Conseil national de recherches Canada | National Research Council Canada

Certificat d'analyse

Matériau de référence certifié

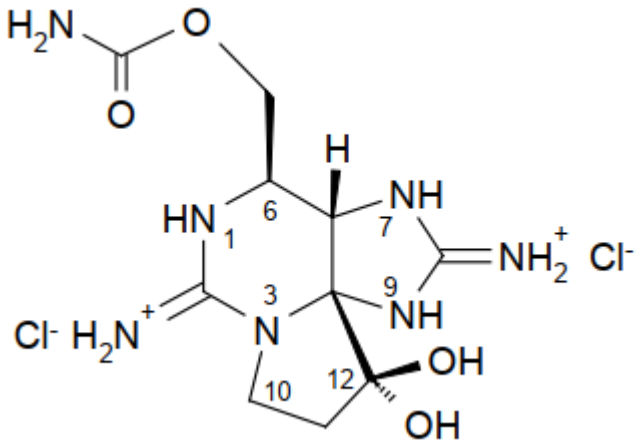
CRM-STX-g (lot 20201215)

Solution d'étalonnage certifiée pour le dichlorhydrate de saxitoxine

La saxitoxine (STX) [1] est présente dans les microalgues marines [2] et dans les cyanobactéries d'eau douce [3]. Le CRM-STX-g est un matériau de référence certifié (MRC) d'une solution d'étalonnage de STX dans de l'acide chlorhydrique aqueux 0,5 mM. Il est conçu pour l'identification et le dosage de la STX. Il remplace le CRM-STX-f.

Tableau 1 : Valeur certifiée et incertitude élargie (*k* = 2) pour le CRM-STX-g

Composé	Concentration µmol/L (15-30 °C)
saxitoxine (STX)	61,4 ± 2,4



dichlorhydrate de saxitoxine

Numéro de registre CAS : 35554-08-6
InChIKey : YHAHUGQQOBPXOZ-UIPPETONSA-N
Formule moléculaire : $C_{10}H_{19}N_7O_4Cl_2$
Masse molaire : 372,2 g/mol

Période de validité : 1 an à compter de la date de vente
Conditions d'entreposage : +4 °C

DOI: doi.org/10.4224/crm.2021.stx-g.20201215

Utilisation prévue

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

Préparation du matériau

La *N*-sulfocarbamoylgonyautoxine-3 (C2) a été isolée d'une culture en laboratoire à grande échelle d'*Alexandrium tamarense,* convertie chimiquement en STX, puis purifiée en suivant plusieurs étapes chromatographiques [4].

La structure et la pureté de la STX ont été confirmées par CPL-SM [5, 6] (figures 1 et 2) et par RMN de ^{1}H. Une valeur précise de *m/z* de 300,1413 (Δ = -1 ppm pour $C_{10}H_{18}N_7O_4^+$) a été obtenue pour l'ion $[M+H]^+$ de la STX (base libre) par CPL-SM haute résolution (CPL-SMHR). La pureté a ensuite été évaluée par CPL-ox-FL [7] (figure 3), électrophorèse capillaire avec détection UV (EC-UV) [8] et chromatographie en phase liquide avec détection de l'azote par chimiluminescence (CPL-CLN) [9]. Une trace de décarbamoylsaxitoxine (dcSTX) est présente dans le CRM-STX-g.

La solution mère a été préparée en diluant la STX purifiée dans de l'acide chlorhydrique aqueux 0,5 mM pour le dosage par RMN de ^{1}H (RMNq) [10]. La solution de CRM-STX-g a été préparée en faisant une dilution précise de la solution mère dans de l'acide chlorhydrique aqueux 0,5 mM. Des aliquotes ont été transférées dans des ampoules en verre ambré remplies d'argon, qui ont été immédiatement scellées à la flamme. Chaque ampoule contient environ 0,5 mL de solution.

Caractérisation du matériau

La valeur certifiée pour le CRM-STX-g (tableau 1) est basée sur les résultats obtenus au Conseil national de recherches du Canada (CNRC) au moyen de trois méthodes d'analyse : la RMNq en utilisant l'hydrogénophtalate de potassium pour l'étalonnage, la CPL-CLN en utilisant la caféine pour l'étalonnage et la CPL-SM/SM en utilisant le CRM-STX-f pour l'étalonnage.

Traçabilité métrologique

Les résultats présentés dans le présent certificat sont traçables au Système international d'unités (SI) au moyen d'étalons de pureté établie préparés par gravimétrie : matériau de référence certifié d'hydrogénophtalate de potassium NIST (SRM 84L); matériau de référence certifié de caféine NMIA (M724c); matériau de référence certifié du CNRC de STX (CRM-STX-f, lot n° 20110316).

Homogénéité

Nous avons prélevé un nombre représentatif d'ampoules de CRM-STX-g parmi la série d'ampoules produites, et avons mesuré la réponse de la STX par CPL-ox-FL. Aucune hétérogénéité n'a été observée.

Stabilité

Des études sur la stabilité de la STX dans de l'acide chlorhydrique aqueux conservé dans des ampoules scellées à +4 °C ou moins ont mis en évidence une bonne stabilité.

Incertitude

Toutes les sources raisonnables d'incertitude liées à la valeur certifiée du tableau 1 ont été prises en compte. L'estimation de l'incertitude combinée comprend les incertitudes dues à la caractérisation du lot, à la variation possible inter-unité et à la stabilité du matériau [11-14].

L'incertitude élargie (U) pour la valeur est égale à $U = ku_c$, u_c étant l'incertitude type composée calculée conformément au Comité commun pour les guides en métrologie (JCGM) [14] et k étant le facteur de couverture. Un facteur de couverture de $k = 2$ a été appliqué, ce qui correspond à un niveau de confiance d'environ 95 %.

Entreposage

Le matériau doit être entreposé à une température de +4 °C. L'ampoule devrait être entreposée non ouverte.

Instructions de manipulation et d'utilisation

Avant l'ouverture, chaque ampoule doit d'abord être équilibrée à la température ambiante et le contenu doit être soigneusement mélangé. L'ampoule doit être ouverte à la marque prélimée juste avant son utilisation. Un dispositif étalonné doit être utilisé pour transférer de façon précise la solution du MRC. La valeur certifiée n'est garantie que si l'ampoule est échantillonnée immédiatement après l'ouverture afin de limiter l'évaporation du solvant. Il est important de noter que le volume de la solution n'est pas certifié; seule sa concentration l'est. En conséquence, tout le contenu de l'ampoule ne peut être dilué de façon volumétrique.

Après la première ouverture de l'ampoule, un sous-échantillonnage répétitif de la solution du MRC et son entreposage peuvent avoir un impact sur la valeur certifiée. Il incombe aux utilisateurs de démontrer que leurs procédures de sous-échantillonnage et d'entreposage n'ont aucune incidence sur la valeur certifiée.

Renseignements sur la santé et la sécurité

En cas d'ingestion d'une quantité suffisante, la STX et les toxines apparentées peuvent causer une paralysie ou même la mort. Seul un personnel qualifié devrait manipuler ce matériau et des méthodes d'élimination appropriées doivent être suivies. Une Fiche de données de sécurité (FDS) est disponible à l'adresse doi.org/10.4224/crm.2021.stx-g.20201215. Réservé à l'usage du laboratoire uniquement; non destiné à la consommation humaine, aux usages thérapeutiques, aux médicaments, aux usages domestiques ou à tout autre usage.

Période de validité

La valeur certifiée est valide pendant 1 an à compter de la date de vente, pourvu que les conditions d'entreposage et les instructions de manipulation et d'utilisation précisées dans le présent certificat soient respectées.

Système de gestion de la qualité

Le CNRC est l'institut national de métrologie (INM) du Canada et est signataire de l'Arrangement de reconnaissance mutuelle du Comité international des poids et mesures (CIPM MRA). Le CIPM MRA a été développé en réponse à un besoin croissant d'un système ouvert, transparent et complet pour donner aux utilisateurs des informations quantitatives fiables sur la comparabilité des services nationaux de métrologie et de fournir la base technique des accords plus larges négociés pour les échanges internationaux, le commerce et les affaires réglementaires. Notre Système de gestion de la qualité pour les services de mesure et les matériaux de référence certifiés est conforme aux exigences des normes ISO/IEC 17025 et ISO 17034.

Références

1. Hall S, Strichartz GR, Moczydlowski E, Ravindran A, Reichardt PB. The saxitoxins: sources, chemistry, and pharmacology. In: Hall S and Strichartz GR (Eds) Marine Toxins. ACS Symposium Series. 1990; 418: 29-65. Washington DC, Am Chem Soc. https://doi.org/10.1021/bk-1990-0418.ch003
2. Shumway SE. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. J. World Aquacult Soc. 1990; 21 (2): 65-104. https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1990.tb00529.x
3. D'Agostino PM, Boundy MJ, Harwood TD, Carmichael WW, Neilan BA, Wood SA. Re-evaluation of paralytic shellfish toxin profiles in cyanobacteria using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Toxicon. 2019; 158: 1-7. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.11.301
4. Laycock MV, Thibault P, Ayer SW, Walter JA. Isolation and purification procedures for the preparation of paralytic shellfish poisoning toxin standards. Nat Toxins. 1994; 2: 175-183. https://doi.org/10.1002/nt.2620020405
5. Dell'Aversano, C, Hess, P, & Quilliam, MA. Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. J. Chromatogr. A. 2005; 1081: 190-201. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.056
6. Thomas K, Beach DG, Reeves KL, Gibbs RS, Kerrin ES, McCarron P, Quilliam MA. Hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for quantitation of paralytic shellfish toxins: validation and application to reference materials. Anal Bioanal Chem. 2017; 409: 5675-5687. https://doi.org/10.1007/s00216-017-0507-3
7. Van De Riet, Jeffrey, Ryan S Gibbs, Patricia M Muggah, Wade A Rourke, James D MacNeil, Michael A Quilliam, et al. 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. 2011; 94, no. 4: 1154–76. https://doi.org/10.1093/jaoac/94.4.1154
8. Thibault P, Pleasance S, Laycock MV. Analysis of paralytic shellfish poisons by capillary electrophoresis. J Chromatogr A. 1991; 542: 483-501. https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)88783-5

9. Thomas K, Wechsler D, Chen YM, Crain S, Quilliam MA. Analysis of natural toxins by liquid chromatography-chemiluminescence nitrogen detection and application to the preparation of certified reference materials. J AOAC Int. 2016; 99: 1173-1184. https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0146

10. Burton IW, Quilliam MA, Walter JA. Quantitative ^{1}H NMR with external standards: use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products. Anal Chem. 2005; 77: 3123-3131. https://doi.org/10.1021/ac048385h

11. Pauwels J, Lamberty A, Schimmel H. Evaluation of uncertainty of reference materials. Accred Qual Assur. 2000; 5: 95-99. https://doi.org/10.1007/s007690050020

12. Pauwels J, Lamberty A, Schimmel H. The determination of the uncertainty of reference materials certified by laboratory intercomparison. Accredit Qual Assur. 1998; 3: 180-184. https://doi.org/10.1007/s007690050218

13. Ellison SLR, Burke S, Walker RF, Heydorn K, Mansson M, Pauwels J, Wegscheider W, te Nijenhuis B. Uncertainty for reference materials certified by interlaboratory study: Recommendations of an international study group. Accredit Qual Assur. 2001; 6: 274-277. https://doi.org/10.1007/s007690100341

14. JCGM 100:2008. Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement. Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM); 2008. https://doi.org/10.59161/JCGM100-2008E

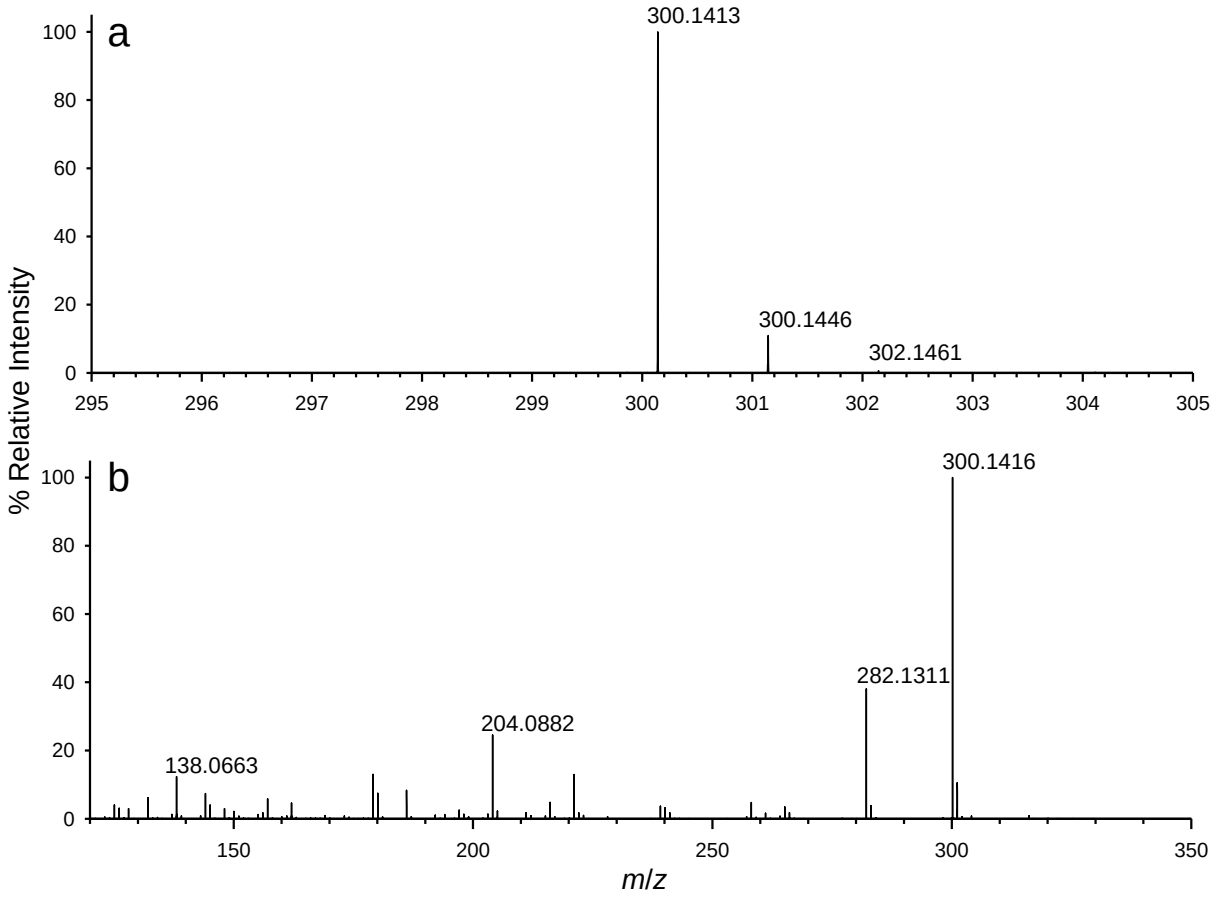


Figure 1 : Spectres de la STX du CRM-STX-g obtenus par CPL-SMHR, (a) en balayage complet et (b) en dissociation induite par collision (SM/SM), au moyen d'un spectromètre de masse Thermo Q Exactive-HF muni d'une sonde d'ionisation par électropulvérisation chauffée. Les données ont été collectées en mode positif avec une tension de pulvérisation de 2500 V, une température de capillaire de 275 °C et une température de chauffage de 375 °C. Les données de balayage complet ont été acquises avec une résolution réglée à 120 000. Les données de SM/SM ont été acquises en mode suivi de réaction en parallèle avec le même réglage de résolution et une énergie de collision normalisée de 30 eV.

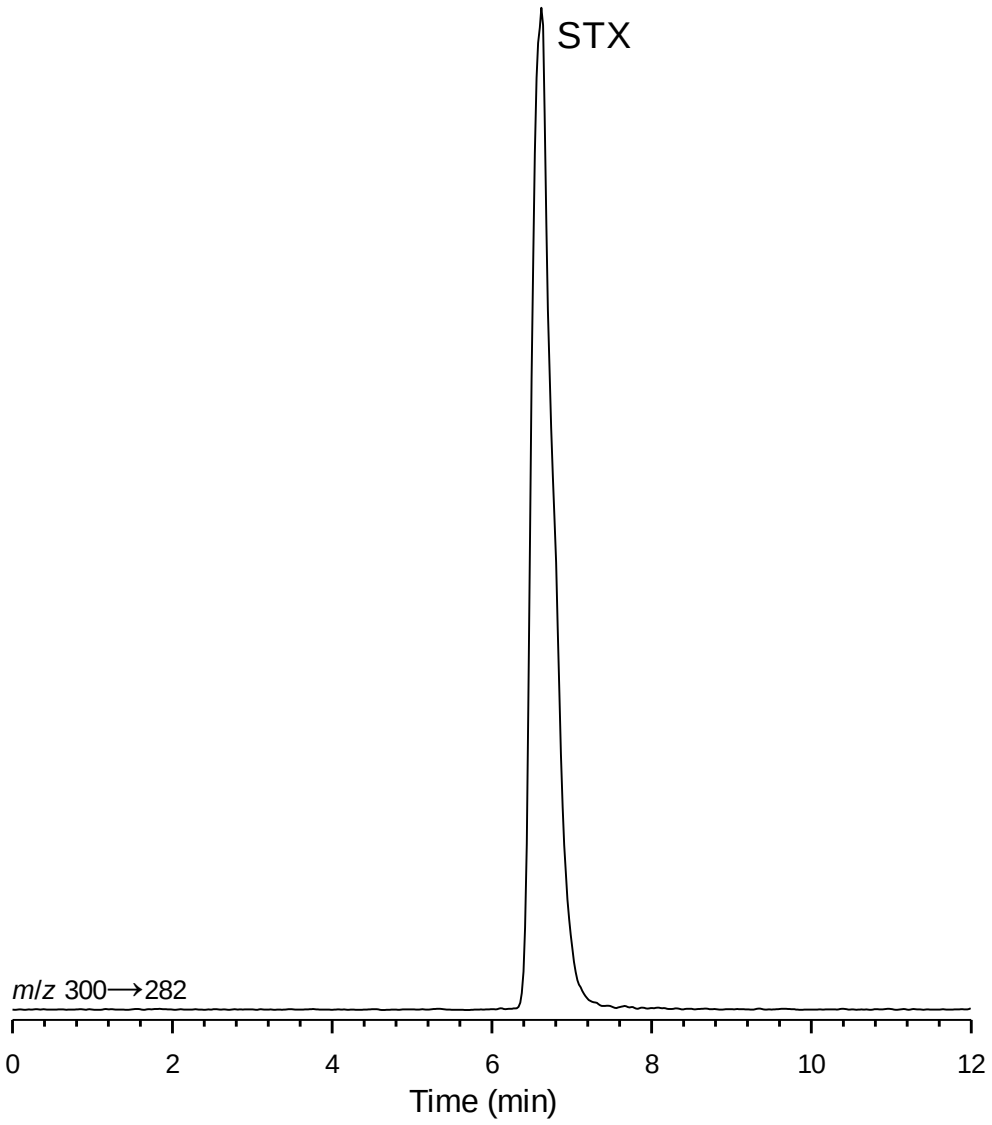


Figure 2: Analyse par CPL-SM/SM du CRM-STX-g en mode suivi de réaction sélectionné au moyen d'un système de CPL Agilent 1260 connecté à un SM Sciex 4000 QTRAP, avec ionisation par électropulvérisation. Conditions chromatographiques : colonne Toso-Haas Amide-80 (250 mm × 2 mm, 5 µm) à 40 °C; phase mobile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

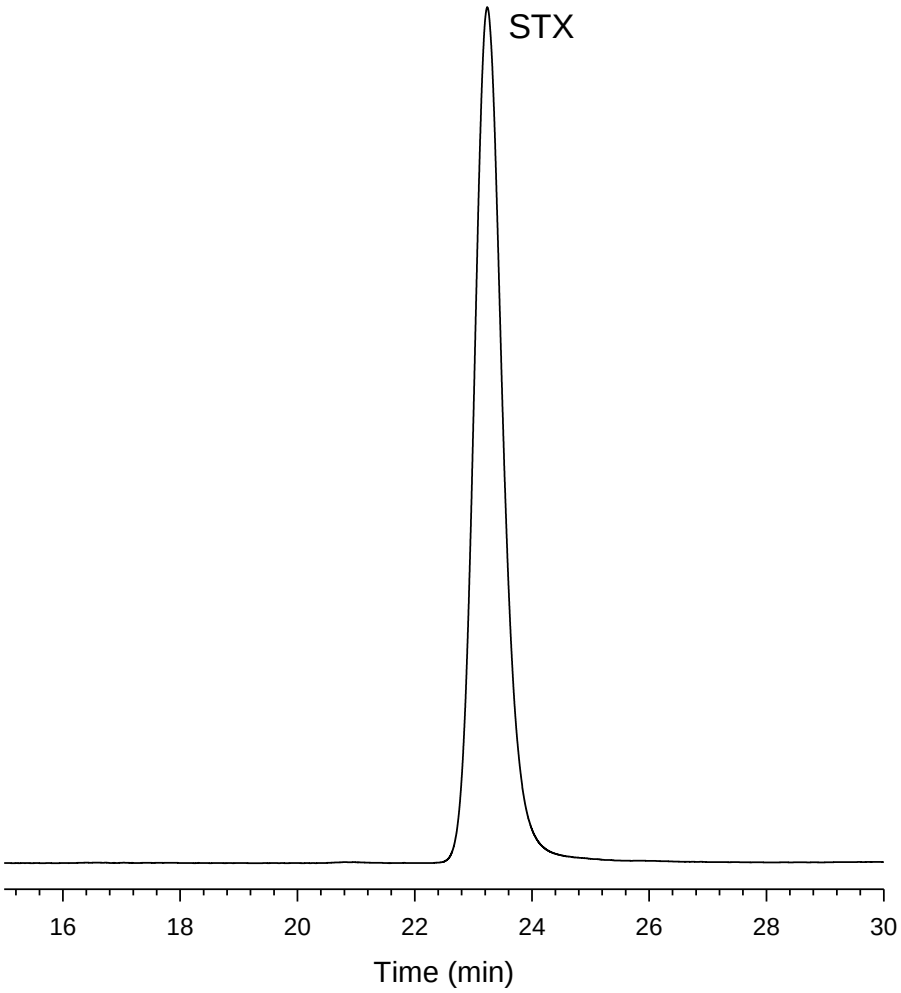


Figure 3 : Analyse par CPL-ox-FL du CRM-STX-g. Conditions : colonne Zorbax Bonus-RP, 250 × 4,6 mm d.i. à 30 °C; phase mobile : eau avec acide phosphorique 20 mM, heptanesulfonate 8 mM et 9 % d'acétonitrile à pH 7,1, 0,8 mL/min; volume injecté 10 µL; oxydation post-colonne avec 0,4 mL/min d'acide périodique 5 mM et d'acide phosphorique 100 mM dans l'eau à pH 7,8; boucle de réaction de 1 mL à 80 °C; effluent acidifié avec 0,4 mL/min d'acide nitrique 0,75 M; détection de fluorescence avec excitation à 330 nm et émission à 390 nm.

Auteurs

Kelley L. Reeves, Krista M. Thomas, Sabrina D. Giddings et Pearse McCarron.

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

Remerciements

Les membres du personnel du CNRC suivants ont contribué à la production et à la certification du CRM-STX-g : Daniel G. Beach, Sheila M. Crain, Sabrina D. Giddings, Patricia LeBlanc, Pearse McCarron, Christopher O. Miles, Elizabeth M. Mudge, Ruth A. Perez Calderon, Cheryl Rafuse, Isabelle Rajotte, Kelley L. Reeves, Krista M. Thomas et Elliott J. Wright.

Date d'émission : Mars 2021

Révisé :
Février 2022 (DOI ajouté et mises à jour éditoriaux)
Février 2025 (figure 2 corrigée et mises à jour éditoriaux)

Version du document : 20250206

Approuvé par : Pearse McCarron.

Pearse McCarron, Ph. D.
Chef d'équipe, Métrologie des biotoxines

Ce certificat est valide uniquement si le matériau correspondant a été obtenu directement auprès du CNRC ou d'un revendeur autorisé. Les utilisateurs doivent s'assurer que le certificat à leur disposition est à jour. Pour les mises à jour, veuillez consulter le site suivant : doi.org/10.4224/crm.2021.stx-g.20201215.

Veuillez adresser tout commentaire, renseignement ou demande au :

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

Téléphone : 902-426-8281
Télécopieur : 902-426-5426
Courriel : CRM.sales-ventes.MRC@nrc-cnrc.gc.ca

Canada