 °C ou moins, la concentration certifiée du CRM-GTX6-b 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 préparés par gravimétrie à partir d'un matériau de référence certifié du NIST, l'hydrogénophthalate de potassium (NIST SRM 84L), un matériau de référence certifié de la NMIA, la caféine (NMIA M724c.2014.01), et un matériau de référence certifié pour la gonyautoxine-6 (CNRC CRM-GTX6).

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. Anon. AOAC Official Method 2011.02. Paralytic shellfish toxins in mussels, clams, oysters, and scallops; post-column oxidation (PCOX) method. *Official Methods of Analysis* (2009). 18th Ed. AOAC International, Gaithersburg, Maryland.
7. Thibault P, Pleasance S, Laycock MV (1991). Analysis of paralytic shellfish poisons by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 542: 483-501.
8. 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.
9. 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.
10. Pauwels J, Lamberty A, Schimmel H (2000). Evaluation of uncertainty of reference materials. *Accred Qual Assur* 5: 95-99.
11. 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.
12. 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.
13. Évaluation des données de mesure – Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure (GUM), JCGM 100:2008 (version corrigée, 2010), www.bipm.org. Imprimé sous le titre *ISO/IEC Guide 98-3:2008*, ISO Genève.

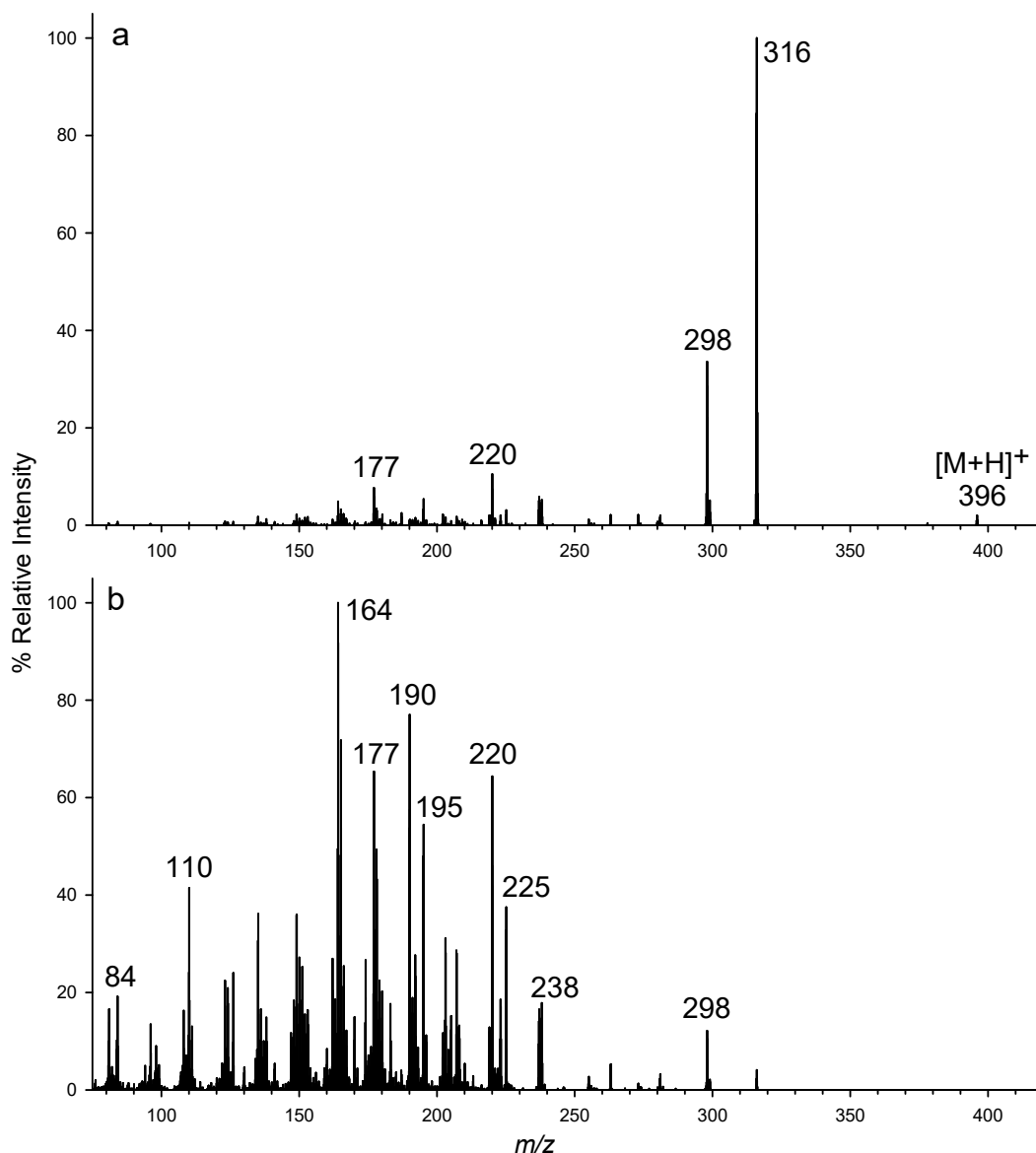


Figure 1 : Spectres de masse de dissociation induite par collision de l'ion $[M+H]^+$ (m/z 396) de la GTX6 obtenus avec un spectromètre de masse Sciex 4000 QTRAP avec ionisation par électronébulisation. Conditions pour la CPL : colonne Toso-Haas Amide-80 (250 mm \times 2 mm, 5 μ m) à +40 °C; phase mobile : 62 % d'acétonitrile dans de l'eau avec du formiate d'ammonium 2 mM et de l'acide formique 3,6 mM, 0,2 mL/min; volume d'injection : 1 μ L. Conditions du spectromètre de masse : énergies de collision de 30 V (a) et de 50 V (b); potentialité de défragmentation à +70 V, et température de la source de 475 °C.

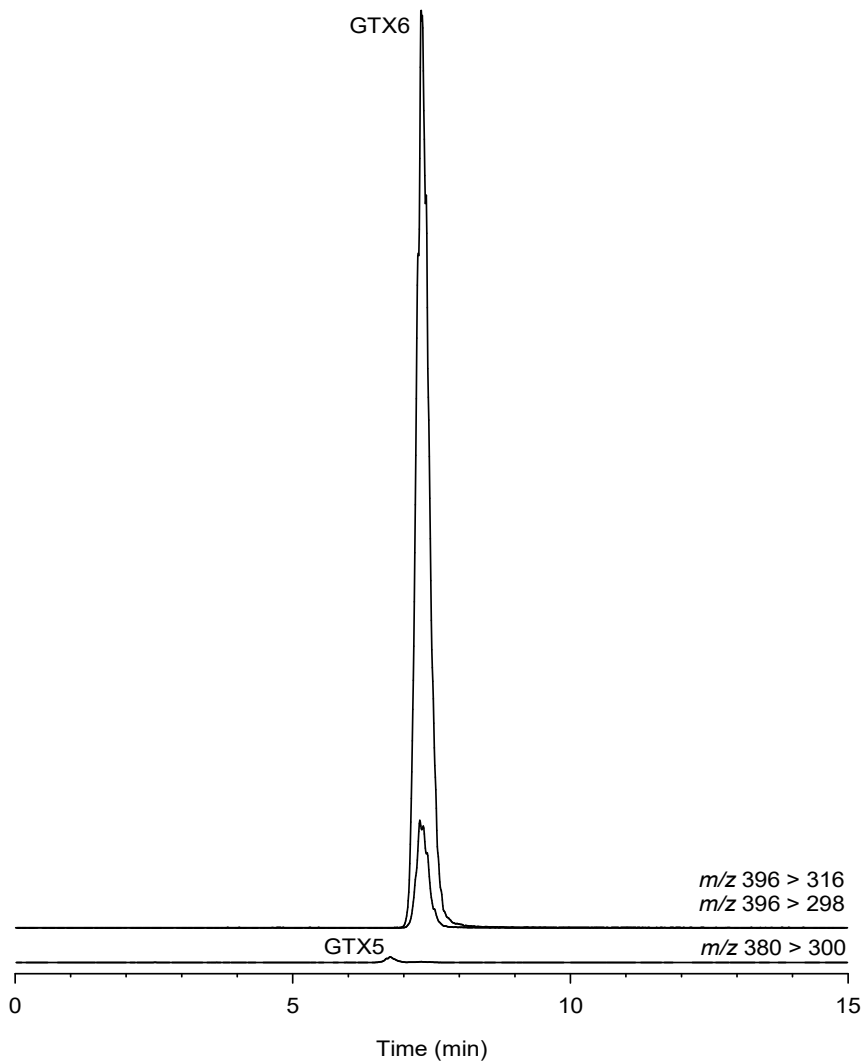


Figure 2 : Analyse par CPL-SM/SM du CRM-GTX6-b, avec la mesure de réactions sélectionnées sur un appareil CPL Agilent 1290 connecté à un SM Sciex 5500 QTRAP, avec ionisation par électronébulisation. Conditions pour la CPL : colonne Toso-Haas Amide-80 (250 mm × 2 mm, 5 µm) à +40 °C; phase mobile : 62 % d'acétonitrile dans de l'eau avec du formiate d'ammonium 2 mM et de l'acide formique 3,6 mM, 0,3 mL/min; volume d'injection : 5 µL. Conditions du SM : plage d'énergies de collision à 20-30 V; potentialité de défragmentation à +100 V et température de la source de 275 °C.

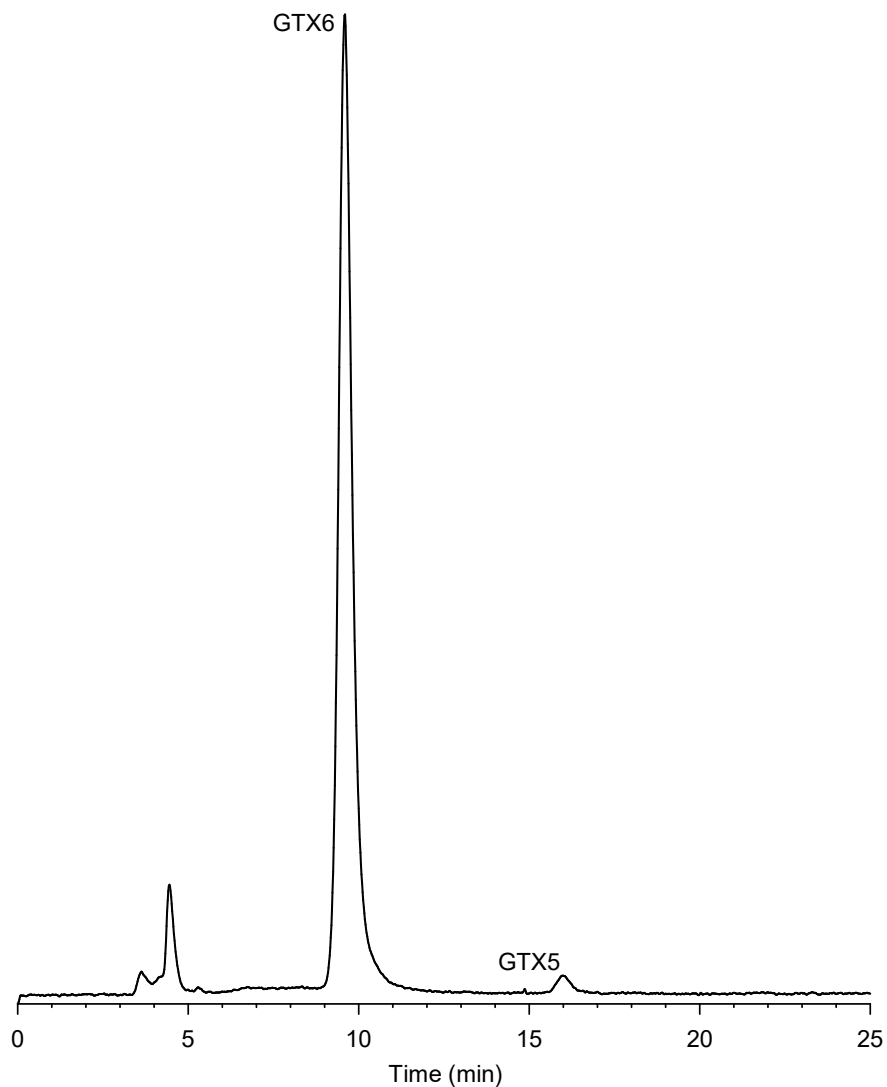


Figure 3 : Analyse par CPL-ox-DFL du CRM-GTX6-b. Conditions : colonne Zorbax Bonus-RP (250 mm × 4,6 mm d.i., 5 µm) à +35 °C; phase mobile : phosphate d'ammonium 5,5 mM avec sulfonate d'heptyle de sodium 11 mM dans de l'eau (pH 7,1), 0,8 mL/min; volume d'injection : 25 µL; oxydation post-colonne : 0,4 mL/min, acide périodique 5 mM dans du phosphate de sodium 100 mM à un pH de 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-GTX6-b : S. Crain, S. Giddings, P. LeBlanc, P. McCarron, R.A. Perez, E. Wright, M. MacArthur, I. Rajotte, C. Rafuse, C. Miles, E. Weir, K. Reeves et K. Thomas.

Le présent document devrait être cité de la manière suivante :

K. Reeves, K. Thomas, S. Crain, P. McCarron "CRM-GTX6-b, a certified calibration solution reference material for gonyautoxin-6", Biotoxin Metrology Technical Report CRM-GTX6-b-20181005, National Research Council Canada, Halifax.

DOI <https://doi.org/10.4224/crm.2019.gtx6-b.20181005>

Date de délivrance : Septembre 2019

Version du document : 20220310

Date de révision : mars 2022 (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 du Canada
1411, rue Oxford
Halifax (Nouvelle-Écosse) B3H 3Z1
Canada

Téléphone : 1-902-426-8281

Télécopieur : 1-902-426-5426

Courriel : CRM-MRCBiotoxin-Biotoxines@nrc-cnrc.gc.ca