

Certificat d'analyse

CNRC-NRC

Matériau de référence certifié

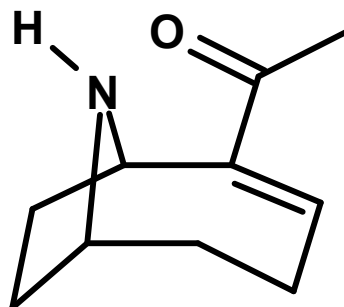
CRM-ATX (lot numéro 20100721)

Solution d'étalonnage certifiée pour l'anatoxine-a

L'anatoxine-a (ATX-a) est une toxine cyanobactérienne liée à la mortalité d'animaux en Amérique du Nord [1] et ailleurs dans le monde [2]. Le CRM-ATX du CNRC est une solution d'étalonnage certifiée préparée pour aider l'analyste à doser l'ATX-a. Chaque ampoule contient environ 0,5 mL d'ATX-a dissous dans une solution méthanol/eau (9/91, v/v), avec 0,01% d'acide acétique. Cette concentration convient pour l'étalonnage d'analyses par chromatographie en phase liquide, pour l'ajout d'un étalon et pour des études de récupération dans les échantillons additionnés de l'ATX-a.

Tableau 1 : Concentrations certifiées dans le CRM-ATX

Composé	$\mu\text{mol/L}$ (à +20 °C)	$\mu\text{g/mL}$ (à +20 °C)	$\mu\text{g/g}$
Anatoxine-a	$30,0 \pm 1,1$	$4,96 \pm 0,18$	$5,03 \pm 0,18$



(+) Anatoxine-a

Numéro du CAS : 64285-06-9

Formule moléculaire : $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}$

Masse moléculaire : 165,232 g/mol

$[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 166,1226

Date d'expiration : 1 an après la date de vente

Conditions de stockage : au noir et à -20 °C



Conseil national de
recherches Canada

National Research
Council Canada

Canada

Utilisation prévue

Le CRM-ATX est une solution d'étalonnage de matériau de référence certifié (MRC) conçu pour le développement de méthodes d'analyse et le dosage précis de l'ATX-a. La concentration du MRC permet de préparer une série de dilutions à des fins d'étalonnage d'instruments, comme un système de chromatographie en phase liquide avec détection par absorption ultraviolette (CL-UV), fluorescence (CL-FL) ou spectrométrie de masse (CL-SM). Cette concentration permet aussi d'enrichir des échantillons de contrôle à des fins de calcul de taux de récupération.

Préparation du CRM-ATX

L'ATX-a a été isolé d'une culture d'algues du genre *Aphanizomenon issatschenkoi* [3]. La toxine a été extraite des cellules, purifiée par chromatographie, puis séchée sous vide jusqu'à obtention de la forme anhydre [4,5]. La solution de MRC a été préparée en dissolvant l'ATX-a purifiée dans une solution dégazée méthanol/eau (9/91, v/v) avec 0,01 % d'acide acétique. La solution a été mélangée à fond au moyen d'un barreau magnétique recouvert de téflon et d'un agitateur magnétique, sous argon. Des aliquotes ont été placées dans des ampoules en verre ambré pré-remplies d'argon, qui ont ensuite été immédiatement scellées à la flamme. Chaque ampoule contient environ 0,5 mL de solution.

Confirmation de la structure et évaluation de la pureté

La pureté de la toxine a été vérifiée au moyen des techniques suivantes : spectroscopie RMN 500 MHz de ^1H , CL-SM [6], CL-UV, électrophorèse capillaire avec détection UV (EC-UV) [7] et chromatographie en phase liquide avec détection de l'azote par chimiluminescence (CL-DNCL) [8]. La structure moléculaire de l'ATX-a a été confirmée par spectroscopie RMN [9] et par spectrométrie de masse à quadripôle temps de vol (QTOF). Le spectre RMN de ^1H de l'ATX-a est donné à la figure 1. Une masse précise de 166,12269 Da a été obtenue pour l'ion $[\text{M}+\text{H}]^+$. Elle se situe à 0,05 mDa près de la masse monoisotopique théorique de 166,12264 Da ($\Delta = 0,30$ ppm). Un spectre de masse (en tandem) de l'ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ a aussi été obtenu, il est donné à la figure 2. La RMN, la CL-SM, la CL-UV et la CL-DNCL ont été utilisées pour estimer la pureté de l'ATX-a. Aucune impureté majeure n'a été détectée.

Homogénéité

Ce MRC étant une vraie solution, il ne devrait pas y avoir de variation significative d'une ampoule à l'autre. Néanmoins, environ 0,8 % de toutes les ampoules produites ont été choisies de manière aléatoire afin d'en mesurer la concentration d'ATX-a par CL-UV. La variation d'une ampoule à l'autre s'est avérée inférieure à la variation obtenue pour des analyses multiples de la solution d'une même ampoule, montrant ainsi une homogénéité acceptable pour l'ensemble de la production.

Étude de stabilité

Des études exhaustives ont été réalisées afin de déterminer la stabilité du CRM-ATX sous diverses conditions. L'ATX-a est instable en solution basique et est sensible à la lumière [10]. Des études de faisabilité sur des préparations précédentes d'ATX-a ont permis de mettre en évidence une excellente stabilité à long terme de solutions d'ATX-a dans un mélange acidifié de méthanol et d'eau à +4 °C. Une étude sur la stabilité à long terme a été réalisée en stockant du CRM-ATX à diverses températures (-80, -20, +4, +25 et +37 °C). L'ATX-a n'a exhibé aucune trace détectable de décomposition quand elle a été stockée à -20 °C, et sa décomposition était inférieure à 3 % à +4 °C après une année. À 37 °C, la dégradation observée était inférieure à 2 % après dix jours.



Valeur certifiée

La valeur certifiée de $30,0 \pm 1,1 \mu\text{mol/L}$ (tableau 1) pour le CRM-ATX est basée sur des résultats obtenus au CNRC en suivant deux méthodes d'analyse indépendantes : la CL-DNCL et la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire quantitative (RMNQ) [11]. L'étalonnage de ceux deux méthodes a été réalisé au moyen de solutions précises de caféine de qualité USP.

Les résultats indiqués sur le certificat sont traçables selon la norme du SI à l'aide d'étalons de caféine de pureté déterminée préparés par gravimétrie. Ce produit est un matériau de référence approprié pour les programmes d'assurance de la qualité des laboratoires.

Incertitude

L'estimation de l'incertitude globale (U_{CRM}) pour le CRM-ATX comprend les incertitudes associées à la caractérisation du lot (u_{char}), à la variation d'un flacon à l'autre (u_{hom}) et à l'instabilité à long terme (u_{stab}) [12-13]. Ces éléments peuvent être combinés sous la forme :

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

dans laquelle k est le facteur de couverture (généralement 2).

Les mesures quantitatives par DNCL et RMNQ ont contribué aux incertitudes les plus significatives. Quand elles sont combinées, elles conduisent à une incertitude relative pour la caractérisation du lot (u_{char}) de 0,018. Étant donné que le présent MRC est une solution vraie, (u_{hom}) n'était pas significatif puisque les solutions sont intrinsèquement homogènes [14]. Néanmoins, des tests d'homogénéité ont été réalisés (voir la section Homogénéité), et la variation d'un flacon à un autre a été déterminée comme inférieure à la variation de la mesure pour donner une valeur relative de 0,002 pour (u_{hom}). Aucune contribution d'une incertitude sur l'homogénéité n'a donc été incluse dans le calcul de l'incertitude combinée pour le CRM-ATX. Une étude sur la stabilité à long terme du présent MRC a été réalisée (voir la section Étude de stabilité). Aucune perte de matière n'a pu être observée quand il est stocké dans les conditions recommandées. L'incertitude due à la stabilité (u_{stab}) [15] a été extrapolée afin de refléter une durée de vie d'un an, mais s'est avérée également non significative avec une valeur relative de 0,001. En appliquant un facteur de couverture de 2, on a calculé une incertitude élargie relative finale pour la valeur certifiée de 0,036.

Instructions pour le stockage

Afin d'assurer la stabilité de l'ATX-a, le MRC devrait être stocké au noir dans un congélateur (environ -20°C). Le MRC s'est avéré stable dans ces conditions. Le MRC a été préparé dans des conditions qui réduisent au minimum le risque de contamination bactérienne, mais une fois l'ampoule ouverte le risque de contamination existe. Il est donc recommandé que des aliquotes et des dilutions du MRC soient stockées dans un bon congélateur afin de réduire au minimum le risque de dégradation bactérienne.

Expiration

Quand il est stocké non ouvert dans les conditions recommandées (section Instructions pour le stockage), la concentration certifiée du MRC est valide pendant 1 an après la date de vente.



Instructions pour l'utilisation

Avant d'ouvrir une ampoule, il faudrait la laisser revenir à la température ambiante, puis le contenu devrait être mélangé à fond. L'ampoule devrait être renversée plusieurs fois, puis maintenue en position verticale. Il faudrait alors légèrement la taper pour s'assurer que la solution se retrouve en bas, puis l'ouvrir au niveau du marquage. Une fois l'ampoule ouverte, des aliquotes précises devraient être prélevées avec du matériel volumétrique, puis transférées dans des fioles ou des flacons jaugés. Une augmentation de la concentration due à l'évaporation du solvant aura lieu si l'ampoule est laissée ouverte pendant plus que quelques minutes. Il est recommandé de ne pas laisser le MRC s'assécher complètement en raison d'une perte potentielle sur les parois en verre. Une procédure fiable permettant de faire des dilutions précises consiste à utiliser une balance afin de déterminer le poids de l'aliquote prélevée et celui de la solution finale, en assumant que de l'eau est utilisée comme diluant (la masse volumique de la solution de MRC est de 0,9851 g/mL à +24 °C). *Note* : le volume de la solution n'est pas certifié, seule sa concentration l'est.

Précautions à prendre

En cas d'ingestion de quantités suffisantes, l'ATX-a peut provoquer une paralysie ou même la mort. Seules les personnes qualifiées devraient manipuler la solution, et des mesures appropriées d'élimination devraient être prises. Il faudrait porter des gants et une protection pour les yeux quand on ouvre l'ampoule, en cas de brisure du verre. Une fiche signalétique (FS) est disponible pour le CRM-ATX.

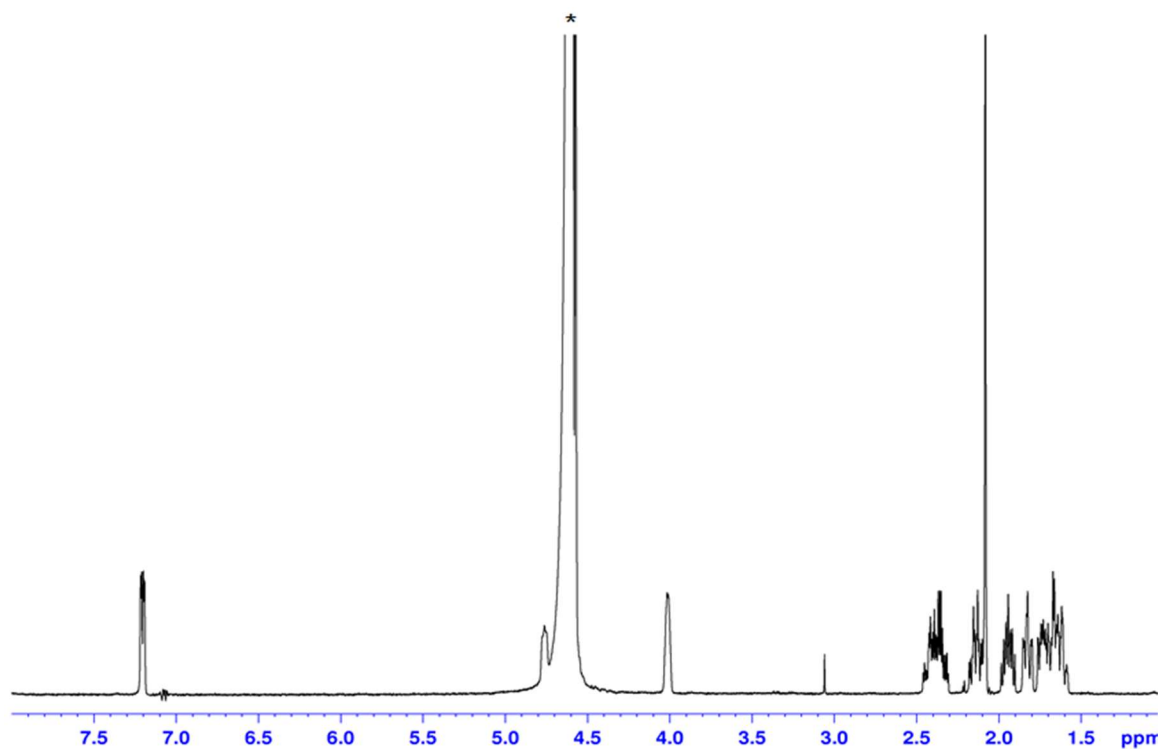


Figure 1 : Spectre RMN des protons de l'ATX-a. La résonance marquée d'un * est due à l'eau.

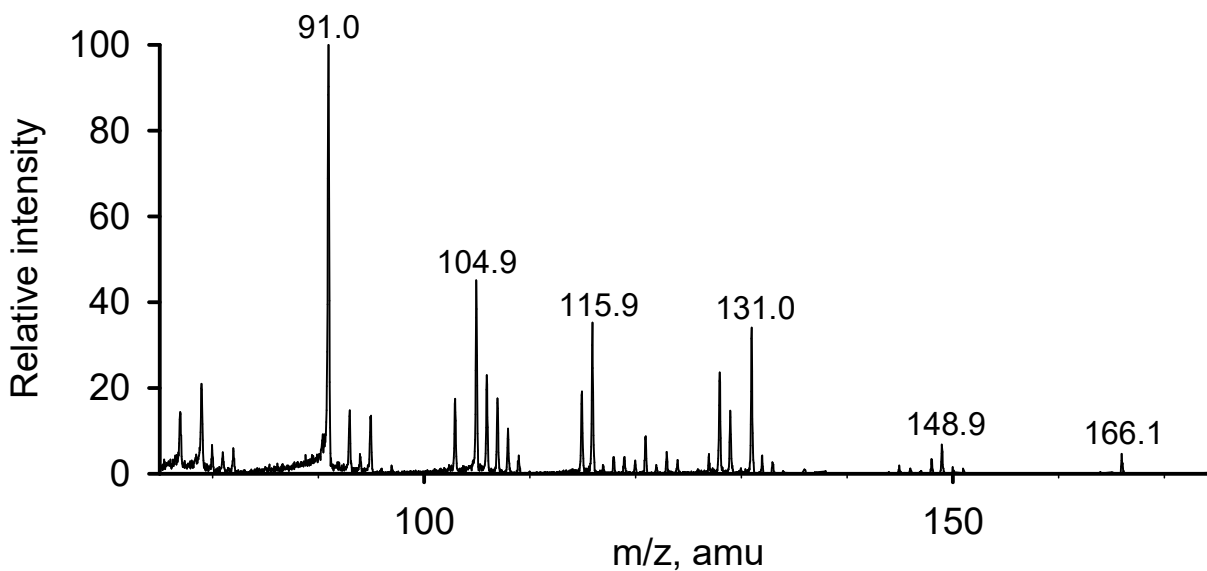


Figure 2 : Spectre des ions produits de l'ion $[M+H]^+$ (m/z 166) de l'ATX-a obtenu lors d'une analyse par CL-SM/SM du CRM-ATX. Conditions : AB Sciex API4000 QTRAP; énergie de collision = 40 V; potentialité de défragmentation = 50 V.

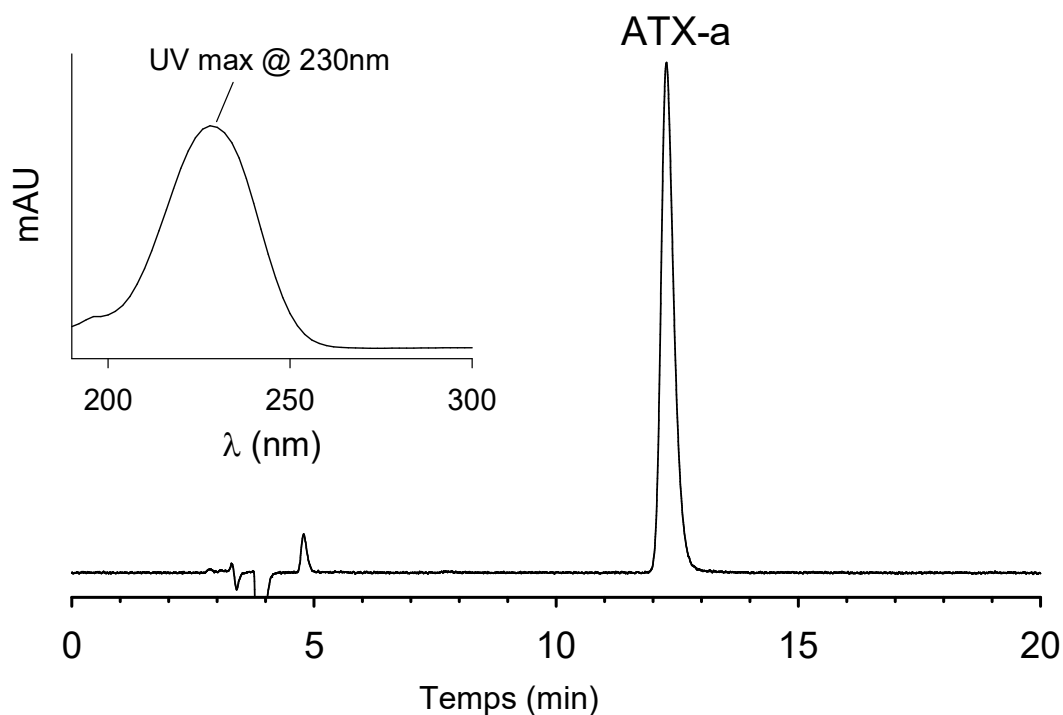


Figure 3 : Analyse du CRM-ATX par CL-UV (230 nm). Conditions : CL Agilent 1100 avec détecteur UV Hewlett Packard 1050 avec cellule à flux standard; colonne 250 mm $\times$ 2,1 mm d.i. avec 3 μ m Phenomenex Columbus C18 à +30 °C; 0,2 mL/min $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{COOH}$ (10/89,9/0,1); injection de 10 μ L. Le graphique superposé montre un spectre UV acquis séparément avec un détecteur à réseau de diodes.

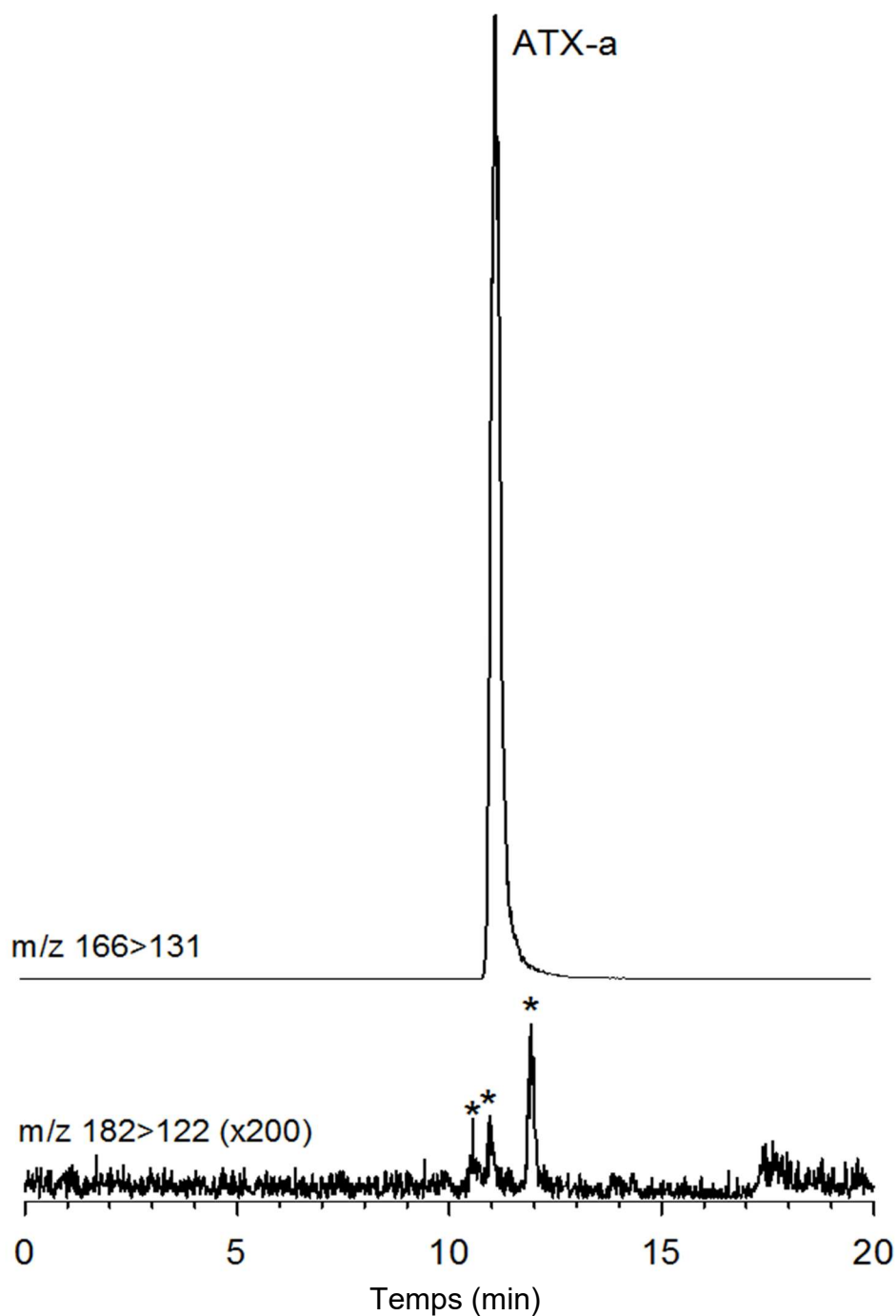


Figure 4 : Analyse du CRM-ATX par CL/SM avec la mesure de réactions sélectionnées. Des impuretés (*) avec un ion $[M+H]^+$ à m/z 182 ont été détectées uniquement à de très faibles niveaux. Conditions : CL Agilent 1200 et SM AB Sciex API4000 QTRAP; colonne 150 mm $\times$ 2 mm d.i., 3 μ m Toso-Haas Amide-80 à +40 °C; gradient d'élution 90 à 70 % de B en 25 min, avec A = H₂O avec 50 mM NH₄COOH et 2 mM HCOOH, B = CH₃CN. Débit = 0,2 mL/min.

Références

1. Devlin J.P., Edwards O.E., Gorham P.R., Hunter N.R., Pike R.K. et Stavric B.; Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44h; *Can. J. Chem.* 55, p. 1367-1371 (1977).
2. Osswald J., Rellán S., Gago A. et Vasconcelos V.; Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a; *Environ. Int.* 33, p. 1070-1089 (2007).
3. Selwood A.I., Holland P.T., Wood S.A., Smith K.F. et McNabb P.S.; Production of anatoxin-a and a novel biosynthetic precursor by the cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi*; *Environ. Sci. Technol.* 41, p. 506-510 (2007).
4. Namikoshia M., Murakamia T., Watanabe M.F., Odac T., Yamadac J., Tsujimurad S., Nagaia H. et Oishie S.; Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a, and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja; *Toxicon* 42, p. 533-538 (2003).
5. Harada K., Kimura Y., Ogawa K., Suzuki M., Dahlem A.M., Beasley V.R. et Carmichael W.M.; A new procedure for the analysis and purification of naturally occurring anatoxin-a from the blue-green alga *Anabaena Flos-Aqua*; *Toxicon* 27, p. 1289-1296 (1989).
6. Dell'Aversano C., Eaglesham G.K. et Quilliam M.A.; Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry; *J. Chrom. A* 1028, p. 155-164 (2004).
7. Vasas G., Gaspar A., Pager C., Suranyi G., Mathe C., Hamvas M.M. et Borbely G.; Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis; *Electrophoresis* 25, p. 108-115 (2004).
8. Quilliam M.A. et Fraser H.; manuscrit en préparation.
9. Koskinen A.M.P. et Rapoport H.; Synthetic and Confirmational Studies on Anatoxin-a: A potent Acetylcholine Agonist; *J. Med. Chem.* 28, p. 1301-1309 (1985).
10. Stevens D.K. et Krieger R.I.; Stability studies on the cyanobacterial nicotinic alkaloid anatoxin-a; *Toxicon* 29(2), p. 167-179 (1991).
11. Burton I.W., Quilliam M.A. et Walter J.A.; Quantitative ¹H NMR with external standards: Use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products; *Anal. Chem.* 77, p. 3123- 3131 (2005).
12. Pauwels J., Lamberty A. et Schimmel H.; Evaluation of uncertainty of reference materials; *Accred. Qual. Assur.* 5, p. 95-99 (2000).
13. Pauwels J., Lamberty A. et Schimmel H.; The determination of the uncertainty of reference materials certified by laboratory intercomparison; *Accred. Qual. Assur.* 3, p. 180-184 (1998).
14. Ellison S.L.R., Burke S., Walker R.F., Heydorn K., Mansson M., Pauwels J., Wegscheider W. et te Nijenhuis B.; Uncertainty for reference materials certified by interlaboratory study: Recommendations of an international study group; *Accred. Qual. Assur.* 6, p. 274-277 (2001).
15. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, ISBN 92-67-10188-9, 1^{ère} édition ISO, Genève, Suisse (1993).

Remerciements

Les membres suivants du personnel de Science des mesures et étalons du CNRC ont participé à la production et à la certification du CRM-ATX : E. Bond, S. Crain, K. Bekri, I. Burton, Y.M. Chen, J. Frazer, Y. Gao, W. Hardstaff, D. Marciniak, P. McCarron, K. Reeves, S. Regier, K. Thomas, M. Quilliam et J. Walter. Les membres suivants du Cawthron Institute en Nouvelle-Zélande ont participé à la production, à l'isolement et à la caractérisation de l'ATX-a utilisée pour le CRM-ATX : P. Holland, A. Selwood, P. Terazaki et S. Wood. Nous sommes également reconnaissants au gouvernement de Taiwan pour la bourse d'études attribuée à Yi-Min Chen.

Le présent document devrait être cité sous la forme suivante :

K. Thomas, A. Selwood, S. Wood, Y.M. Chen, S. Crain, J.A. Walter and M.A. Quilliam. "CRM-ATX, a certified calibration solution reference material for anatoxin-a", Biotoxin Metrology Technical Report CRM-ATX-20100721, National Research Council Canada, Halifax, February 2011 (NRCC No.: 51829). DOI <https://doi.org/10.4224/crm.2011.atx.20100721>

Première certification complétée en : mars 2011

Version du présent document : 20220315

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

Signé : 

Michael A. Quilliam, Ph.D.
Chef de groupe, 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

