



Certificat d'analyse

Matériau de référence certifié

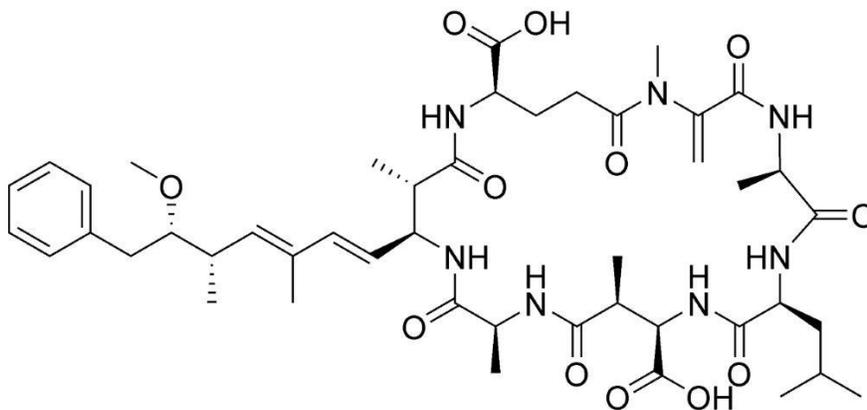
CRM-MCLA (Lot numéro 20210128)

Solution d'étalonnage certifiée de la microcystine-LA

La microcystine-LA (MC-LA) est une toxine peptidique cyclique produite par des cyanobactéries d'eau douce [1]. Elle a été associée à des empoisonnements d'animaux domestiques et sauvages et présente une menace pour la santé humaine en cas de contamination de l'approvisionnement en eau potable [2]. Le CRM-MCLA est une solution d'étalonnage certifiée de MC-LA dans du méthanol aqueux (1/1, v/v), conçue pour l'identification et le dosage de la MC-LA.

Tableau 1 : Concentration certifiée et incertitude du CRM-MCLA.

Composé	µg/g	µg/mL (15-30 °C)	µmol/L (15-30 °C)
Microcystine-LA	5,07 ± 0,20	4,69 ± 0,19	5,15 ± 0,21



Microcystine-LA

Numéro de registre du CAS : 96180-79-9

InChIKey: DIAQQISRBBDJIM-DRSCAGMXSA-N

Formule moléculaire : C₄₆H₆₇N₇O₁₂

Masse moléculaire : 910,06 g/mol

Période de validité : 1 an après la date de vente

Conditions de stockage : -12 °C ou moins

Utilisation prévue

Le CRM-MCLA est une solution d'étalonnage certifiée conçue pour le développement de méthodes d'analyse et le dosage précis de la MC-LA. La concentration convient à la préparation d'une série de dilutions pour l'étalonnage d'appareils tels qu'un système de chromatographie en phase liquide avec détection de l'absorbance ultraviolette (CL-UV) ou par spectrométrie de masse (CL-SM), ainsi qu'au dopage d'échantillons de contrôle à des fins de calcul de taux de récupération.

Instructions pour le stockage et l'utilisation

Afin d'assurer la stabilité du CRM-MCLA, les ampoules devraient être conservées à $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou moins.

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. Un dispositif volumétrique étalonné devrait être utilisé pour faire des transferts précis. 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 de quelques minutes. Il est recommandé de ne pas évaporer le MRC complètement en raison de pertes potentielles. *Remarque* : le volume de la solution n'est pas certifié. Seule sa concentration l'est. Tout le contenu de l'ampoule ne devrait pas être simplement transféré dans une fiole jaugée, qui serait complétée au volume.

Préparation du CRM-MCLA

La MC-LA a été obtenue auprès de Beagle Bioproducts Inc. (Columbus, OH, États-Unis), puis purifiée à l'interne par chromatographie en phase liquide semi-préparative. La structure et la pureté de la MC-LA ont été confirmées par CL-SM (figures 1 et 2), CL-UV (figure 3) et par spectroscopie RMN 1D et 2D. Un m/z de 910,4910 mesuré précis ($\Delta = 1,2$ ppm pour $\text{C}_{46}\text{H}_{68}\text{N}_7\text{O}_{12}^+$) a été déterminé pour l'ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ de la MC-LA par CL-SM haute résolution (CL-SMHR). La pureté a aussi été évaluée par CL avec détection de l'azote par chimiluminescence [3] et détection d'un aérosol chargé.

La solution mère a été préparée en dissolvant la MC-LA purifiée dans du CD_3OH pour dosage par RMN de ^1H (RMNq) [4]. La solution de CRM-MCLA a été préparée en diluant avec précision la solution mère dans un mélange dégazé de $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (1/1, v/v). Des aliquotes ont été mises dans des ampoules en verre ambré préalablement remplies d'argon, puis immédiatement scellées à la flamme. Chaque ampoule contient environ 0,5 mL de solution.

Méthodes d'analyse et attribution de valeur

La valeur certifiée du CRM-MCLA (tableau 1) est basée sur les résultats obtenus au CNRC par RMNq, en utilisant la caféine comme étalon, et par CL-UV, en utilisant le CRM-MCLR comme étalon.

Un faible niveau d'ester méthylique de la MC-LA ($[\text{Glu}(\text{OMe})^{\circ}] \text{MC-LA}$, masse exacte de $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 924,5067; 0,02 $\mu\text{mol/L}$) est présent dans le CRM-MCLA. La concentration a été estimée par CL-SM en utilisant le suivi d'ions sélectionnés avec une dilution précise du CRM-MCLA comme étalon. Les analyses ont aussi mis en évidence de petites quantités d'autres impuretés

liées à la MC-LA partiellement identifiées (masses exactes $[M+H]^+$ m/z 840,4899 et 926,4889) qui, ensemble, représentent moins de 0,5 % de la concentration de MC-LA.

Homogénéité

Nous avons prélevé un nombre représentatif d'ampoules parmi la série d'ampoules produites et en avons déterminé la concentration de MC-LA par CL-SM/SM. Aucune hétérogénéité n'a pu être mise en évidence.

Stabilité

Les études sur la stabilité ont mis en évidence une bonne stabilité du CRM-MCLA quand il est conservé dans des ampoules scellées à -12 °C ou moins.

Incertitude

Toutes les sources d'erreur raisonnables liées à la caractérisation du CRM-MCLA 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}) [5-6]. Ces éléments sont donnés dans le tableau 2 et peuvent être combinés de la manière suivante :

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

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

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

Incertitudes	Relative*
u_{char}	0,017
u_{hom}	négligeable
u_{stab}	0,010

*Relative à la concentration indiquée dans le Tableau 1.

Consignes de sécurité

En cas d'ingestion de quantités suffisantes, la MC-LA et les microcystines apparentées sont connues pour être hépatotoxiques et peuvent aussi être génotoxiques [7]. Seules les personnes qualifiées devraient manipuler la solution, et des méthodes appropriées d'élimination devraient être employées. Il faudrait porter un équipement de protection personnelle approprié lors de l'ouverture d'une ampoule, en cas de bris du verre. Une fiche de données de sécurité (FDS) est disponible pour le CRM-MCLA.

Période de validité

Quand l'ampoule non ouverte est conservée à la température recommandée de -12 °C , la concentration certifiée de la solution de CRM-MCLA 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'un étalon de matériau de référence certifié de caféine NMIA (M724c) préparé par gravimétrie et de CRM-MCLR (lot numéro 20070131) 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. Carmichael W.W.; 1994; The toxins of cyanobacteria; *Sci. Am.*, 270, p. 78–86; DOI:10.1038/scientificamerican0194-78
2. Pick F.R.; 2016; Blooming algae: a Canadian perspective on the rise of toxic cyanobacteria; *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 73, p. 1149; DOI:10.1139/cjfas-2015-0470
3. Thomas K., Wechsler D., Chen Y.M., Crain S. et Quilliam M.A.; 2016; Analysis of natural toxins by liquid chromatography–chemiluminescence nitrogen detection and application to the preparation of certified reference materials; *J. AOAC Int.*, 99, p. 1173–1184; DOI: 10.5740/jaoacint.16-0146
4. Burton I.W., Quilliam M.A. et Walter J.A.; 2005; 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; DOI: 10.1021/ac048385h
5. Pauwels J., Lamberty A. et Schimmel H.; 2000; Evaluation of uncertainty of reference materials; *Accred. Qual. Assur.*, 5, p. 95–99; DOI:10.1007/s007690100341
6. 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, <https://www.bipm.org>.
7. Arman T. et Clarke J.D.; 2021; Microcystin toxicokinetics, molecular toxicology, and pathophysiology in preclinical rodent model and humans; *Toxins*, 13, p. 537–557.

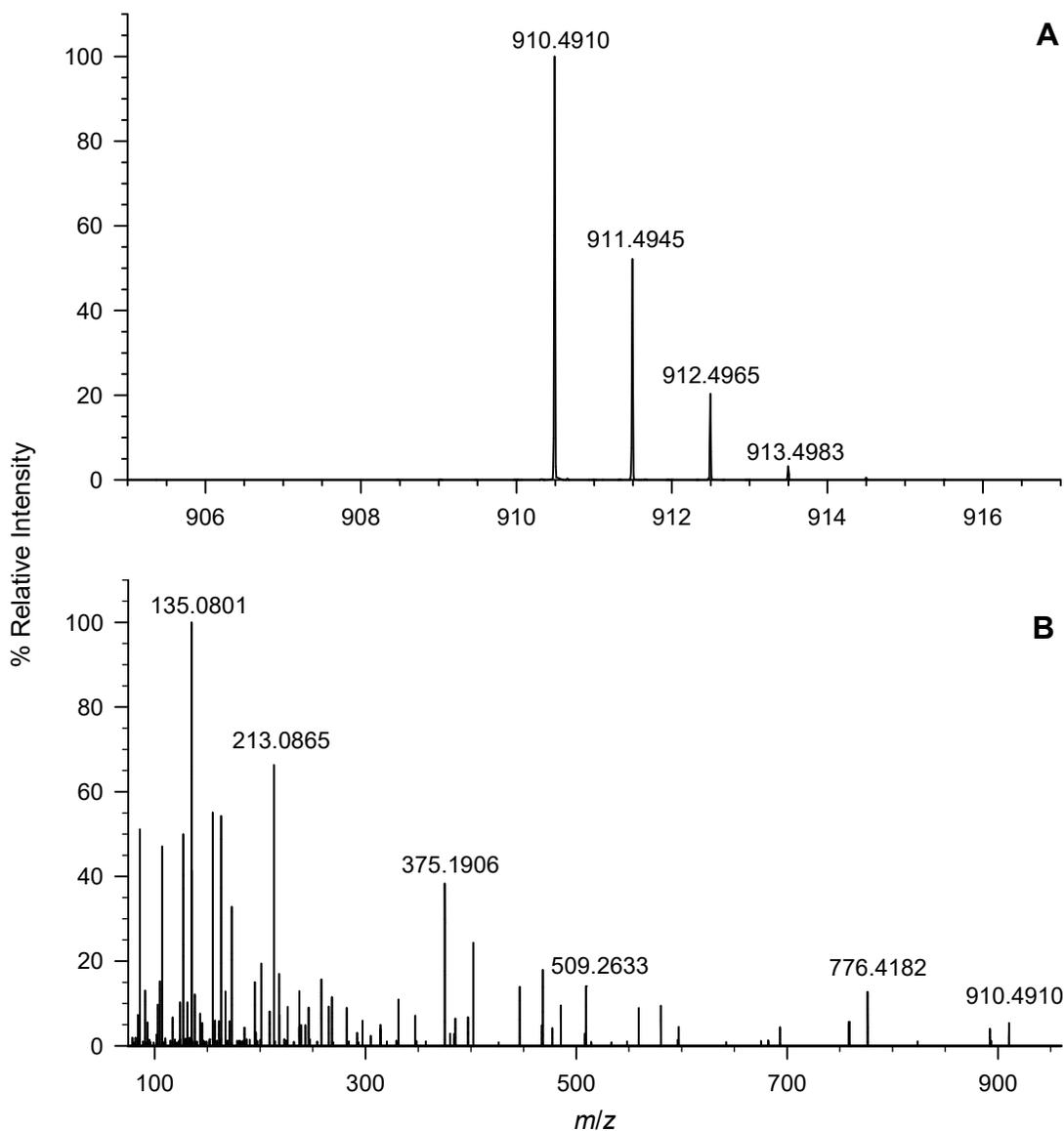


Figure 1 : Spectres de CL-SMHR, en mode balayage complet (A) et en mode dissociation induite par collision (B) (SM/SM), de la MC-LA utilisée pour la préparation du CRM-MCLA, obtenus avec un spectromètre de masse Q Exactive-HF muni d'une sonde d'ionisation à électropulvérisation chauffée. Les données ont été collectées en mode positif avec une tension de pulvérisation de 2500 V, une température de capillaire de +275 °C et une température du dispositif de chauffage de +375 °C. Les données en balayage complet ont été acquises avec un réglage de la résolution de 120 000. Les données de SM/SM ont été acquises en mode suivi de réactions en parallèle avec la même résolution et une énergie de collision normalisée de 30 V.

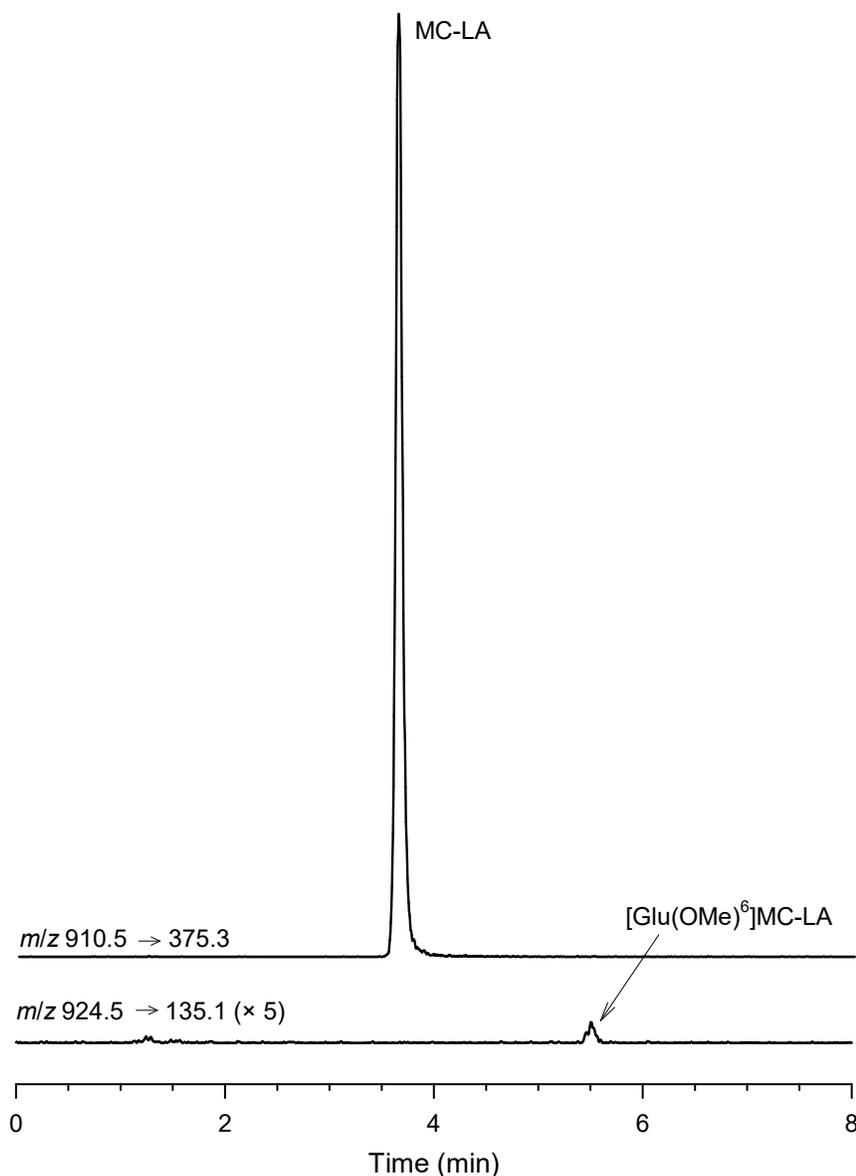


Figure 2 : Analyse par CL-SM/SM du CRM-MCLA avec un CL Agilent1290 connecté à un SM Sciex 5500 QTRAP, en mode suivi de réactions sélectionnées, avec ionisation par électropulvérisation. Conditions chromatographiques : colonne Poroshell 120 SB C18 (150 mm × 2,1 mm, 2,7 µm) à +40 °C; phase mobile, formate d'ammonium 2 mM et acide formique 50 mM dans de l'eau désionisée (A) et acétonitrile 95 % (B); élution isocratique avec 50 % B, à 0,25 mL/min; volume injecté, 6 µL. Conditions pour la SM : énergie de collision +80 V; potentiel de désagrégation +100 V, température de la source +575 °C.

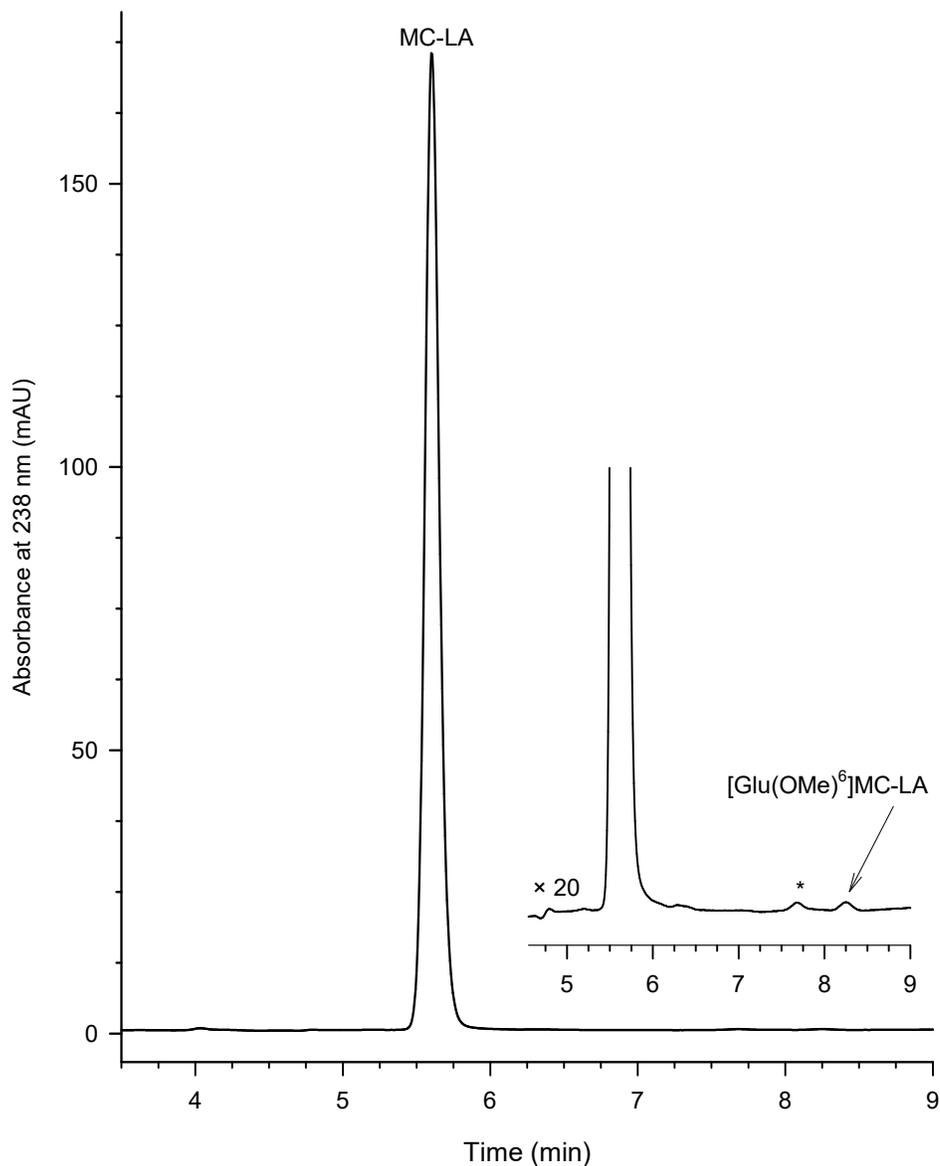


Figure 3 : Analyse par CL-UV du CRM-MCLA. Conditions : colonne CLUP Acquity, HSS T3 (100 mm × 2,1 mm, 1,8 µm) à +40 °C; phase mobile, 0,1 % d'acide trifluoroacétique dans de l'eau désionisée (A) et acétonitrile 0,1 % (B); élution isocratique avec 45 % B, à 0,4 mL/min; volume injecté, 7 µL; détection UV à 238 nm. Un faible niveau de [Glu(OMe)⁶]MC-LA est présent dans le MRC. L'astérisque (*) indique une trace d'impureté.

Remerciements

Les membres suivants du personnel du CNRC ont contribué à la production et à la certification du CRM-MCLA: Beach D.G., Crain S., Giddings S.D., LeBlanc P., McCarron P., Miles C.O., Mudge E.M., Perez Calderon R.A., Rafuse C., Rajotte I., Reeves K.L., Thomas K. et Wright E.J.

Le présent document devrait être cité de la manière suivante :

Thomas K., Perez Calderon R.A., Giddings S.D., Rajotte I., Miles C.O. et McCarron P.; « CRM-MCLA, une solution d'étalonnage certifiée pour la MC-LA »; Certificat d'analyse de Métrologie des biotoxines CRM-MCLA-20210128, Conseil national de recherches du Canada, Halifax.

DOI <https://doi.org/10.4224/crm.2022.mcla.20210128>

Date de délivrance : juillet 2022

Version du document : 20220715

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