



# Certificat d'analyse

## Matériau de référence certifié

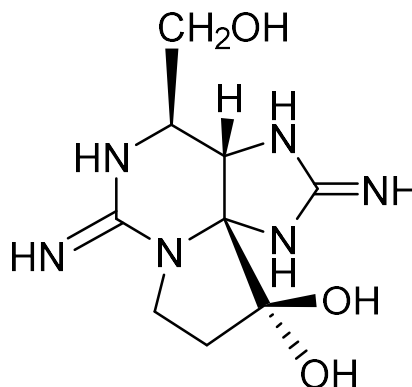
### CRM-dcSTX-c (n° de lot 20201125)

Solution d'étalonnage certifiée pour la décarbamoilsaxitoxine

La décarbamoilsaxitoxine (dcSTX) est un analogue de la saxitoxine [1] présente dans les microalgues marines [2] et les cyanobactéries d'eau douce [3]. Le CRM dcSTX-c est une solution d'étalonnage certifiée de dcSTX dans de l'acide chlorhydrique aqueux de 0,5 mM, mise au point pour faciliter l'identification et le dosage de la dcSTX. Cette solution d'étalonnage remplace le CRM-dcSTX-b.

Tableau 1 : Concentration certifiée et incertitude du CRM-dcSTX-c.

Composé	$\mu\text{mol/L}$ (15 - 30 °C)
Décarbamoilsaxitoxine (dcSTX)	65,3 $\pm$ 2,6



#### Décarbamoilsaxitoxine (dcSTX)

Numéro du CAS : 58911-04-9 (base libre)

InChiKey : VRRIZJUSNMZMP-PJPYAQQDSA-N (base libre)

Formule moléculaire :  $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_3$

Masse moléculaire : 256,3 g/mol

Période de validité : 1 an à partir de la date de vente.

Conditions de stockage : +4 °C

## Utilisation prévue

Le CRM-dcSTX-c est une solution d'étalonnage certifiée destinée au développement de méthodes d'analyse et au dosage précis de la dcSTX. La concentration convient à la préparation d'une série de dilutions pour la chromatographie en phase liquide avec détection par oxydation-fluorescence pré/post-colonne (CPL-ox-DFL) ou la chromatographie en phase liquide avec spectrométrie de masse (CPL-SM), ainsi qu'au dopage des échantillons de contrôle à des fins de calcul de taux de récupération.

## Instructions pour le stockage et l'utilisation

Pour s'assurer de la stabilité du CRM-dcSTX-c, les ampoules doivent être conservées à +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. On devrait utiliser un équipement volumétrique étalonné pour transférer des aliquotes précises. Si la solution est laissée à l'air libre plus de quelques minutes, une augmentation de la concentration surviendra en raison de l'évaporation du solvant. Il est recommandé de ne pas laisser 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. Le contenu entier de l'ampoule ne doit donc pas être simplement transféré dans une fiole jaugée, puis dilué.

## Préparation du CRM-dcSTX-c

La N-sulfocarbamoylgonyautoxine-2 et -3 (C1 et 2) a été isolée à partir d'une culture de laboratoire à grande échelle d'*Alexandrium tamarense*, transformé chimiquement en dcSTX, puis purifié suivant plusieurs étapes chromatographiques [4]. La structure et la pureté de la dcSTX ont été confirmées par CPL-SM/SM [5, 6] (figures 1 et 2) et par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) de <sup>1</sup>H. Un ratio m/z mesuré avec une précision de 257,1356 ( $\Delta = -0,2$  ppm pour le  $C_9H_{17}N_6O_3^+$ ) a été obtenu pour l'ion  $[M+H]^+$  de la dcSTX (base libre) par CPL-SM haute résolution (CPL-SMHR). La pureté a ensuite été évaluée par 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 dcSTX purifiée dans de l'acide chlorhydrique aqueux de 0,5 mM pour quantification par RMN <sup>1</sup>H (RMNq) [10]. La solution de CRM-dcSTX-c a été préparée en faisant une dilution précise de la solution mère dans de l'acide chlorhydrique aqueux de 0,5 mM. Des aliquotes ont été transférées dans des ampoules en verre ambré remplies d'argon et ensuite scellées immédiatement à la flamme. Chaque ampoule contient environ 0,5 mL de solution.

## Méthodes d'analyse et attribution de la valeur

La valeur certifiée pour le CRM-dcSTX-c (tableau 1) est basée sur des résultats obtenus au Conseil national de recherches Canada (CNRC) au moyen de trois méthodes d'analyse : RMNq à l'aide de l'hydrogénophthalate de potassium pour l'étalonnage, CPL-DNCL à l'aide de la caféine pour l'étalonnage et CPL-SM/SM à l'aide du CRM-dcSTX-b pour l'étalonnage.

## Homogénéité

Un nombre représentatif d'ampoules de CRM-dcSTX-c a été prélevé parmi toutes les ampoules et la réponse de la dcSTX a été mesurée par CPL-ox-DFL. Aucune hétérogénéité n'a été observée.

## Stabilité

Les études de stabilité ont démontré une bonne stabilité de la dcSTX dans de l'acide chlorhydrique aqueux stockée dans des ampoules scellées à +4 °C ou moins.

## Incertitude

Toutes les sources raisonnables d'erreur liées à la caractérisation du CRM-dcSTX-c ont été prises en compte et quantifiées. 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 de la valeur certifiée du CRM-dcSTX-c.

Incertitudes	Relative*
$u_{char}$	0,020
$u_{hom}$	négligeable
$u_{stab}$	0,001

\* Relative à la concentration indiquée dans le tableau 1.

## Consignes de sécurité

L'ingestion d'une quantité suffisante de dcSTX et de toxines connexes peut provoquer une paralysie ou même la mort. Seules les personnes qualifiées peuvent manipuler la solution, et des méthodes appropriées d'élimination doivent être employées. Un équipement de protection individuelle approprié doit être porté 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-dcSTX-c.

## Période de validité

Lorsque l'ampoule non ouverte est stockée à la température recommandée (+4 °C), la concentration certifiée du CRM dcSTX-c 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, l'hydrogénophthalate de potassium (NIST SRM 84L), un matériau de référence certifié de la NMIA, la caféine (M724d) et un matériau de référence certifié du CNRC pour la dcSTX (CRM-dcSTX-b, lot n° 20110713).

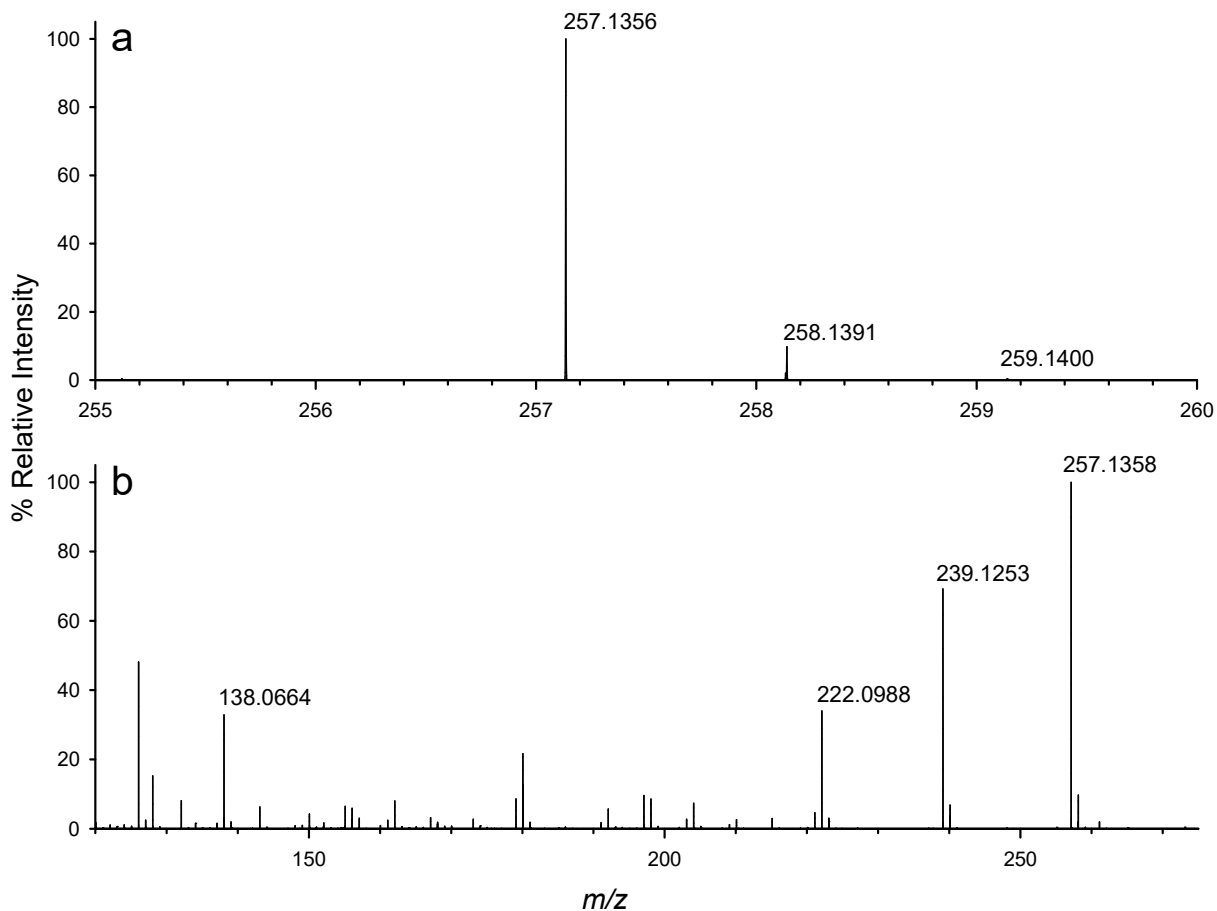
**Système de gestion de la qualité (ISO 17034, ISO/CEI 17025)**

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.

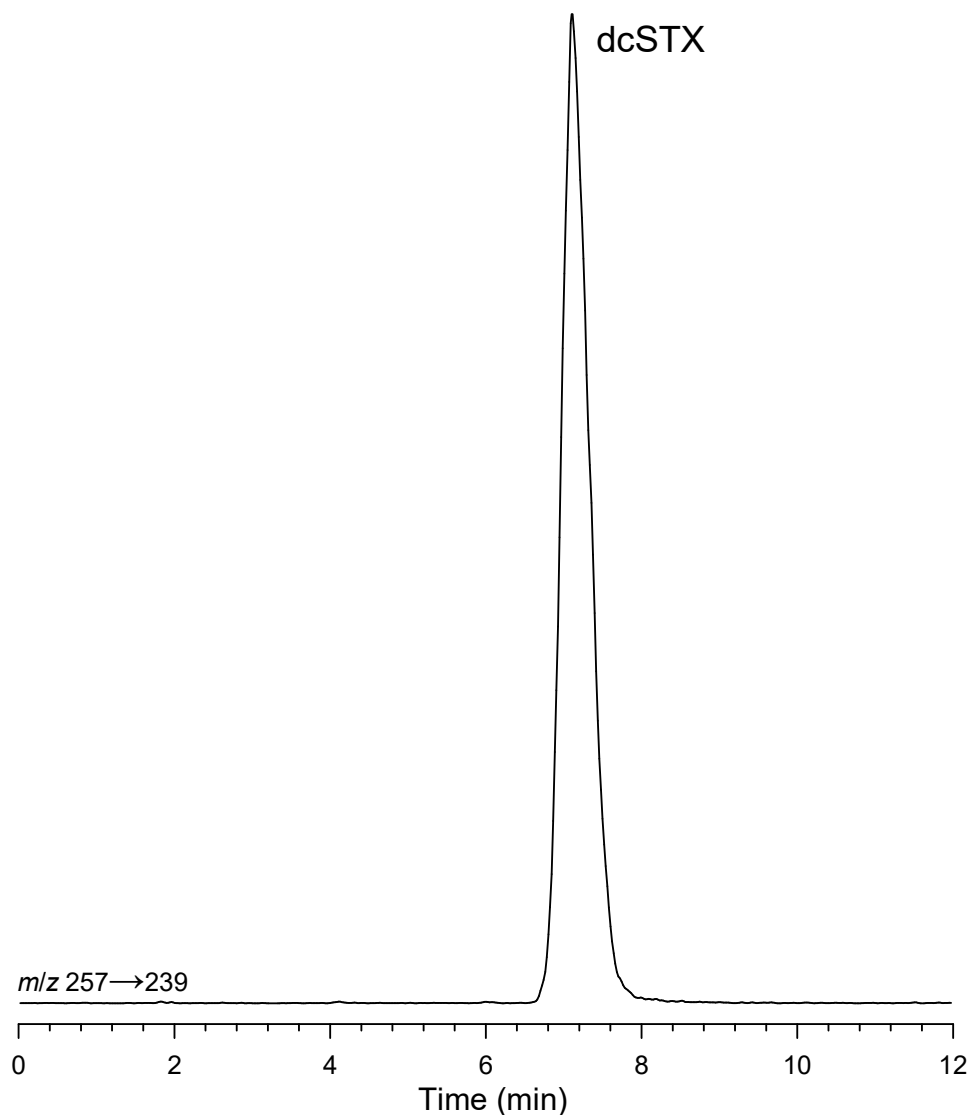
Le Système de gestion de la qualité de Métrologie qui appuie les aptitudes en matière de mesures et d'étalonnages du CNRC, telles qu'indiquées dans la base de données des comparaisons clés du Bureau international des poids et mesures (BIPM) ([http://kcdb.bipm.org/default\\_fr.asp](http://kcdb.bipm.org/default_fr.asp)), 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

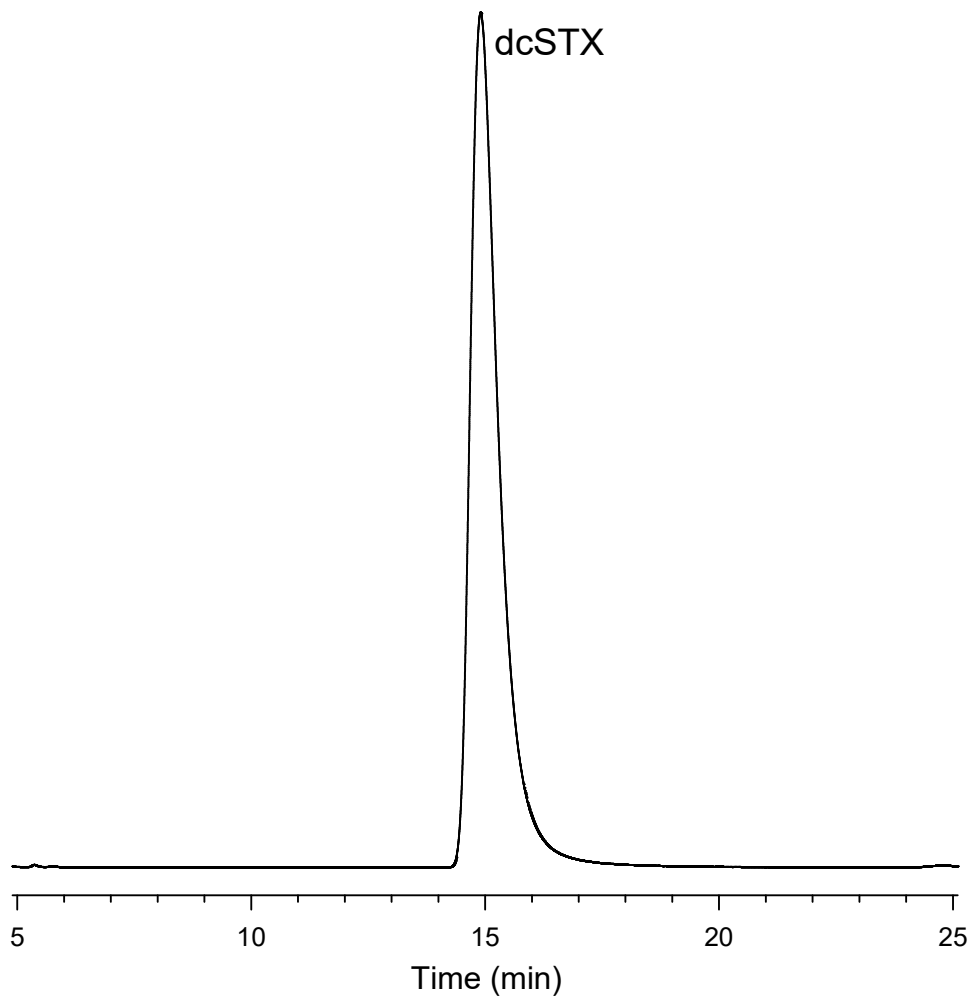
1. Hall S, Strichartz GR, Moczydlowski E, Ravindran A, Reichardt PB (1990). The saxitoxins: sources, chemistry, and pharmacology. In: Hall S and Strichartz GR (Eds) *Marine Toxins. ACS Symposium Series* 418: 29-65. Washington DC, *Am Chem Soc*.
2. Shumway SE (1990). A review of the effects of algal blooms 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  $^1\text{H}$  NMR with external standards: use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products. *Anal Chem* 77: 3123-3131.
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. *Accredit 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. *Accredit 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](http://www.bipm.org).



**Figure 1 :** Balayage complet (a) et dissociation induite par collision (SM/SM) (b) spectre CPL-SMHR de la dcSTX utilisée pour l'analyse du CRM-dcSTX-c 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 120 000. Les données SM/SM ont été acquises en mode parallèle de balayage avec sélection de réactions à une résolution de 120 000 et à une énergie de collision normalisée de 30 V.



**Figure 2 :** Analyse par CPL-SM/SM du CRM-dcSTX-c, avec surveillance de réaction sélectionnée sur un appareil CPL Agilent 1260 connecté à un SM Sciex 4000 QTRAP, avec ionisation par électro-ébulisaison. Conditions pour la CPL : colonne Tosoh-Haas Amide-80 (250 mm × 2 mm, 5 µm) à +40 °C; phase mobile : 50 % d'acétonitrile dans de l'eau avec 2 mM de formiate d'ammonium et 50 mM d'acide formique, 0,3 mL/min; volume d'injection : 2 µL. Conditions du SM : énergie de collision de +25 V; potentiel de désagrégation de +60 V et température de la source de +275 °C.



**Figure 3 :** Analyse CPL-ox-DFL du CRM dcSTX-c. Conditions : colonne = Zorbax Bonus-RP (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) à +37 °C; phase mobile = eau avec de l'acide phosphorique 20 mM, du sulfonate d'heptyle 8 mM et 11 % d'acétonitrile, pH = 7,1 à 0,8 mL/min; volume injecté 20  $\mu$ L; oxydation en sortie de colonne à 0,4 mL/min avec de l'acide périodique 5 mM, de l'acide phosphorique 100 mM dans de l'eau, pH = 7,8; boucle de réaction de 1 mL à +80 °C; effluent acidifié avec de l'acide nitrique 0,75 M à 0,4 mL/min; détection = fluorescence avec excitation à 330 nm et émission à 390 nm.

## Remerciements

Les membres suivants du personnel du CNRC ont contribué à la production et à la certification du CRM-dcSTX-c : Giddings SD, LeBlanc P, McCarron P, Rafuse C, Rajotte I, Reeves KL, Thomas KM et Wright EJ.

### Le présent document devrait être cité de la manière suivante :

Reeves KL, Thomas KM, Giddings SD, McCarron P "CRM-dcSTX-c, a certified calibration solution reference material for Decarbamoylsaxitoxin", Biotoxin Metrology Technical Report CRM-dcSTX-c-20201125, National Research Council Canada, Halifax.

DOI <https://doi.org/10.4224/crm.2021.dcstx-c.20201125>

*Date de délivrance : Mars 2021*

*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

**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](mailto:CRM-MRCHalifax@nrc-cnrc.gc.ca)

