

Certificat d'analyse

CMRC-NRC

Matériau de référence certifié

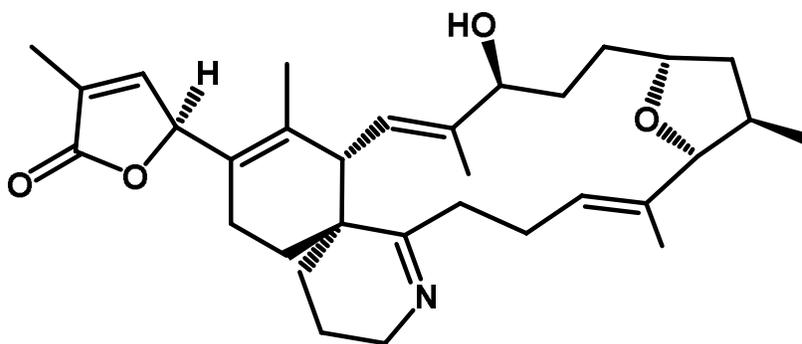
CRM-GYM-b (lot numéro 20120712)

Solution d'étalonnage certifiée pour la gymnodimine

Les gymnodimines (GYM) font partie d'un groupe de toxines marines « à action rapide » connues sous le nom d'imines cycliques [1-5]. La gymnodimine a été détectée pour la première fois dans des mollusques et du plancton en Nouvelle-Zélande [1], et elle a depuis été observée à divers endroits [6,7]. La gymnodimine est produite par le dinoflagellé *Karenia selliformis* et elle provoque une mort rapide lors d'épreuves biologiques sur des souris [8]. Le CRM-GYM-b est une solution d'étalonnage certifiée de GYM dans du méthanol contenant 0,05 % d'acide trifluoroacétique (TFA), à la concentration indiquée au tableau 1.

Tableau 1: Concentrations certifiées pour le CRM-GYM-b.

Composé	$\mu\text{mol/L}$ (à +20 °C)	$\mu\text{g/mL}$ (à +20 °C)	$\mu\text{g/g}$
Gymnodimine	$4,93 \pm 0,26$	$2,50 \pm 0,13$	$3,16 \pm 0,17$



Gymnodimine

N° dans le registre du CAS : 173792-58-0

Formule moléculaire : $\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{NO}_4$

Masse moléculaire : 507,71

$[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 508,3421

Date d'expiration : 1 an après la date de vente

Conditions de stockage : -12 °C ou moins



Conseil national de
recherches Canada

National Research
Council Canada

Canada

Utilisation prévue

Le CRM-GYM-b est une solution d'étalonnage certifiée conçue pour le développement de méthodes d'analyse et le dosage précis de la GYM. La concentration du CRM-GYM-b convient à la préparation d'une série de dilutions à des fins d'étalonnage de systèmes de chromatographie en phase liquide (CL) et de systèmes de chromatographie en phase liquide avec spectrométrie de masse (CL-SM), ainsi qu'à des fins de dopage d'échantillons de contrôle de mollusques pour le calcul de taux de récupération.

Préparation du CRM-GYM-b

La GYM a été isolée au Cawthron Institute (Nelson, Nouvelle-Zélande) d'une culture en laboratoire de *Karenia selliformis*. Elle a été purifiée en suivant plusieurs étapes chromatographiques. La solution de MRC a été préparée en dissolvant de la GYM pure dans du méthanol dégazé de haute pureté (contenant 0,05 % d'acide trifluoroacétique). Cette solution a été mélangée à fond au moyen d'un barreau magnétique recouvert de téflon et d'un agitateur magnétique, tout en étant refroidie dans un bain de glace sous une atmosphère d'argon. Des aliquotes ont été placées dans des ampoules en verre ambré, et ces ampoules ont été scellées à la flamme sous argon. Les ampoules ont ensuite été étiquetées, emballées et immédiatement transférées dans un endroit de stockage à long terme à -80 °C.

Confirmation de la structure et évaluation de la pureté

La structure et la pureté de la GYM utilisée pour la préparation du CRM-GYM-b ont été confirmées par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) de ^1H (figure 1). Un spectre des ions produits obtenu par CL-SM/SM a mis en évidence une fragmentation caractéristique de la GYM (figure 2).

L'évaluation de la pureté de la solution mère de GYM a été réalisée par CL-SM. Aucune impureté majeure n'a été détectée. Un certain nombre d'impuretés reliées à la GYM ($[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 524,4) ont toutefois été détectées à de très faibles niveaux ($< 0,1$ %) (figure 3). Un isomère inconnu de la GYM, élué avant celle-ci et représentant < 1 % de la concentration totale de GYM, a été résolu et détecté par CL-SM en suivant des conditions isocratiques différentes (figure 4).

Homogénéité

Un nombre représentatif d'ampoules ($n = 24$) a été prélevé parmi la série complète d'ampoules remplies afin de déterminer l'homogénéité du CRM-GYM-b. Les analyses ont été réalisées par CL-SM. La variation d'une ampoule à l'autre a été déterminée comme étant inférieure à la variation observée pour des analyses multiples d'une même ampoule (ÉTR < 3 % pour $n = 24$), indiquant donc une homogénéité acceptable pour toute la série d'ampoules.

Étude de la stabilité

La stabilité à court terme du CRM-GYM-b dans le méthanol (0,05 % TFA) a été évaluée au moyen d'une étude de stabilité isochrone inverse [9] avec -80 °C comme température de référence. Après une période de 30 jours, aucune dégradation de la GYM n'a été observée à des températures allant jusqu'à +37 °C, indiquant une excellente stabilité à court terme. La dégradation à +37 °C devenait significative à long terme, après 6 mois. L'incertitude associée à la stabilité à long terme a été déterminée à des fins d'inclusion dans l'incertitude combinée finale du CRM-GYM-b, en utilisant l'erreur-type de la pente déterminée à -12 °C. L'incertitude relative due à la stabilité à long terme (μ_{ITS}) est de 1,14 %. La température de stockage recommandée pour le CRM-GYM-b est de -12 °C ou moins.



Valeur certifiée

La valeur certifiée de $4,93 \pm 0,26 \mu\text{mol/L}$ pour le CRM-GYM-b (tableau 1) est basée sur les résultats obtenus au Conseil national de recherches du Canada (CNRC) en suivant deux méthodes d'analyse indépendantes : la spectroscopie RMN quantitative (RMNq) [10] et la CL-SM. Les étalonnages pour la RMNq ont été réalisés en utilisant des étalons de caféine de haute pureté diluée avec précision. Le CRM-GYM (lot n° 20021220) a été utilisé pour l'étalonnage du système de CL-SM. Les conditions pour la CL-SM étaient les suivantes : colonne Thermo 3 μm Hypersil BDS C8 (50 \times 2,0 mm) maintenue à +30 °C; 0,3 mL/min acétonitrile/eau (30/70) contenant de l'acide formique 50 mM et du formate d'ammonium 2 mM.

Les résultats indiqués dans le présent certificat sont traçables selon la norme du Système international d'unités (SI) au moyen d'étalons de pureté déterminée préparés par gravimétrie. Le présent produit est un matériau de référence approprié pour les programmes d'assurance de la qualité des laboratoires.

Incertitude

L'estimation de l'incertitude globale (U_{CRM}) pour le CRM-GYM-b comprend les incertitudes associées à la caractérisation du lot (μ_{char}), à la variation d'une ampoule à l'autre (μ_{hom}) et à la stabilité lors du stockage à long terme (μ_{stab}) [11]. Ces éléments peuvent être combinés sous la forme suivante :

$$U_{\text{CRM}} = k \sqrt{\mu_{\text{char}}^2 + \mu_{\text{hom}}^2 + \mu_{\text{stab}}^2}$$

dans laquelle k est le facteur de couverture (généralement 2).

Toutes les sources raisonnables d'erreur liées à la caractérisation du CRM-GYM-b ont été prises en compte et quantifiées. L'analyse quantitative de la GYM par RMNq et par CL-SM/SM ont entraîné une incertitude combinée (μ_{char}) de 0,030 μM . Une étude complète sur l'homogénéité a été réalisée sur le CRM-GYM-b, et son incertitude a été calculée à 0,052 μM . L'incertitude pour la stabilité à long terme (μ_{stab}) a été établie à 0,056 μM . Toutes ces sources d'incertitude ont été combinées avec un facteur de couverture de 2, pour obtenir une estimation de l'incertitude finale associée à la valeur certifiée du CRM-GYM-b (tableau 2).

Tableau 2: Bilan des incertitudes pour la valeur certifiée du CRM-GYM-b.

Incertitude	[$\mu\text{mol/L}$]
μ_{hom}	0,052
μ_{stab}	0,056
μ_{char}	0,030
$U_{\text{CRM}} (k=2)$	0,26

Instructions pour le stockage

Pour assurer la stabilité du CRM-GYM-b, ce matériau devrait être stocké non ouvert à -12 °C ou moins. De même, toute dilution de ce matériau devrait être stockée à -12 °C ou moins dans des flacons à faible espace de tête.

Expiration

Pour les ampoules stockées non ouvertes dans les conditions de stockage recommandées de -12 °C ou moins, la concentration certifiée du CRM-GYM-b est valide pendant 1 an à partir de la date de vente.

Instructions pour l'utilisation

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. Une fois l'ampoule ouverte, des aliquotes précises devraient être prélevées au moyen d'équipement volumétrique étalonné, puis transférées dans des fioles ou des flacons jaugés. Une augmentation de la concentration due à l'évaporation du méthanol aura lieu si la solution est laissée ouverte à l'air libre pendant plus de quelques minutes. Il est recommandé de ne pas faire évaporer totalement les solutions de CRM-GYM-b, en raison d'une décomposition potentielle sur les parois en verre. *Note* : Le volume de la solution n'est pas certifié. Il ne faut donc pas simplement transférer le contenu de l'ampoule dans une fiole jaugée et compléter au volume.

Consignes de sécurité

Comme les spiroïdes du même type de structure, la GYM est classée comme toxine à action rapide, et des études ont montré qu'elle est hautement toxique pour des souris par injection intrapéritonéale [8]. Aucune maladie humaine associée à la GYM n'a jusqu'à présent été rapportée. Néanmoins, il faut prendre des précautions quand on manipule le CRM-GYM-b. L'inhalation et l'ingestion du méthanol sont dangereuses; l'ingestion peut entraîner la cécité ou la mort, alors qu'un contact cutané prolongé peut conduire à une dermatite ou des lésions aux reins. Seules des personnes qualifiées devraient manipuler la solution, et des méthodes d'élimination appropriées devraient être suivies. Quand on ouvre une ampoule, il faudrait porter des gants et une protection pour les yeux en cas de brisure du verre. Une fiche signalétique (FS) est disponible pour le CRM-GYM-b.



Figures

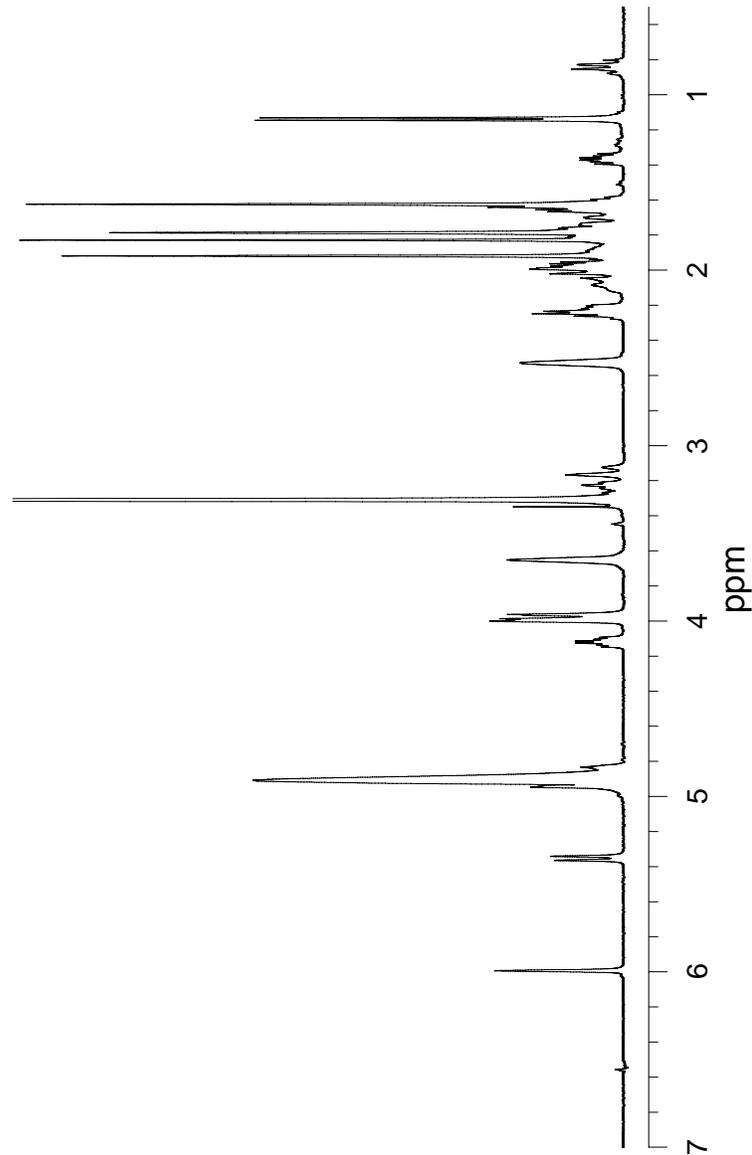


Figure 1: Spectre RMN ^1H de la GYM dissoute dans du méthanol- d_3 (99,5 % D, Cambridge Isotope Laboratories).

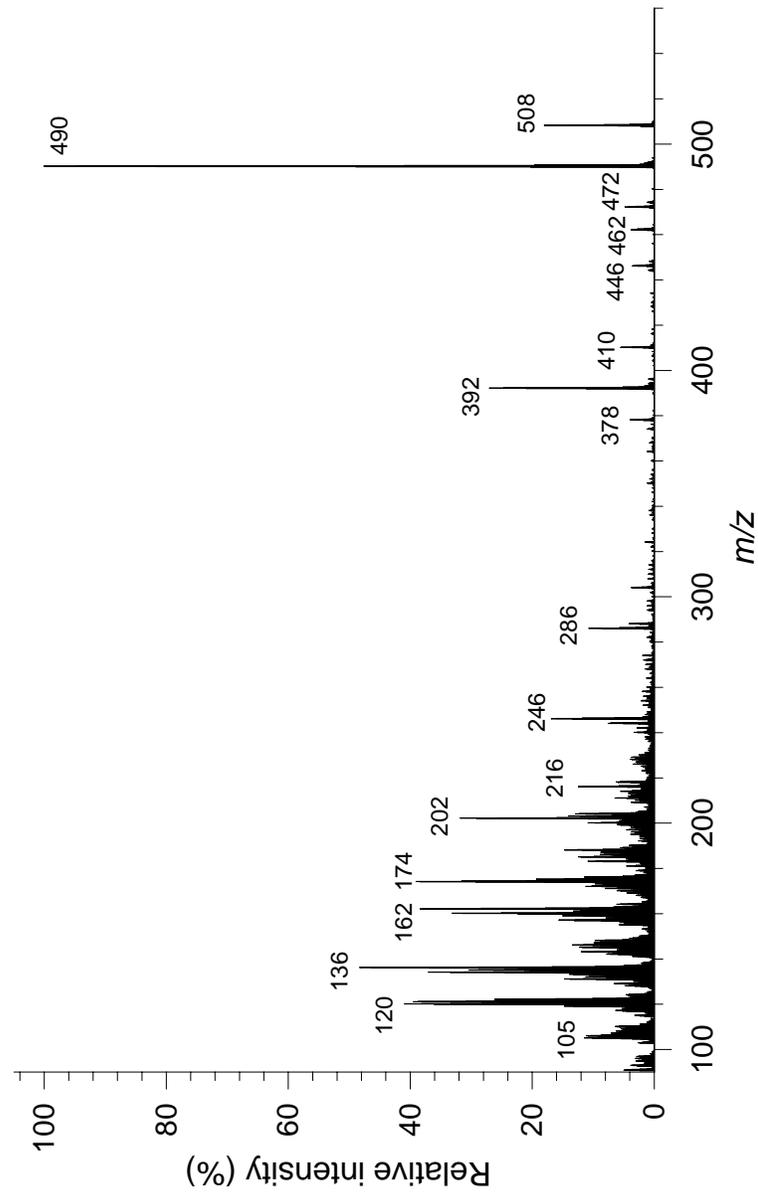


Figure 2: Spectre de SM en tandem des ions produits de l'ion $[M+H]^+$ (m/z 508) de la GYM, obtenu au moyen d'un spectromètre de masse AB SCIEX 5500 QTRAP avec une énergie de collision de 55 eV.

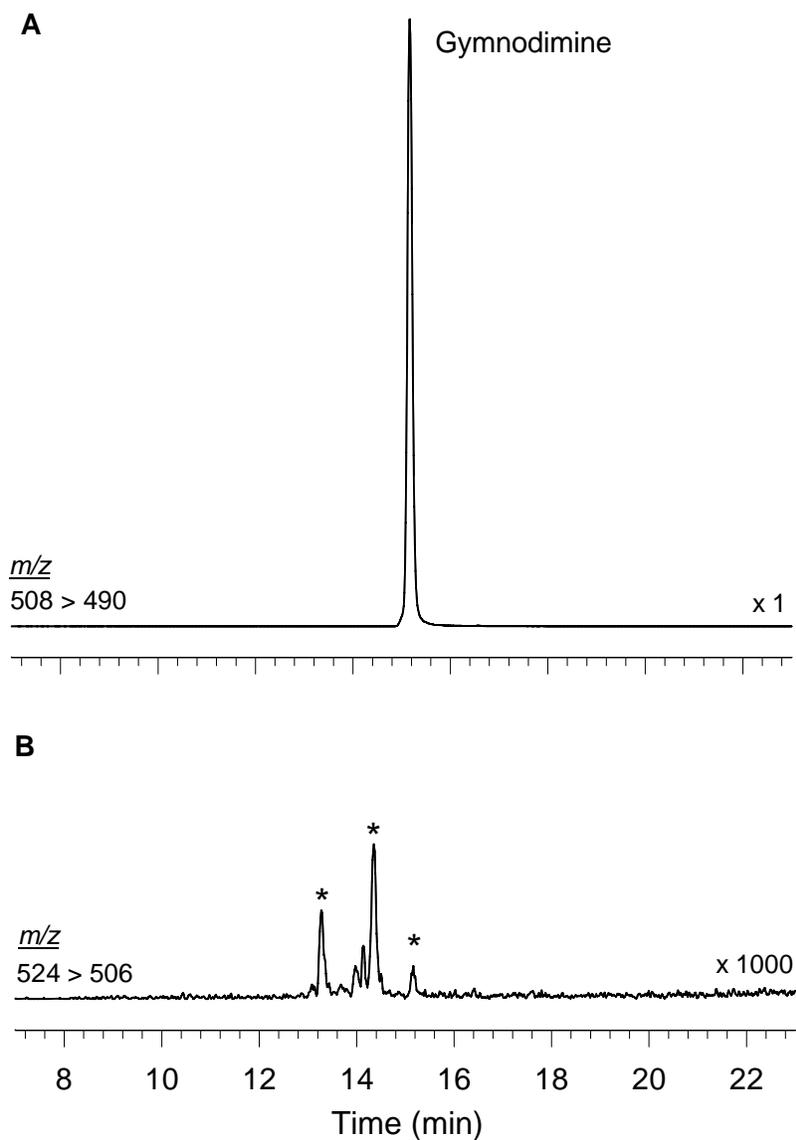


Figure 3: Analyse par CL-SM du CRM-GYM-b et détection de traces d'impuretés (m/z 524>506, indiquées par des astérisques). Conditions : colonne Thermo 3 μ m Hypersil C8 (150 \times 2 mm) maintenue à +20 °C; eau (A) et acétonitrile/eau (95/5) (B), les deux contenant de l'acide formique 50 mM et du formate d'ammonium 2 mM, avec un gradient d'élution de 5 à 100 % de B en 25 min à 0,2 mL/min; spectromètre de masse AB SCIEX 5500 QTRAP utilisé en mode ion positif avec la mesure de réactions sélectionnées.

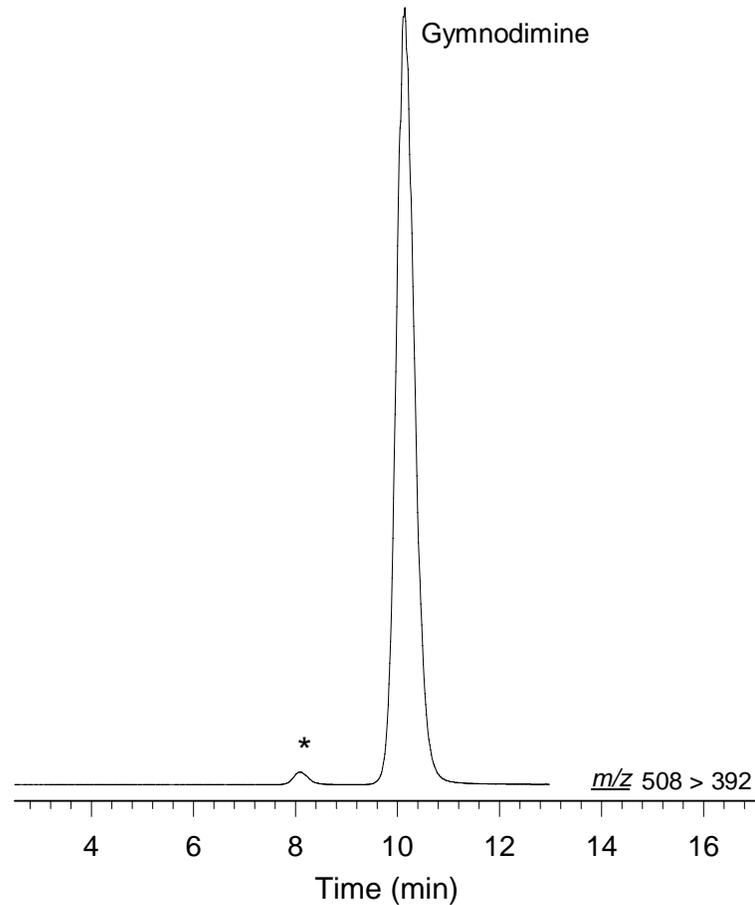


Figure 4: Analyse par CL-SM/SM de la solution mère du CRM-GYM-b montrant un isomère inconnu de la GYM résolu dans des conditions isocratiques (isomère indiqué par un astérisque). Conditions : colonne Phenomenex 3 μ m Luna C8 (50 \times 2,1 mm) maintenue à +20 °C et élution à 0,2 mL/min avec un mélange méthanol/eau (25/75) contenant de l'acide formique 50 mM. L'isomère représente environ 1 % quand suivi en mode de détection d'ions sélectionnés.

Références

1. Seki T, Satake M, Mackenzie L, Kaspar HF, Yasumoto T (1995). Gymnodimine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from New Zealand oysters and the dinoflagellate, *Gymnodinium* sp. *Tetrahedron Lett* 36:7093-7096.
2. Hu T, Burton IW, Cembella AD, Curtis JM, Quilliam MA, Walter JA, Wright JLC (2001). Characterization of Spirolides A, C, and 13-Desmethyl C, new marine toxins isolated from toxic plankton and contaminated shellfish. *J Nat Prod* 64:308-312.
3. Selwood AI, Miles CO, Wilkins AL, van Ginkel R, Munday R, Rise F, McNabb P (2010). Isolation, structural determination and acute toxicity of pinnatoxins E, F and G. *J Agric Food Chem* 58:6532-6542.
4. Miles CO, Wilkins AL, Stirling DJ, MacKenzie AL (2000). New analogue of gymnodimine from a *Gymnodinium* species. *J Agric Food Chem* 48:1373-1376.
5. Miles CO, Wilkins AL, Stirling DJ, MacKenzie AL (2003). Gymnodimine C, an isomer of gymnodimine B, from *Karenia selliformis*. *J Agric Food Chem* 51:4838-4840.
6. Krock B, Pitcher GC, Ntuli J, Cembella AD (2009). Confirmed identification of gymnodimine in oysters from the west coast of South Africa by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Afr J Mar Sci* 31:113-118.
7. de la Iglesia P, McCarron P, Diogene J, Quilliam MA (2013). Discovery of gymnodimine fatty acid ester metabolites in shellfish using liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 27:643-653.
8. Munday R (2008). Toxicology of cyclic imines: gymnodimine, spirolides, pinnatoxins, pteriatoxins, prorocentrolide, spiro-prorocentrimine, and symbioimines. In: Botana LM (ed) *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 581-594.
9. Lamberty A, Schimmel H, Pauwels J (1998). The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. *Fresenius J Anal Chem* 360:359-361.
10. 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.
11. Pauwels J, Lamberty A, Schimmel H (2000). Evaluation of uncertainty of reference materials. *Accred Qual Assur* 5:95-99.



Remerciements

Les membres du personnel suivants de Science des mesures et étalons du CNRC ont contribué à la production et à la certification du CRM-GYM-b : S. Crain, S.D. Giddings, W. Hardstaff, D. Marciniak, P. McCarron, M.A. Quilliam, K. Reeves, K. Thomas, E. Kerrin, C. Hollingdale et R. Perez.

Nous remercions profondément Andrew Selwood et Paul McNabb du Cawthron Institute (Nelson, Nouvelle-Zélande) pour leur assistance.

Le présent document devrait être cité sous la forme suivante :

S.D. Giddings, S. Crain, K. Thomas, M.A. Quilliam, P. McCarron, "CRM-GYM-b, certified calibration solution for gymnodimine" Biotoxin Metrology Technical Report CRM-GYM-b-20120712, National Research Council Canada, Halifax, April 2013.

DOI <https://doi.org/10.4224/crm.2013.gym-b.20120712>

Première certification complétée : avril 2013

Version du document : 20220329

Date de révision : mars 2022 (DOI ajouté et mises à jour éditoriaux)

Signé:



Michael A. Quilliam, Ph.D.
Chef de groupe, 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.

Tout commentaire, renseignement ou demande devrait être adressé 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

