Certificat d'analyse

CNRC·NRC Matériau de référence certifié

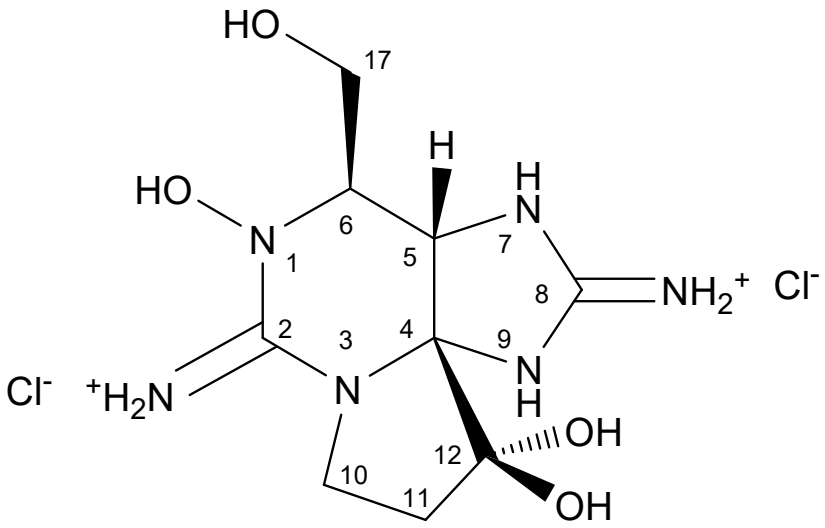
CRM-dcNEO-d (lot numéro 20170413)

Solution d'étalonnage certifiée pour la décarbamoylnéosaxitoxine

La décarbamoylnéosaxitoxine (dcNEO) est une des toxines responsables d'incidents d'intoxication par phycotoxine paralysante (IPP) [1]. Le CRM-dcNEO-d est une solution d'étalonnage d'instruments; certifiée et préparée afin d'aider les analystes à doser la dcNEO. Chaque ampoule contient une solution de dcNEO dissoute dans de l'acide chlorhydrique (HCl) aqueux 0,5 mM, filtré. Cette solution remplace la solution d'étalonnage CRM-dcNEO-c.

Tableau 1 : Valeur de la concentration certifiée pour le CRM-dcNEO-d.

Composé	µmol/L (à +25 °C)
dcNEO	30,4 ± 1,7



Dichlorhydrate de décarbamoylnéosaxitoxine
Numéro de registre du CAS : 68683-58-9 (base libre)
Formule moléculaire : $C_9H_{18}N_6O_4Cl_2$
Masse moléculaire : 345,2 g/mol

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

Utilisation prévue

Le CRM-dcNEO-d est une solution d'étalonnage de matériau de référence certifié (MRC) conçue pour le développement de méthodes d'analyse et le dosage précis de la dcNEO. La concentration convient à la préparation d'une série de dilutions pour l'étalonnage d'instruments tels qu'un système de chromatographie en phase liquide avec détection par oxydation-fluorescence post-colonne (CPL-ox-DFL) ou par chromatographie en phase liquide avec spectrométrie de masse (CPL-SM).

Instructions pour l'entreposage et l'utilisation

Afin d'assurer la stabilité du CRM-dcNEO-d, les ampoules devraient être conservées dans un congélateur (-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 ligne prélimée. Une fois l'ampoule ouverte, des aliquotes précises doivent être prélevées au moyen d'un dispositif volumétrique étalonné, puis transférées dans des fioles ou des flacons jaugés. 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 que quelques minutes. Il est recommandé de ne pas évaporer le MRC complètement en raison de pertes potentielles sur les parois en verre. *Veuillez noter :* Le volume de la solution n'est pas certifié; seule la concentration l'est. Il ne faut donc pas simplement transférer le contenu entier de l'ampoule dans une fiole jaugée, puis diluer.

Préparation du CRM-dcNEO-d

La NEO a été isolée d'une culture d'*Alexandrium tamarense* par chromatographie préparative [2]. La NEO purifiée a ensuite été convertie chimiquement en dcNEO, puis purifiée par chromatographie préparative, séchée sous vide et enfin dissoute dans du HCl aqueux 0,5 mM, filtré, pour obtenir une solution mère. La pureté de cette toxine a été vérifiée par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton à 500 MHz, CPL-ox-DFL [3] (figure 1), CPL-SM/SM [4] (figures 2 et 3), électrophorèse capillaire avec détection UV (EC-DUV) [5] et chromatographie en phase liquide avec détection de l'azote par chimiluminescence (CPL-DNCL) [6].

La solution de CRM-dcNEO-d a été préparée dans du HCl 0,5 mM, à pH 3,4, filtré (0,2 µm) et dégazé, puis distribuée dans des ampoules en verre ambré préalablement remplies d'argon. Ces ampoules ont ensuite été immédiatement scellées à la flamme. Chaque ampoule contient environ 0,5 mL de solution.

Méthodes d'analyse et détermination des valeurs

Les valeurs certifiées pour le CRM-dcNEO-d (tableau 1) sont basées sur des résultats obtenus au CNRC au moyen de deux méthodes d'analyse : RMN quantitative de ^{1}H (RMNq) avec solutions précises d'hydrogénophtalate de potassium (NIST SRM 84I) comme étalon [7], et CPL-DNCL avec des solutions précises de caféine (NMIA M724c) comme étalon.

De la néosaxitoxine (NEO) et de la décarbamoylsaxitoxine (dcSTX) sont présentes dans le CRM-dcNEO-d. Des valeurs à titre d'information ont été attribuées pour ces composés au moyen de la CPL-ox-DFL avec étalonnage au moyen de matériaux de référence certifiés du CNRC pour ces analogues (tableau 2).

Tableau 2 : Valeurs à titre d'information pour d'autres toxines IPP présentes dans le CRM-dcNEO-d au moment de l'emballage.

Composé	$[M+H]^+$, *m/z*	Concentration (µmol/L)*
Néosaxitoxine (NEO)	316,1	0,66*
Décarbamoylsaxitoxine (dcSTX)	257,1	0,25*

* Ces concentrations ne sont pas certifiées.

Homogénéité

Un nombre représentatif d'ampoules de CRM-dcNEO-d ont été prélevées parmi la série complète, et les concentrations de dcNEO ont été mesurées par CPL-ox-DFL. Les données ont été évaluées au moyen d'ANOVA.

Stabilité

Les études de stabilité ont démontré une bonne stabilité à long terme des solutions de dcNEO stockées dans des ampoules scellées à -20 °C, sans décomposition détectable pendant 12 mois. Il a été déterminé que la dcNEO démontre une bonne stabilité à +4 °C, sans décomposition détectable pendant un mois, dans les limites d'incertitude de la méthode d'analyse (CPL-SM, ÉTR de ± 3,8 % pour des injections multiples d'une même solution; n = 11).

Incertitude

Toutes les sources raisonnables d'erreur liées à la caractérisation du CRM-dcNEO-d ont été prises en compte et quantifiées. Un élément d'incertitude combiné lié aux deux méthodes d'analyse utilisées est inclus (u_{char}). L'estimation de l'incertitude globale (U_{CRM}) comprend des incertitudes associées à la caractérisation du lot (u_{char}), à l'homogénéité (u_{hom}) et à l'instabilité lors du stockage (u_{stab}) [8-11]. Ces éléments sont énumérés au 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 les valeurs certifiées de CRM-dcNEO-d.

Incertitudes	[µmol/L]
u_{char}	0,80
u_{hom}	0,16
u_{stab}	0,14

Consignes de sécurité

En cas d'ingestion de quantités suffisantes, les toxines responsables de l'IPP peuvent provoquer une paralysie ou même la mort. Seules les personnes qualifiées devraient manipuler la solution, et des mesures d'élimination appropriées devraient être prises. Il faut 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 de données de sécurité (FDS) est disponible pour le CRM-dcNEO-d.

Période de validité

Quand l'ampoule non ouverte est conservée à la température recommandée de -12 °C ou moins, la concentration certifiée du CRM-dcNEO-d 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 de pureté établie, préparés par gravimétrie.

Système qualité (ISO/CEI 17025, Guide ISO 34)

Ce matériel a été produit conformément au système qualité documenté de Science des mesures et étalons (SME) du Conseil national de recherches du Canada (CNRC), qui est conforme aux exigences de la norme ISO/CEI 17025 et du Guide ISO 34.

Le système qualité de SME, à l'appui des aptitudes en matière de mesures et d'étalonnages du CNRC énumérées dans la base de données sur les 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 jugé conforme aux attentes de l'arrangement de reconnaissance mutuelle du Comité international des poids et mesures (CIPM). Le certificat d'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. 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.
3. van de Riet J, Gibbs RS, Muggah PM, Rourke WA, MacNeil JD, Quilliam MA (2011). Liquid chromatography post-column oxidation (PCOX) method for the determination of paralytic shellfish toxins in mussels, clams, oysters, and scallops: collaborative study. *J AOAC Int* 94: 1154-1176.
4. Thomas KM, 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.
5. Thibault P, Pleasance S, Laycock MV (1991). Analysis of paralytic shellfish poisons by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 542: 483-501.
6. 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.
7. 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.
8. Pauwels J, Lamberty A, Schimmel H (2000). Evaluation of uncertainty of reference materials. *Accred Qual Assur* 5: 95-99.
9. 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.
10. 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.
11. Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM), JCGM 100:2008 (corrected version 2010), www.bipm.org. Printed as ISO/IEC Guide 98-3:2008, ISO Geneva.

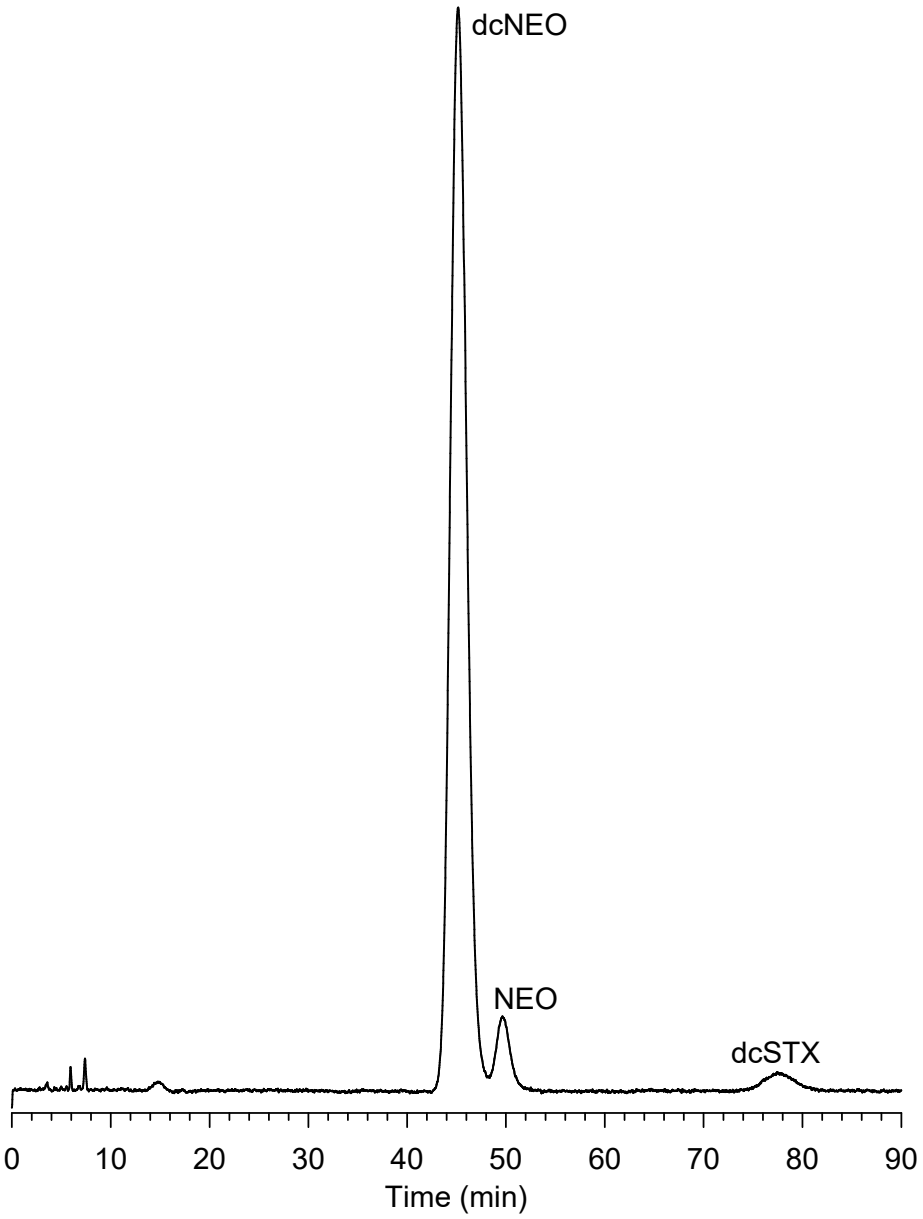


Figure 1 : Analyse par CPL-ox-DFL du CRM-dcNEO-d. Les temps de rétention de toxines apparentées sont indiqués. Conditions : colonne Zorbax Bonus-RP (250 × 4,6 mm d.i., 5 µm) à +10 °C; 1,0 mL/min de phosphate d'ammonium 18,9 mM avec du sulfonate d'heptyle de sodium 7,6 mM, pH 7,1 avec 2 % d'acétonitrile; volume injecté 25 µL; oxydation post-colonne avec 0,4 mL/min d'acide périodique 5 mM dans du phosphate de sodium 100 mM à pH 7,8; boucle de réaction à +80 °C; effluent acidifié avec de l'acide nitrique 0,75 M à 0,4 mL/min; détection par fluorescence avec excitation à 330 nm et émission à 390 nm.

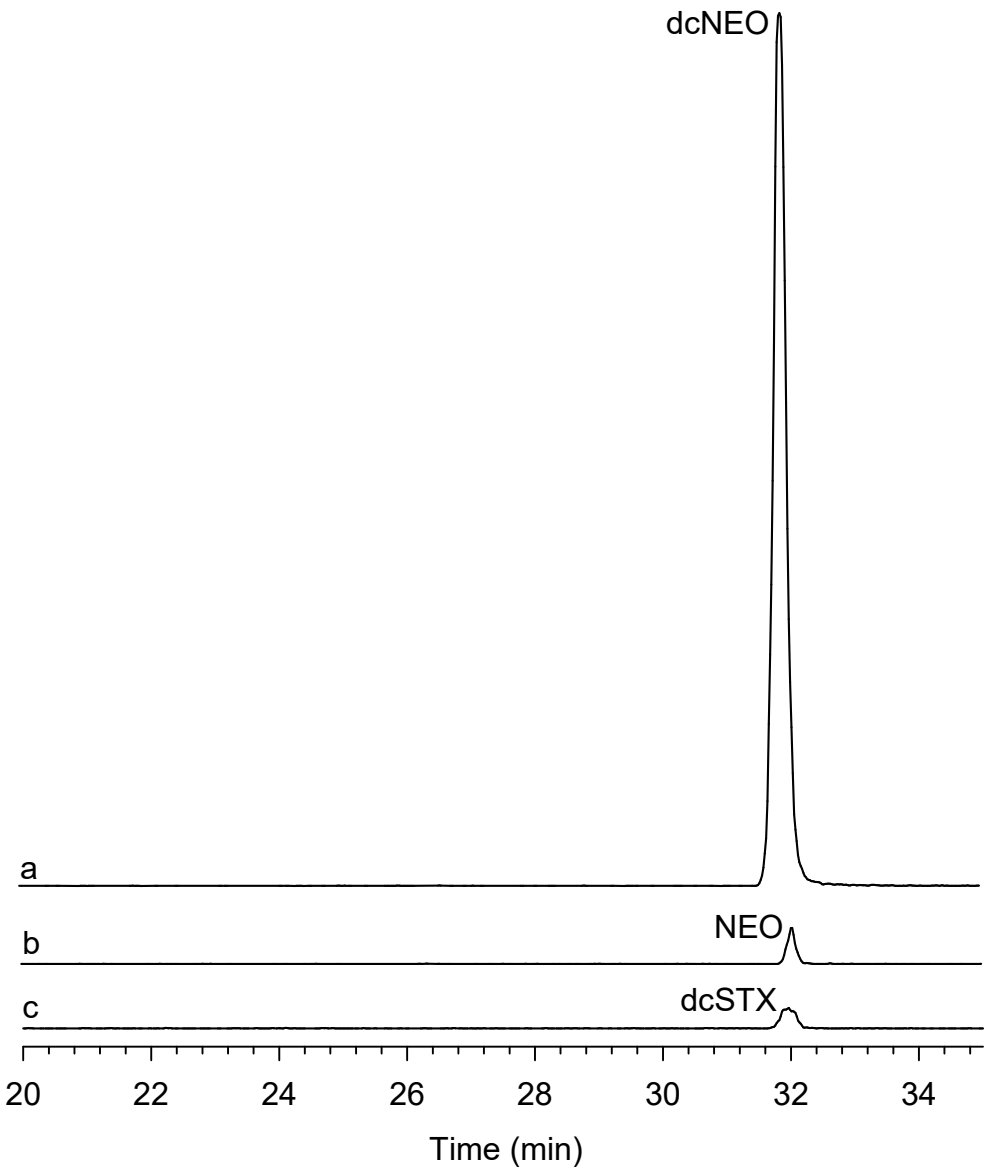


Figure 2 : Analyse par CPL-SM/SM du CRM-dcNEO-d avec la mesure de réactions sélectionnées : (a) signaux combinés pour *m/z* 273 > 190 et *m/z* 273 > 225; (b) signaux combinés pour *m/z* 316 > 177 et *m/z* 316 > 220; (c) signaux combinés pour *m/z* 257 > 180 et *m/z* 257 > 239. Conditions : CPL Agilent 1200 et SM Sciex API4000 QTRAP; volume injecté 2,5 µL; colonne TOSOH Amide-80 5 µm (250 mm × 2 mm d.i.) à 40 °C; élution à 0,2 mL/min avec gradient de 10 à 45 % de A en 25 min, maintien jusqu'à 40 min. Phase mobile A : eau avec formate d'ammonium 2 mM et acide formique 50 mM; phase mobile B : acétonitrile.

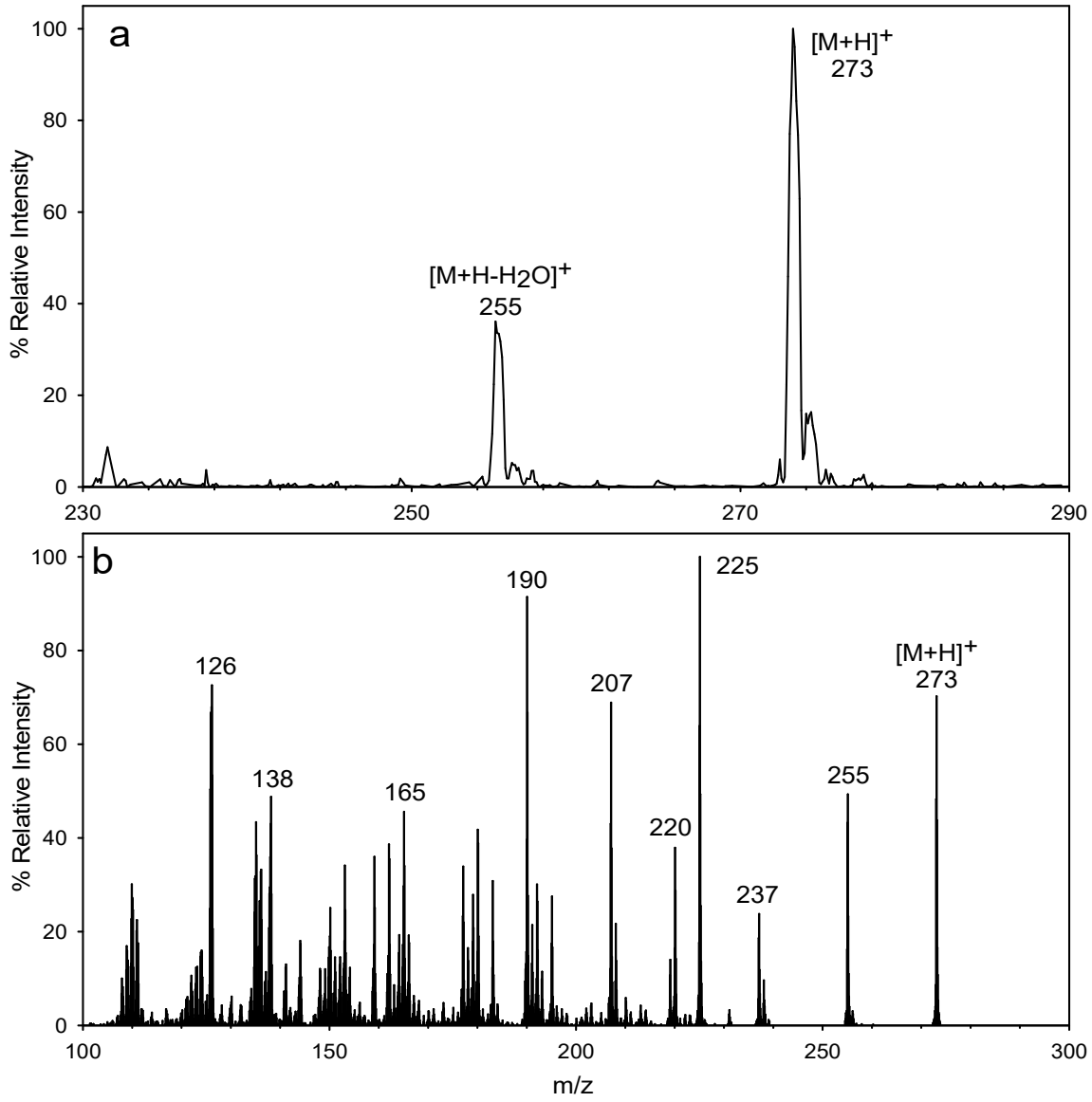


Figure 3 : Spectres de masse de la dcNEO : (a) balayage complet Q1 spectre de masse ESI en mode d'ions positifs; (b) spectre des ions produits de l'ion $[M+H]^+$ *m/z* 273 avec énergie de collision de 35 V. Conditions : CPL Agilent 1200 et SM Sciex QTRAP 4000; potentialité de défragmentation = 70 V; volume injecté = 5 µL; colonne TOSOH Amide-80, 250 mm × 2 mm d.i. à +40 °C; débit = 0,2 mL/min; élution isocratique avec 45 % de A et 55 % de B; A = eau, B = acétonitrile à 95 %, les deux avec du formate d'ammonium 2 mM et de l'acide formique 3,6 mM.

Remerciements

Les membres suivants du personnel de Science des mesures et étalons du CNRC ont contribué à la production et à la certification du CRM-dcNEO-d : S. Crain, P. LeBlanc, N. Lewis, M. MacArthur, P. McCarron, R. Perez, M.A. Quilliam, K. Reeves et K. Thomas.

Le présent document devrait être cité comme suit :

K. Reeves, M. MacArthur, S. Crain, K. Thomas, P. McCarron “CRM-dcNEO-d, a certified calibration solution reference material for decarbamoylneosaxitoxin”, Biotoxin Metrology Technical Report CRM-dcNEO-d-20170413, National Research Council Canada, Halifax.
DOI https://doi.org/10.4224/crm.2017.dcneo-d.20170413

Date de délivrance : septembre 2017
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
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