

# Certificat d'analyse

CMRC-NRC

Matériau de référence certifié

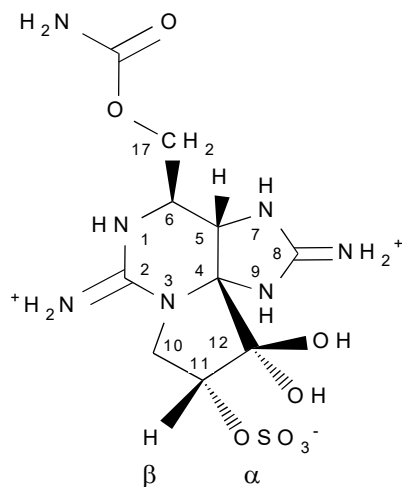
## CRM-GTX2&3-d (lot numéro 20170419)

Solution d'étalonnage certifiée pour les gonyautoxines-2 et -3

Les gonyautoxines-2 et -3 (GTX2 et GTX3) sont deux des toxines responsables d'incidents d'intoxication par phycotoxine paralysante (IPP) [1]. Le CRM-GTX2&3-d est une solution d'étalonnage d'instruments; certifiée et préparée afin d'aider les analystes à doser la GTX2 et la GTX3. Chaque ampoule contient une solution de GTX2 et de GTX3 dissoutes dans de l'acide chlorhydrique (HCl) aqueux 0,5 mM, filtré. Cette solution remplace la solution d'étalonnage CRM-GTX2&3-c.

Tableau 1 : Valeurs des concentrations certifiées pour le CRM-GTX2&3-d.

Composé	$\mu\text{mol/L}$ (à +25 °C)
GTX2	$102,6 \pm 4,0$
GTX3	$43,5 \pm 2,9$
GTX2 + GTX3	$146,1 \pm 6,9$



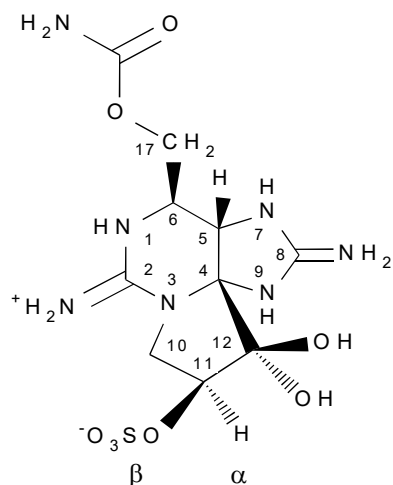
### Gonyautoxine-2

Numéro du CAS : 60508-89-6 (base libre)

Formule moléculaire : C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>S<sub>1</sub>

Masse moléculaire : 395,4 g/mol

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



### Gonyautoxine-3

Numéro du CAS : 60537-65-7 (base libre)

Formule moléculaire : C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>S<sub>1</sub>

Masse moléculaire : 395,4 g/mol



## Utilisation prévue

Le CRM-GTX2&3-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 GTX2 et de la GTX3. Les concentrations de GTX2 et de GTX3 conviennent 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-GTX2&3-d, les ampoules devraient être conservées dans un réfrigérateur (+4 °C). 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. *Veillez 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-GTX2&3-d

Les *N*-sulfocarbamoylgonyautoxines-2 et -3 ont été extraites d'une culture d'*Alexandrium tamarense* et converties chimiquement en un mélange de GTX2 et GTX3, qui a été purifié par chromatographie préparative [2]. Le GTX2&3 purifié a été séché sous vide, puis dissous dans du HCl 0,5 mM aqueux filtré afin d'obtenir la solution mère. La pureté des toxines 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-GTX2&3-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-GTX2&3-d (tableau 1) sont basées sur des résultats obtenus au CNRC au moyen de deux méthodes d'analyse : RMN quantitative de <sup>1</sup>H (RMNq) avec solutions précises d'hydrogénophthalate de potassium (NIST SRM 84I) comme étalon [7]; et CPL-DNCL avec des solutions précises de caféine (NMIA M724c) comme étalon.

De faibles concentrations de décarbamoylgonyautoxine-2 (dcGTX2), de décarbamoylgonyautoxine-3 (dcGTX3), de gonyautoxine-1 (GTX1) et de gonyautoxine-4 (GTX4) sont présentes dans le CRM-GTX2&3-d. Des valeurs à titre d'information ont été obtenues par 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-GTX2&3-d au moment de l'emballage.

Composé	[M+H] <sup>+</sup> , m/z	Concentration (µmol/L)*
Gonyautoxine-1 (GTX1)	412,1	0,21
Gonyautoxine-4 (GTX4)	412,1	0,03
Décarbamoylegonyautoxine-2 (dcGTX2)	353,1	0,23
Décarbamoylegonyautoxine-3 (dcGTX3)	353,1	0,13

\* Ces concentrations ne sont pas certifiées.

### Homogénéité

Un nombre représentatif d'ampoules de CRM-GTX2&3-d ont été prélevées parmi la série complète, et les concentrations de GTX2&3 ont été mesurées par CPL-ox-DLF. 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 GTX2&3 stockées dans des ampoules scellées conservées à +4 °C, sans décomposition détectable pendant un an. Les solutions sont aussi stables quand elles sont conservées au congélateur (-12 °C ou moins). Il a été déterminé que la GTX2 et la GTX3 démontrent une bonne stabilité à la température ambiante, sans décomposition détectable pendant un mois, dans les limites d'incertitude de la méthode d'analyse (CPL-SM, ÉTR < 1 % pour des injections multiples d'une même solution; n = 6).

### Incertainde

Toutes les sources raisonnables d'erreur liées à la caractérisation du CRM-GTX2&3-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'instabilité lors du stockage ( $u_{stab}$ ) et à la variation d'une ampoule à l'autre ( $u_{hom}$ ) [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-GTX2&3-d.

Incertaindes [µmol/L]	GTX2	GTX3	GTX2&3
$u_{char}$	1,96	1,43	3,36
$u_{hom}$	0,47	0,20	0,68
$u_{stab}$	0,07	0,05	0,11

## Consignes de sécurité

En cas d'ingestion de quantités suffisantes, les toxines responsables de l'IPP peuvent provoquer une paralysie et 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-GTX2&3-d.

## Période de validité

Quand l'ampoule non ouverte est conservée à la température recommandée de +4 °C, la concentration certifiée du CRM-GTX2&3-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.

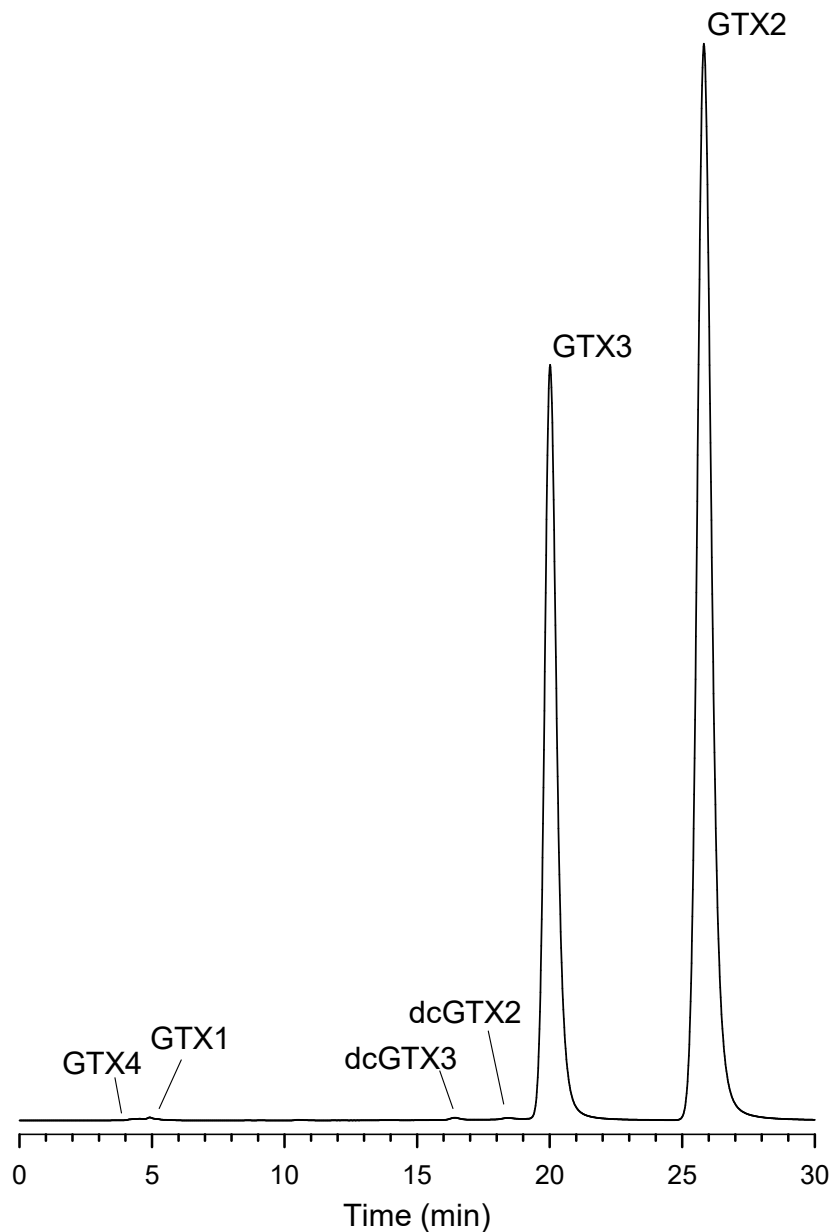
Le système qualité de SME, à l'appui des aptitudes en matière de mesures et d'étalonnages du CNRC énumérées dans la base de données sur les comparaisons clés du Bureau international des poids et mesures (BIPM) ([http://kcdb.bipm.org/default\\_fr.asp](http://kcdb.bipm.org/default_fr.asp)), a été examiné 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.



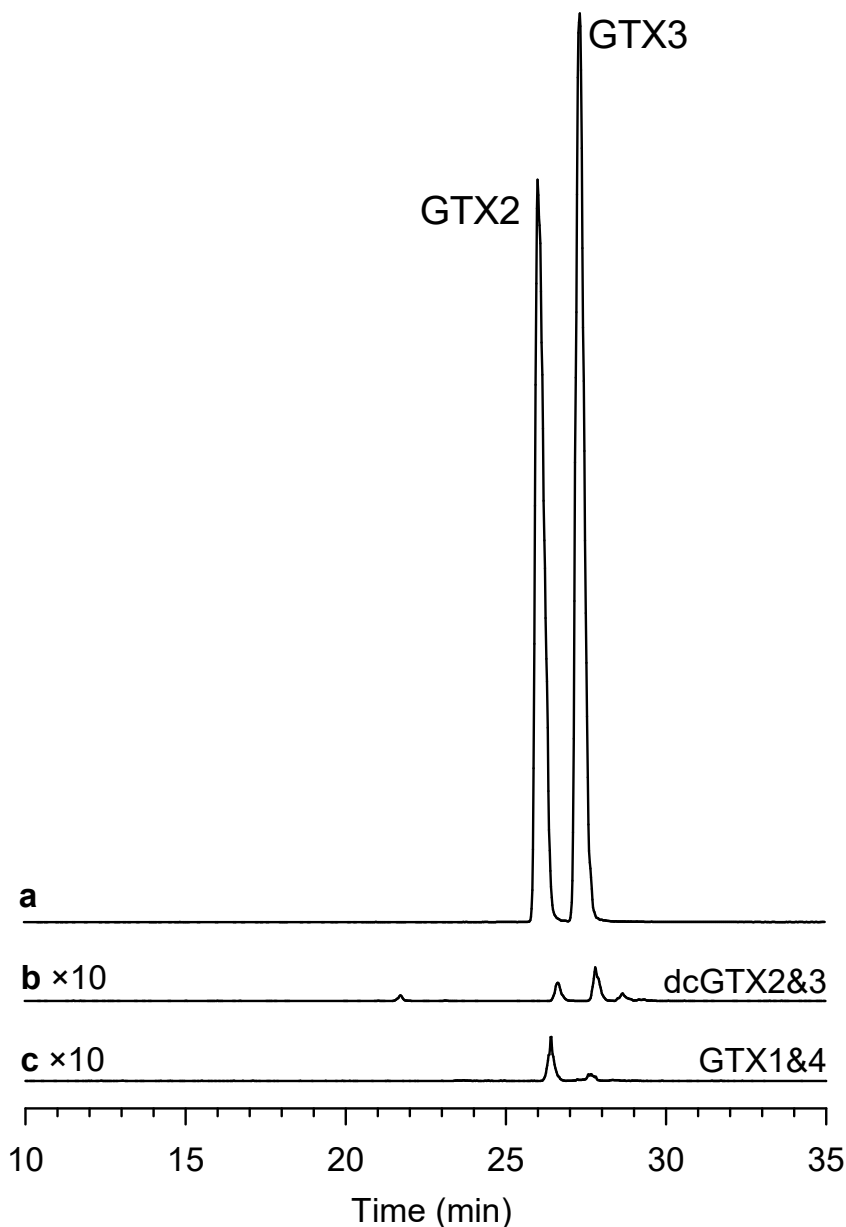
## Références

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  $^1\text{H}$  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](http://www.bipm.org). Printed as ISO/IEC Guide 98-3:2008, ISO Geneva.

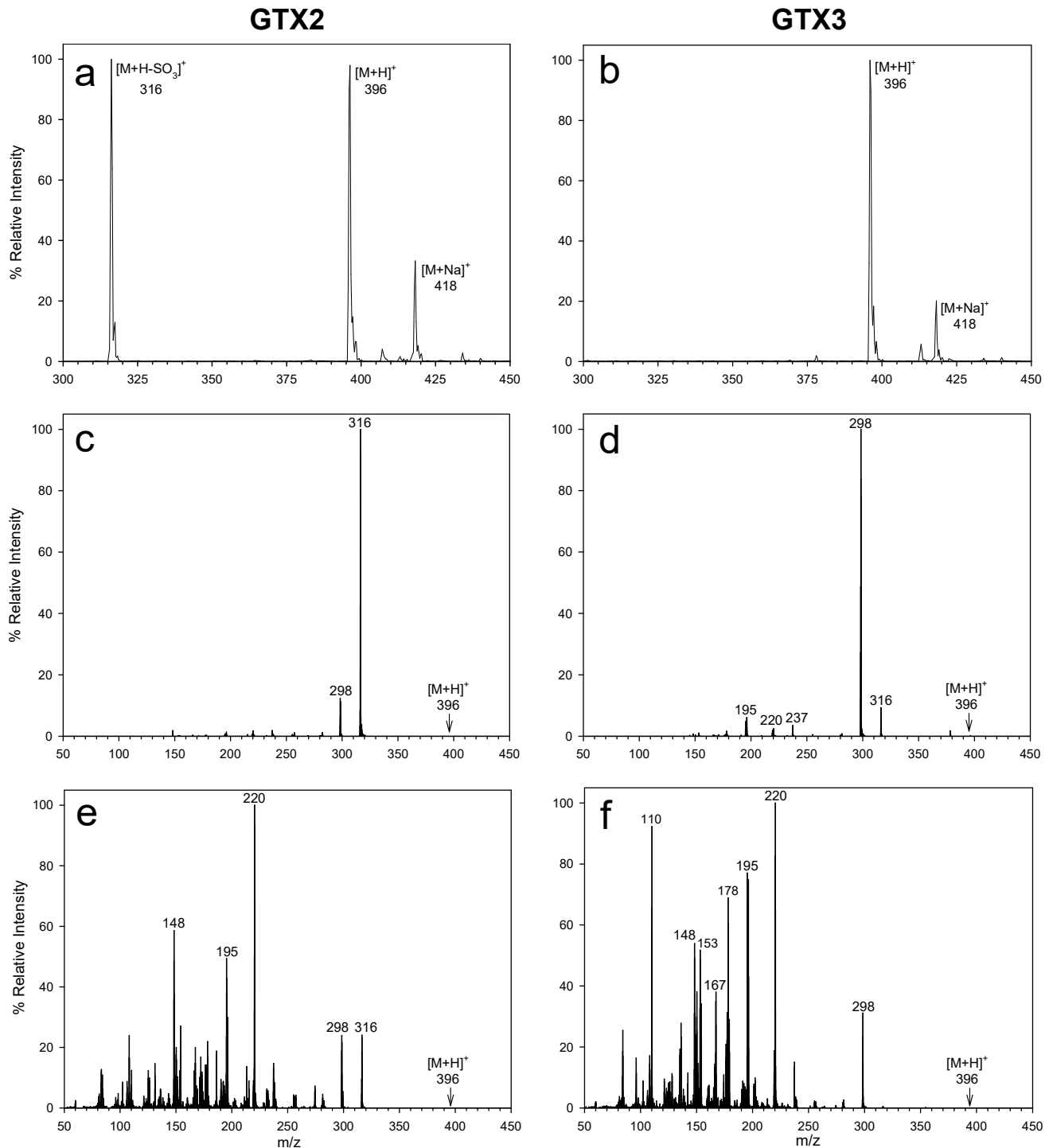




**Figure 1 :** Analyse par CPL-ox-DFL du CRM-GTX2&3-d. Les temps de rétention de toxines apparentées sont indiqués. Conditions : colonne Zorbax Bonus-RP (250 × 4,6 mm d.i., 5 µm) à +35 °C; 0,8 mL/min de phosphate d'ammonium 5,5 mM avec du sulfonate d'heptyle de sodium 11 mM, pH 7,1; volume injecté 5 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 de la solution mère du CRM-GTX2&3-d avec la mesure de réactions sélectionnées : (a) signaux combinés pour  $m/z$  396 > 316 et  $m/z$  396 > 298; (b) signaux combinés pour  $m/z$  353 > 273 et  $m/z$  353 > 255; et (c) signaux combinés pour  $m/z$  412 > 332 et  $m/z$  412 > 314. Conditions : CPL Agilent 1200 et SM Sciex API4000 QTRAP; volume injecté 2,5  $\mu$ L; colonne TOSOH Amide-80 5  $\mu$ m (250 mm  $\times$  2 mm d.i.) à +40  $^{\circ}$ C; élution à 0,2 mL/min avec gradient de 10 à 45 % de A en 25 min, puis 70 % de A à 27 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 du GTX2 (a,c,e) et du GTX3 (b,d,f) obtenus lors d'une analyse par CPL-SM/SM de GTX2&3 : balayage complet Q1 spectres de masse ESI en mode d'ions positifs (a,b); spectre des ions produits de  $m/z$  396 avec énergie de collision (EC) = 25 V (c,d); spectre des ions produits de  $m/z$  396 avec EC = 50 V (e,f). Conditions : CPL Agilent 1200 et SM Sciex API4000 QTRAP; potentialité de défragmentation = 35 V; volume injecté 2,5  $\mu$ L; colonne TOSOH Amide-80 (150 mm  $\times$  2 mm d.i.) à +40  $^{\circ}$ C; débit = 0,2 mL/min; élution isocratique avec 30 % de A (eau) et 70 % de 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-GTX2&3-d : S. Crain, W. Hardstaff, 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-GTX2&3-d, a certified calibration solution reference material for gonyautoxins-2 and -3", Biotoxin Metrology Technical Report CRM-GTX2&3-d-20170419, National Research Council Canada, Halifax.

DOI <https://doi.org/10.4224/crm.2017.gtx2-3-d.20170419>

*Date de délivrance : septembre 2017*

*Version du document : 20220225*

*Date de révision : février 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](mailto:CRM-MRCBiotoxin-Biotoxines@nrc-cnrc.gc.ca)

