Certificat d'analyse

CNRC·NRC Matériau de référence certifié

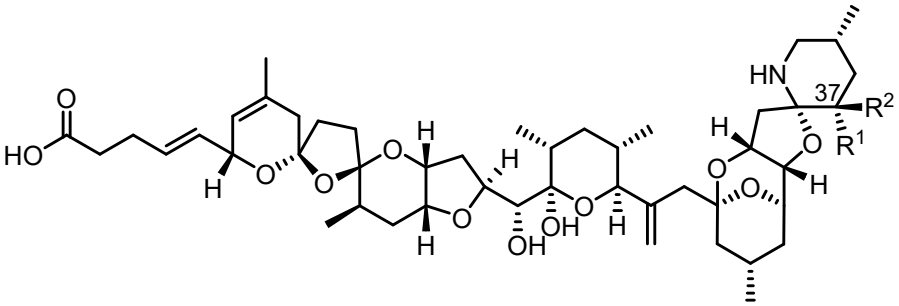
CRM-AZA2-b (lot numéro 20131126)

Solution d'étalonnage certifiée pour l'azaspiracide-2

Les azaspiracides (AZA) constituent une classe puissante de toxines de crustacés et mollusques. Ils ont été découverts pour la première fois en Irlande en 1995 après un incident d'intoxication d'humains liés à la consommation de fruits de mer [1,2]. Les AZA possèdent des assemblages spiro uniques comportant des groupements carboxyliques et aminés [3,4]. Le dinoflagellé *Azadinium spinosum* a été identifié comme la source des AZA [5]. Les symptômes d'intoxication peuvent comprendre la nausée, des crampes d'estomac, des maux de tête, le vomissement et la diarrhée. Le niveau total maximal permis pour les AZA (AZA1, AZA2 et AZA3) dans les mollusques et crustacés est actuellement de 0,16 mg/kg de tissu entier [6]. Le CRM-AZA2-b est une solution d'étalonnage certifiée d'AZA2 dans du méthanol et remplace le CRM-AZA2 qui avait été mis en circulation en 2011.

Tableau 1 : Concentrations certifiées pour le CRM-AZA2-b

Composé	µmol/L (à +20 °C)	µg/mL (à +20 °C)	µg/g
Azaspiracide-2 (somme de AZA2 + 37-*épi*-AZA2)	1,43 ± 0,07	1,22 ± 0,06	1,55 ± 0,08



	R^1	R^2
Azaspiracid-2	CH_3	H
37-*epi*-Azaspiracid-2	H	CH_3

Azaspiracide-2
Numéro de registre CAS : 265996-92-7
Formule moléculaire : $C_{48}H_{73}NO_{12}$
Masse moléculaire : 856,1
$[M+H]^+$: *m/z* 856,5206

Période de validité : 1 an à partir de la date de vente
Conditions d'entreposage : -12 °C ou moins

Utilisation prévue

Le CRM-AZA2-b est conçu comme solution d'étalonnage d'instruments afin d'aider l'analyste à doser l'AZA2 dans des extraits de plancton, de crustacés et mollusques. La méthode d'analyse la plus courante est la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL/SM), et la concentration en AZA2 du CRM-AZA2-b convient à l'étalonnage de la plupart des instruments de CL/SM. Le CRM-AZA2-b peut également servir au dopage d'échantillons de contrôle de mollusques et de crustacés à des fins de calcul de taux de récupération.

Instructions pour l'entreposage et l'utilisation

Afin d'assurer la stabilité du CRM-AZA2-b, les ampoules devraient être entreposées à -12 °C ou moins. De même, toute aliquote ou dilution de cette solution devrait être stockée à -12 °C dans des flacons à faible espace de tête.

Avant d'ouvrir l'ampoule, son contenu doit atteindre la température ambiante et être bien mélangé. Les ampoules devraient être ouvertes au niveau de la marque. Une fois l'ampoule ouverte, des aliquotes précises devraient être prélevées au moyen d'un appareil volumétrique jaugé, puis transférées dans des fioles ou des flacons jaugés. Une augmentation de la concentration due à l'évaporation du méthanol surviendra si la solution est laissée ouverte pendant quelques minutes. On recommande de ne pas complètement assécher les solutions de CRM-AZA2-b, en raison d'une possible décomposition sur les parois en verre. *Note :* 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-AZA2-b

L'AZA2 a été isolé de tissus de crustacés et mollusques collectés en 2005 à Bruckless, comté de Donegal, Irlande. L'extraction et la purification préparative de l'AZA2 ont été réalisées au Marine Institute (Irlande), avec une purification finale et des vérifications de la pureté réalisées au Conseil national de recherches du Canada à Halifax. La structure et la pureté de l'AZA2 ont été confirmées par RMN et CL-SM/SM. Aucune impureté significative n'a été détectée. Une masse exacte mesurée de 856,5194 +/- 0,0002 (Δ = -1,4 ppm pour $C_{48}H_{74}NO_{12}$) a été déterminée pour $[M+H]^+$ de l'AZA2 par SM haute résolution. La figure 1 représente le spectre SM haute résolution des ions produits.

Une solution mère a été préparée en dissolvant l'AZA2 pur dans du CD_3OH à des fins d'analyse par RMN quantitative (RMNq). La solution de MRC a été préparée en faisant une dilution précise de la solution mère pour RMNq dans du méthanol dégazé de haute pureté. 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 transférées dans des ampoules de verre ambré remplies d'argon, qui ont été scellées immédiatement à la flamme.

Méthodes d'analyse et attribution de la valeur

La valeur certifiée du CRM-AZA2-b est basée sur les résultats obtenus au CNRC au moyen de deux méthodes indépendantes : RMNq [7] sur la solution mère d'AZA2 en utilisant des étalons de caféine de haute pureté pour l'étalonnage externe; CL-SM/SM avec phase mobile pH neutre, en utilisant le CRM-AZA2 (lot n° 20081211) pour l'étalonnage. Il est important de noter que la valeur certifiée du CRM-AZA2-b a été calculée comme étant la somme des concentrations d'AZA2 et d'un épimère, le 37-*épi*-AZA2 [8]. L'épimère est résolu à partir de l'AZA2 en utilisant une colonne avec phase mobile neutre (figure 2A). Toutefois, avec certains systèmes colonne/phase mobiles couramment utilisés (figure 2B), ces composés peuvent ne pas être résolus. Nous avons fait l'hypothèse de facteurs de réponse équimolaires quand nous

avons fait la somme des surfaces des pics de l'AZA2 et du 37-*épi*-AZA2, sur la base d'études précédemment réalisées [8]. La surface du pic du 37-*épi*-AZA2 correspond à environ 4,9 % du total des surfaces des pics de l'AZA2 et du 37-*épi*-AZA2. Une faible quantité d'AZA1 se trouve dans le CRM-AZA2-b (tableau 2).

Tableau 2 : Valeur informative pour l'AZA1 présent dans le CRM-AZA2-b au moment de l'emballage

Composé	$[M+H]^+$, *m/z*	Concentration * (µmol/L) (à +20 °C)
Azaspiracide-1 (somme de AZA1 + 37-*épi*-AZA1)	842,5	0,02

* Cette concentration n'est pas certifiée.

Homogénéité

Un nombre représentatif d'ampoules de CRM-AZA2-b (n = 20) ont été prélevées parmi la série complète d'ampoules remplies et les concentrations d'AZA2 ont été mesurées par CL-SM/SM. Les résultats ont été évalués par ANOVA et aucune hétérogénéité n'a été détectée parmi la série complète d'ampoules.

Étude sur la stabilité

Des études sur la stabilité à court et long terme ont été réalisées sur le CRM-AZA2. Étant donné que le processus de production et les concentrations sont équivalents au CRM-AZA2-b, nous avons raisonnablement assumé une stabilité comparable. Les études sur la stabilité ont montré qu'il n'y a aucune dégradation considérable de l'AZA2 dans le méthanol à -12 °C ou moins pendant un an. Aucune dégradation significative n'a été observée à des températures allant jusqu'à +37 °C après 10 jours. Toutefois, la dégradation à cette température après un an était considérable.

Incertitude

Toutes les sources raisonnables d'erreur liées à la caractérisation du CRM-AZA2-b ont été prises en compte et quantifiées. Un élément d'incertitude combinée lié aux deux méthodes d'analyse utilisées est inclus (μ_{char}). L'estimation de l'incertitude globale (U_{CRM}) comprend des incertitudes associées à la caractérisation du lot (μ_{char}), à la variation d'une ampoule à l'autre (μ_{hom}) et à l'instabilité durant le stockage à long terme (μ_{stab}) [9] . Ces éléments sont donnés dans le tableau 3 et sont combinés de la manière suivante :

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

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

Tableau 3 : Éléments d'incertitude pour la valeur certifiée du CRM-AZA2-b

Incertitudes	[µmol/L]
μ_{char}	0,036
μ_{hom}	négligeable
μ_{stab}	0,009
U_{CRM} (k=2)	0,075

Consignes de sécurité

L'AZA2 est toxique en cas d'ingestion ou d'inhalation. S'il est ingéré, l'AZA2 peut provoquer des nausées, des vomissements, de la diarrhée et des crampes d'estomac. L'inhalation et l'ingestion du méthanol sont aussi dangereuses. L'ingestion peut entraîner la cécité ou être mortelle, alors qu'un contact cutané prolongé peut entraîner une dermatite et/ou des dommages aux reins. Seules les personnes qualifiées devraient manipuler la solution, et des méthodes appropriées d'élimination doivent être suivies. Lors de l'ouverture de l'ampoule, il faudrait porter des gants et une protection pour les yeux. Une fiche signalétique (FS) est disponible pour le CRM-AZA2-b**.**

Période de validité

Quand l'ampoule non ouverte est stockée dans les conditions recommandées, la concentration certifiée du CRM-AZA2-b est valide pendant un an à compter de la date de vente.

Traçabilité métrologique

Les résultats présentés dans ce certificat sont traçables au SI (*Système international d'unités*) par l'entremise d'étalons de pureté établie, préparés gravimétriquement.

Management de la qualité (ISO/CEI 17025, ISO Guide 34)

Ce matériel a été produit conformément au système qualité documenté de Science des mesures et étalons du CNRC, qui est conforme aux exigences de la norme ISO/CEI 17025 et du Guide ISO 34.

Le système de management de la qualité à l'appui des aptitudes en matière de mesure et d'étalonnages du CNRC, comme indiqué dans la base de données (http://kcdb.bipm.org/) du Bureau international des poids et mesures (BIPM), 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. McMahon T. et Silke J.; 1996; Winter toxicity of unknown aetiology in mussels; *Harmful Algae News,* 14:2.
2. Kilcoyne J., Jauffrais T., Twiner M.J., Doucette G.J., Aasen Bunæs J.A., Sosa S., Krock B., Séchet V., Nulty C., Salas R., Clarke D., Geraghty J., Duffy C., Foley B., John U., Quilliam M.A., McCarron P., Miles C.O., Silke J., Cembella A., Tillmann U. et Hess P.; 2014; *AZASPIRACIDS - Toxicological Evaluation, Test Methods and Identification of the Source Organisms (ASTOX II);* Marine Research Sub-Programme (NDP 2007-'13) Series, vol. ISSN : 2009-3195; Marine Institute; Irlande.
3. Satake M., Ofuji K., Naoki H., James K.J., Furey A., McMahon T., Silke J. et Yasumoto T.; 1998; Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis; J.Am. Chem. Soc.,* 120, p. 9967-9968.
4. Nicolaou K.C., Koftis T.V., Vyskocil S., Petrovic G., Tang W., Frederick M.O., Chen D.Y.K., Li Y., Ling T. et Yamada Y.M.A.; 2006; Total synthesis and structural elucidation of azaspiracid-1. Final assignment and total synthesis of the correct structure of azaspiracid-1; *J. Am. Chem. Soc.,* 128, p. 2859-2872.
5. Tillmann U., Elbrachter M., Krock B., John U. et Cembella A.; 2009; *Azadinium spinosum* gen. et sp. nov. (*Dinophyceae*) identified as a primary producer of azaspiracid toxins; *Eur. J. Phycol.* 44, p. 63-79.
6. Anonyme; 2004; Règlement (CE) n° 853/2004 du Parlement et du Conseil de l'Europe, 29 avril 2004, stipulant des règles d'hygiène spécifiques pour les aliments d'origine animale; *Off. J. Eur. Union*, L 139 du 30 avril 2004.
7. Burton I.W., Quilliam M.A. et Walter J.A.; 2005; Quantitative ^{1}H NMR with external standards: Use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products; *Anal. Chem.,* 77, p. 3123-3131.
8. Kilcoyne J., McCarron P., Twiner M.J., Nulty C., Crain S., Quilliam M.A., Rise F., Wilkins A.L. et Miles C.O.; 2014; Epimers of azaspiracids: Isolation, structural elucidation, relative LC-MS response, and in vitro toxicity of 37-epi-azaspiracid-1; *Chem. Res. Toxicol.,* 27, p. 587-600.
9. Pauwels J., Lamberty A. et Schimmel H.; 2000; Evaluation of uncertainty of reference materials; *Accred. Qual. Assur.*, 5, p. 95-99.

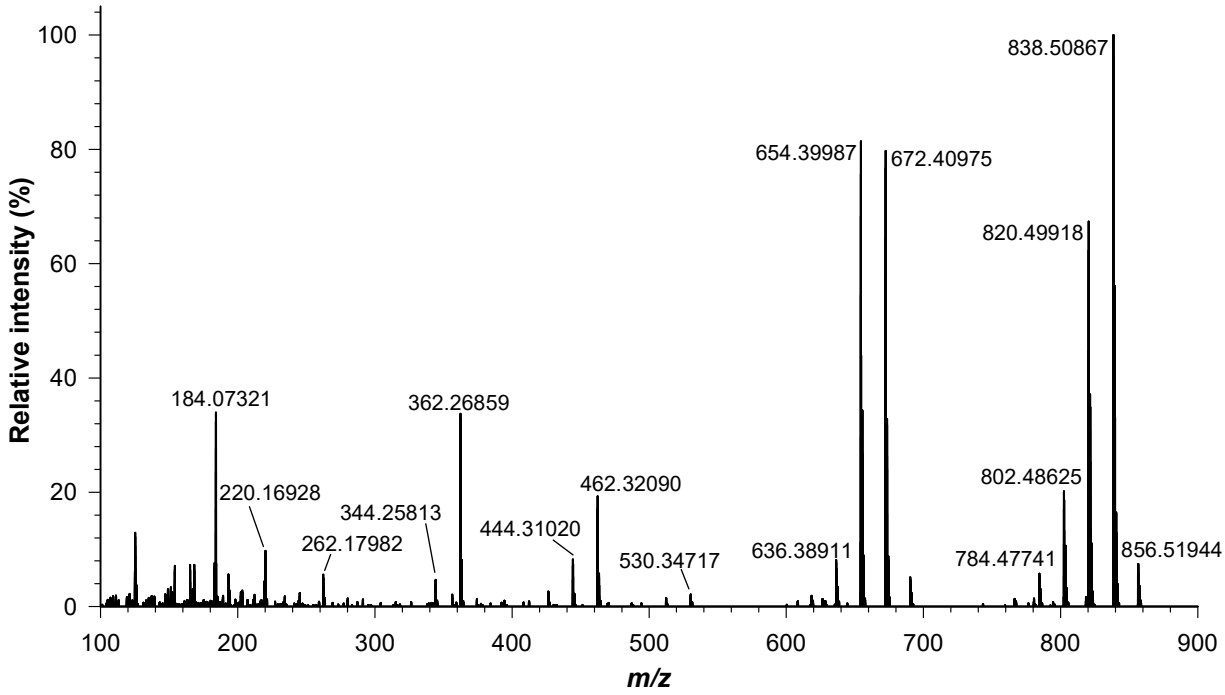


Figure 1 : Spectre de masse à haute résolution des ions produits de l'ion $[M+H]^+$, *m/z* 856,5, de l'AZA2 présent dans le CRM-AZA2-b, mesuré au moyen d'un spectromètre de masse Thermo Exactive Orbitrap muni d'une sonde chauffée d'ionisation par électronébulisation. Données acquises en mode ion positif avec tension de nébulisation de 3,3 kV, température du capillaire de + 250 °C et température de l'élément chauffant de + 300 °C. Le balayage par dissociation induite par collisions à haute énergie (70 eV HCD) a été obtenu avec l'instrument réglé à une résolution de 50 000 (fréquence de balayage de 2 Hz).

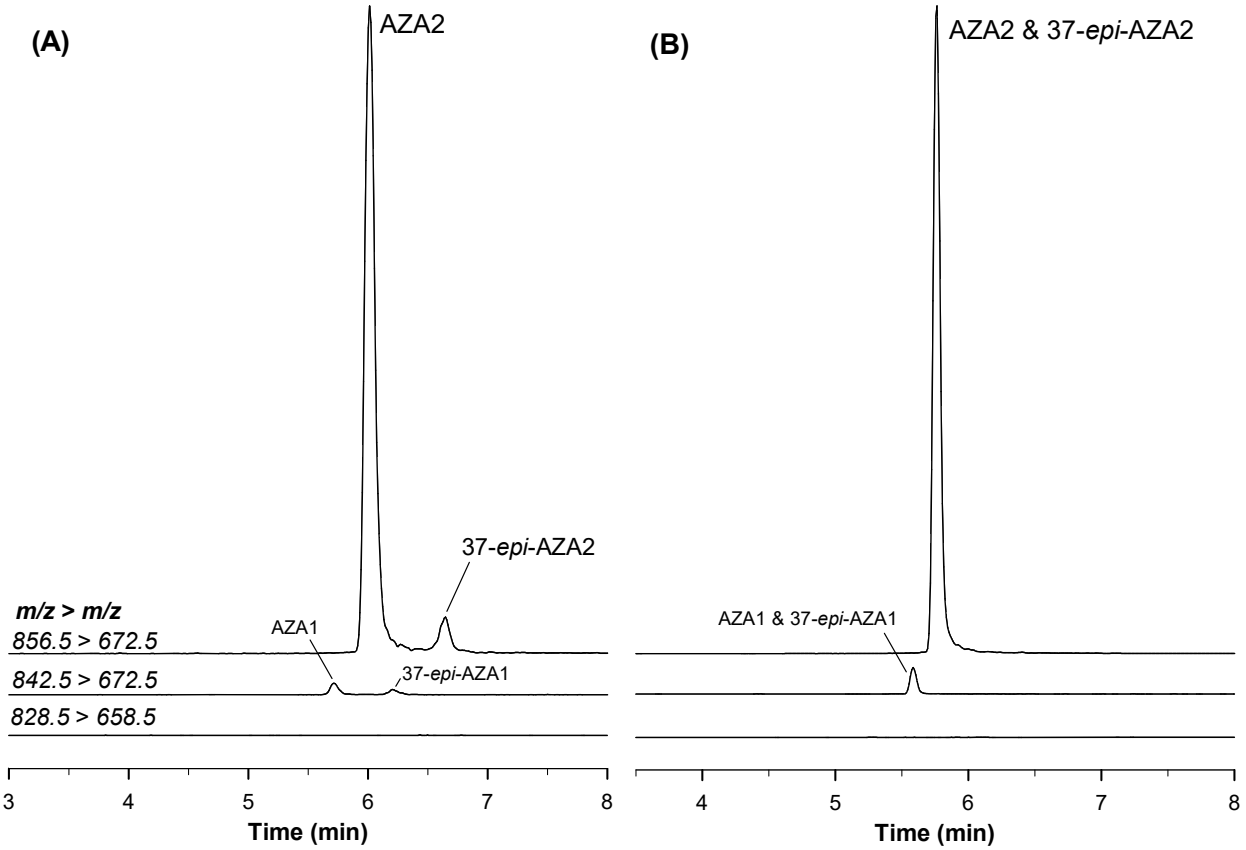


Figure 2 : Chromatogrammes CL-SM/SM du CRM-AZA2-b obtenus avec une phase mobile pH neutre **(A)** et une phase mobile pH acide **(B)**, montrant la résolution et la co-élution de l'AZA2 et du 37-*épi*-AZA2. Conditions pour la phase neutre : colonne Luna C18(2) (2,1 × 50 mm, 2,5 µm); phase mobile : (A)= eau désionisée et (B)= 95 % acétonitrile, les deux avec acétate d'ammonium 5 mM (pH 6,8); gradient 25 -100 % B en 5 min, 350 µL/min à +15 °C; volume injecté 5 µL. Conditions pour la phase acide : colonne Luna C18(2) (2,1 × 50 mm, 2,5 µm); phase mobile : (A)= eau désionisée et (B)= 95 % acétonitrile, les deux avec formate d'ammonium 2 mM et acide formique 50 mM (pH 2,3); gradient 25 -100 % B en 5 min, 300 µL/min à +20 °C; volume injecté 5 µL.

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-AZA2-b : D. Beach, S. Crain, S.D. Giddings, W. Hardstaff, J. Hui, P. LeBlanc, N. Lewis, P. McCarron, R.A. Perez, M.A. Quilliam et K. Thomas.

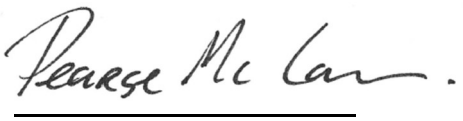
Nous reconnaissons Jane Kilcoyne, Conor Duffy et Joe Silke du Marine Institute (Galway, Irlande) pour la fourniture de l'AZA2 purifié.

Le présent document devrait être cité comme suit :

S. Crain, R.A. Perez, P. LeBlanc, M.A. Quilliam, P. McCarron, "CRM-AZA2-b, certified calibration solution for azaspiracid-2" Biotoxin Metrology Technical Report CRM-AZA2-b-20131126, National Research Council Canada, Halifax, January 2015.
DOI https://doi.org/10.4224/crm.2015.aza2-b.20131126

Date de délivrance : février 2015
Version du document : 20220315

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

Approuvé par : 

Pearse McCarron, Ph.D.
Chef de discipline, Métrologie des biotoxines
Science des mesures et étalons

Le texte anglais est la version définitive de ce document.

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