



Certificat d'analyse

Matériau de référence certifié

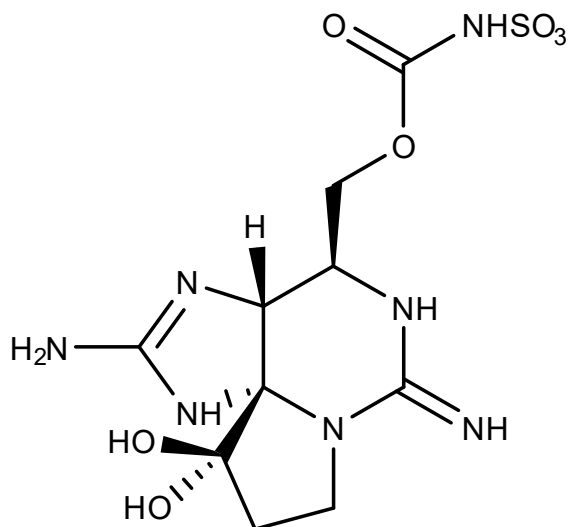
CRM-GTX5-d (lot n° 20191024)

Solution d'étalonnage certifiée pour la gonyautoxine-5

La gonyautoxine-5 (GTX5) est un analogue de la saxitoxine [1] présente dans les microalgues marines [2] et les cyanobactéries d'eau douce [3]. Le CRM-GTX5-d est une solution d'étalonnage certifiée de GTX5 dans l'acide acétique dilué (pH 5), mise au point pour faciliter l'identification et le dosage de la GTX5. Cette solution d'étalonnage remplace le CRM-GTX5-c.

Tableau 1 : Concentration certifiée et incertitude pour le CRM-GTX5-d.

Composé	$\mu\text{mol/L}$ (15-30 °C)
GTX5	53,6 \pm 2,9



Gonyautoxine-5 (GTX5)

N° CAS : 64296-25-9 (base libre)

InChIKey : JKKCSFJSULZNDN-HGRQIUPRSA-N (base libre)

Formule moléculaire : C₁₀H₁₇N₇O₇S₁

Masse moléculaire : 379,35 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-GTX5-d est une solution d'étalonnage certifiée conçue pour le développement de méthodes d'analyse et le dosage précis de GTX5. La concentration convient à la préparation d'une série de dilutions pour l'étalonnage d'instruments, 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 des échantillons de contrôle pour des expériences de récupération.

Instructions pour le stockage et l'utilisation

Pour assurer la stabilité de CRM-GTX5-d, les ampoules devraient être conservées à -12 °C ou moins.

Avant d'ouvrir une ampoule, il faudrait la laisser revenir à la température ambiante et bien mélanger son contenu. Les ampoules devraient être ouvertes au niveau de la marque prélimée. On devrait utiliser un équipement volumétrique étalonné pour transférer des aliquotes précises. Une augmentation de la concentration due à l'évaporation du solvant se produira si la solution est laissée à l'air libre plus de quelques minutes. Il est recommandé de ne pas évaporer complètement 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-GTX5-d

La N-sulfocarbamoyl-gonyautoxine-3 (C2) a été isolée à partir d'une culture de laboratoire à grande échelle d'*Alexandrium tamarense*, transformé chimiquement en GTX5, puis purifié suivant plusieurs étapes chromatographiques [4]. La structure et la pureté de la GTX5 ont été confirmées par CPL-SM/SM [5,6] (figures 1 et 2) et par RMN ¹H. Un ratio *m/z* mesuré avec une précision de 380,0984 ($\Delta = 0,2$ ppm pour le C₁₀H₁₈N₇O₇S₁⁺) a été obtenu pour l'ion [M+H]⁺ de la GTX5 (base libre) par CPL-SM haute résolution (CPL-SMHR). La pureté a ensuite été évaluée par CPL-SM, CPL-ox-DFL [7] (figure 3), électrophorèse capillaire avec UV (EC-UV) [8] et chromatographie en phase liquide avec détection d'azote par chimiluminescence (CPL-DNCL) [9].

La solution mère a été préparée par dilution de la GTX5 purifiée dans du H₂O pour quantification par RMN ¹H (RMNq) [10]. La solution de CRM-GTX5-d a été préparée par dilution précise de la solution mère dans de l'eau désionisée dégazée et ajustée à pH 5 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.

Méthodes d'analyse et attribution de la valeur

La valeur certifiée du CRM-GTX5-d (tableau 1) est basée sur les résultats obtenus au CNRC au moyen de trois méthodes d'analyse : la RMNq avec le phtalate acide de potassium (NIST SRM 84L) pour étalonnage, et CPL-DNCL et CPL-ox-DFL avec le CRM-GTX5-c du CNRC pour étalonnage.

Homogénéité

Nous avons prélevé un nombre représentatif d'ampoules de CRM-GTX5-d parmi la série d'ampoules produites, et en avons mesuré la réponse de la GTX5 par CPL-ox-DFL. Aucune hétérogénéité n'a été observée.

Stabilité

Une étude sur la stabilité pendant un an réalisée sur le CRM-GTX5-c a mis en évidence une bonne stabilité de la GTX5 dans l'acide acétique aqueux (pH 5) dans les ampoules scellées conservées à des températures de -12 °C ou moins.

Incertitude

Toutes les sources raisonnables d'erreurs liées à la caractérisation du CRM-GTX5-d ont été prises en compte et mesurées. 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}) [11-14]. Ces éléments sont donnés dans le tableau 2 et sont combinés de la manière suivante :

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

où k est le facteur de couverture pour un niveau de confiance de 95 % (= 2).

Tableau 2 : Éléments d'incertitude pour la valeur certifiée du CRM-GTX5-d.

Incertitudes	Relative*
u_{char}	0,026
u_{hom}	négligeable
u_{stab}	0,008

*Relative à la concentration indiquée dans le tableau 1.

Consignes de sécurité

L'ingestion d'une quantité suffisante de la GTX5 et de toxines connexes peut provoquer une paralysie et même la mort. Seules des personnes compétentes doivent manipuler cette solution et suivre les méthodes d'élimination appropriées. Il faut porter un équipement de protection individuelle approprié lors de l'ouverture d'une ampoule au cas où le verre se briserait. Une fiche de données de sécurité (FDS) est disponible pour le CRM-GTX5-d.

Période de validité

Si l'ampoule est conservée non ouverte à la température recommandée de -12 °C ou moins, la concentration certifiée du CRM-GTX5-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 préparés par gravimétrie à partir d'un matériau de référence certifié du NIST, le phtalate acide de potassium (NIST SRM 84L), et d'un matériau de référence certifié de GTX5 (CRM-GTX5-c du CNRC).

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. Thomas K, 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.
7. Anon. AOAC Official Method 2011.02. Paralytic shellfish toxins in mussels, clams, oysters, and scallops; post-column oxidation (PCOX) method (2009). *Official Methods of Analysis* 18th Ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
8. Thibault P, Pleasance S, Laycock MV (1991). Analysis of paralytic shellfish poisons by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 542: 483-501.
9. 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.
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.
12. 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.
13. 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.
14. Evaluation of measurement data – Supplement 1 to the “Guide to the expression of uncertainty in measurement” (GUM) – Propagation of distributions using a Monte Carlo method. JCGM 101:2008, www.bipm.org.

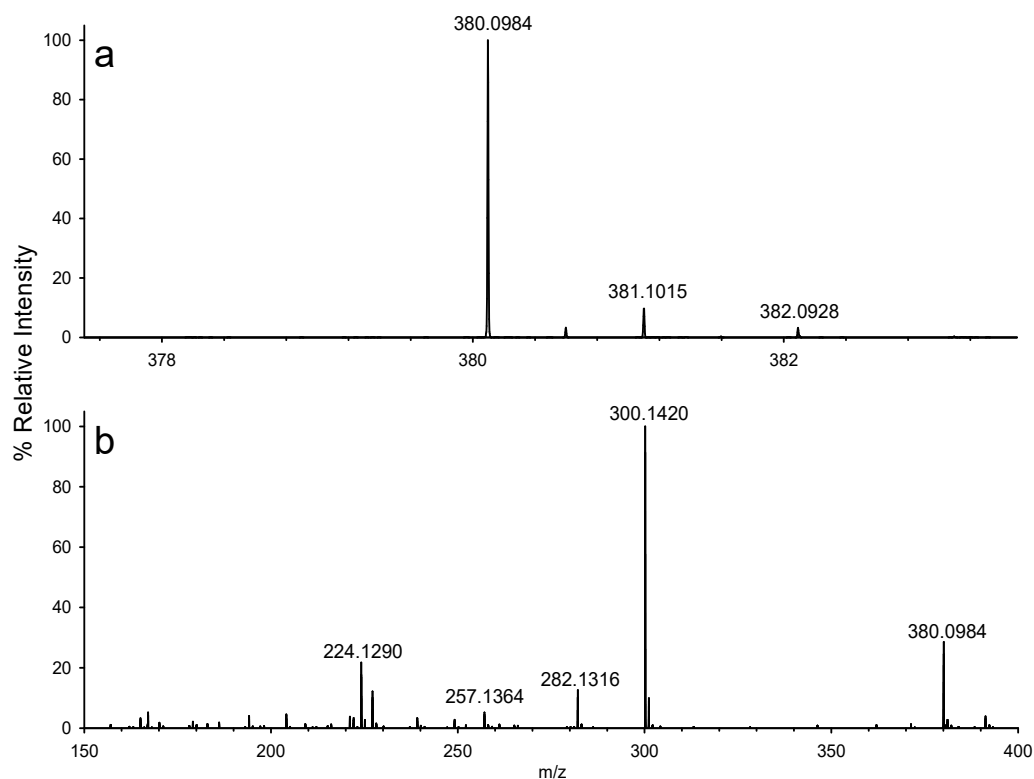


Figure 1 : Balayage complet (a) et dissociation induite par collision (SM/SM) (b) spectres CPL-SMHR de la GTX5 utilisée pour l'analyse du CRM-GTX5-d sur un spectromètre de masse Thermo QExactive-HF équipé d'une sonde d'ionisation par électronébulisation chauffée. Les données ont été acquises en ionisation positive à une tension d'électronébulisation de 2 500 V, une température du capillaire de +275 °C et une température de chauffage de +375 °C. Les données de balayage complet ont été acquises avec une résolution de 60 000. Les données SM/SM ont été acquises en mode parallèle de balayage avec sélection de réactions à une résolution de 60 000 et à une énergie de collision normalisée de 30 V.

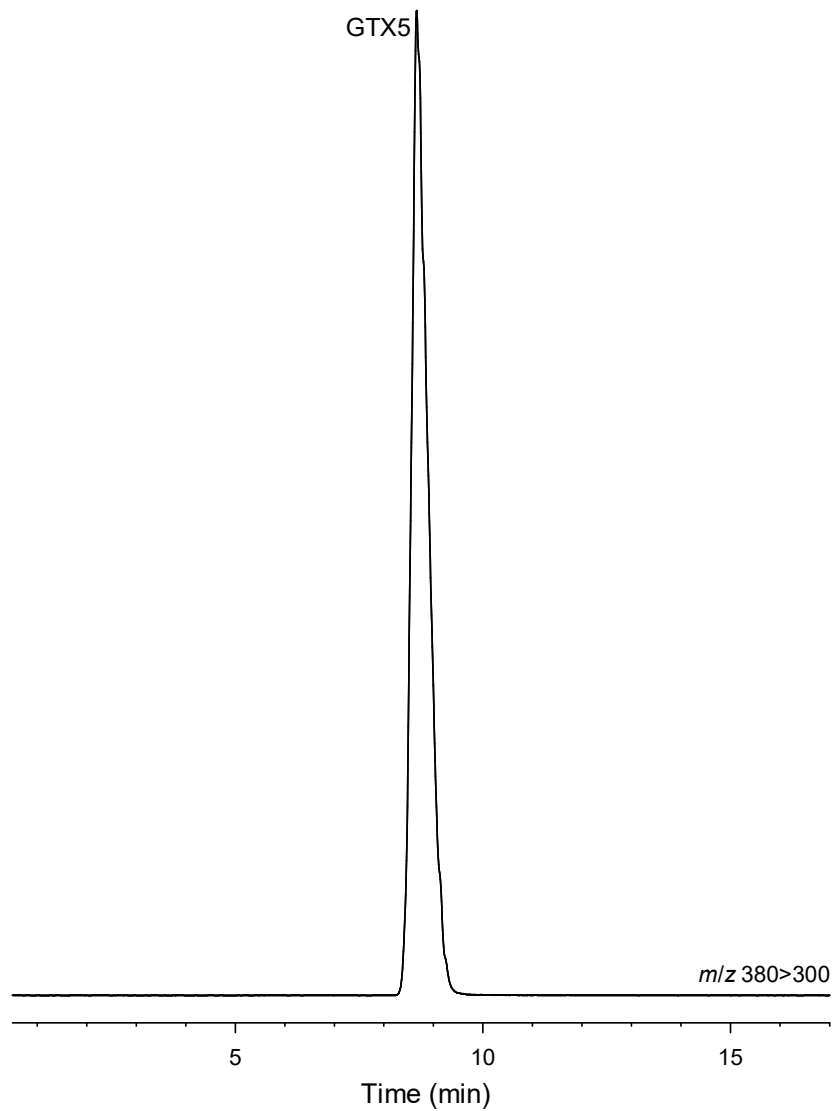


Figure 2 : Analyse CPL-SM/SM d'une solution mère diluée pour le CRM-GTX5-d avec sélection de réactions sur un appareil CPL Agilent 1290 couplé avec un spectromètre de masse Sciex 5500 QTRAP avec ionisation par électronébulisation. Conditions pour la CPL : colonne Toso-Haas Amide-80 (250 mm × 2 mm, 5 µm) à +40 °C; phase mobile : 60 % d'acétonitrile dans de l'eau avec 2 mM de formiate d'ammonium et 3,6 mM d'acide formique, 0,3 mL/min; volume d'injection : 0,5 µL. Conditions du SM : énergie de collision de +20 V; potentiel de désagrégation de +100 V et température de la source de +275 °C.

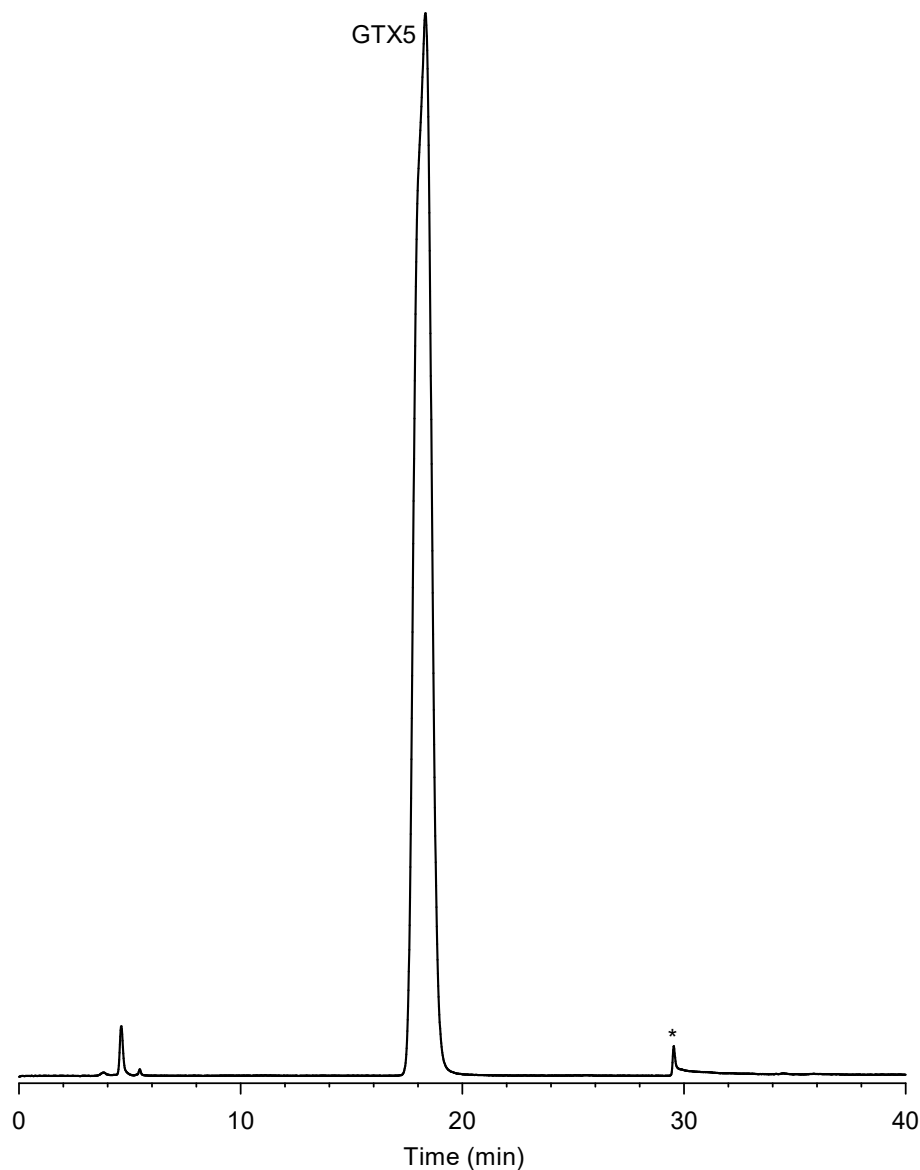


Figure 3 : Analyse du CRM-GTX5-d par CPL-ox-DFL. Conditions : colonne Zorbax Bonus-RP (250 mm × 4,6 mm d.i., 5 µm) à +35 °C; phase mobile : solution contenant 5,5 mM de phosphate d'ammonium et de 11 mM de sulfonate d'heptane de sodium dans de l'eau (pH de 7,1) avec transition à 23 minutes avec 16,5 mM de phosphate d'ammonium et une solution à 11 mM d'heptane sulfonate de sodium dans l'eau (pH de 7,1) avec 9 % d'acétonitrile : 0,8 mL/min; volume d'injection de 25 µL; oxydation post-colonne : 0,4 mL/min avec 5 mM d'acide périodique dans 100 mM de phosphate de sodium à un pH de 7,8 avec bobine de réaction à +80 °C; effluent acidifié avec 0,75 M d'acide nitrique à raison de 0,4 mL/min; détection : fluorescence avec excitation à 330 nm et émission à 390 nm (dans la figure, l'astérisque [*] indique le pic du gradient de transition).

Remerciements

Les membres suivants du personnel du CNRC ont contribué à la production et à la certification du CRM-GTX5-d : Beach D, Crain S, Giddings S, Gray T, Hogenbom J, LeBlanc P, McCarron P, Mudge E, Perez Calderon RA, Rafuse C, Rajotte I, Reeves K, Thomas K et Wright E.

Le présent document devrait être cité de la manière suivante :

Reeves K, Thomas K, Crain S, McCarron P "CRM-GTX5-d, a certified calibration solution reference material for Gonyautoxin-5", Biotoxin Metrology Technical Report CRM-GTX5-d-20191024, National Research Council Canada, Halifax.

DOI <https://doi.org/10.4224/crm.2020.gtx5-d.20191024>

Date de délivrance : Août 2020

Version du document : 20220221

Date de révision : Décembre 2020 (DOI ajouté), Février 2022 (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 Canada
1411, rue Oxford
Halifax, Nouvelle-Écosse B3H 3Z1
Canada

Téléphone : 1-902-426-8281

Télécopieur : 1-902-426-5426

Courriel : CRM-MRCHalifax@nrc-cnrc.gc.ca