



Certificat d'analyse

Matériau de référence

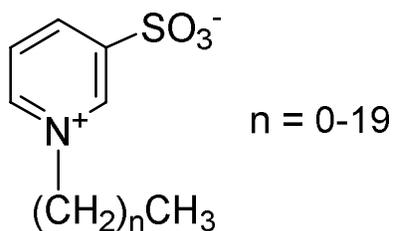
RM-RILC (Lot n° 20140827)

Matériau de référence pour la mesure d'indices de rétention en chromatographie en phase liquide

Le RM-RILC est un matériau de référence conçu pour la mesure d'indices de rétention (IR) en chromatographie en phase liquide, basé sur des *N*-alkylpyridinium-3-sulfonates (NAPS) [1]. Le RM-RILC est une solution de 20 NAPS homologues dans du méthanol avec ~ 1 % d'eau, avec des IR définis comme $100 \times (n + 1)$. Les IR vont de 100 à 2000.

Tableau 1 : Concentrations des *N*-alkylpyridinium-3-sulfonates (NAPS) dans le RM-RILC.

Composé	$\mu\text{mol/L}$ (15-30 °C)
NAPS $n = 0-2$	45 ± 5
NAPS $n = 3-19$	100 ± 10



Standards de *N*-alkylpyridinium-3-sulfonate (NAPS)

Période de validité : 3 ans à partir de la date de vente

Conditions de stockage : ~ +4 °C

Utilisation prévue

Les méthodes d'analyse basées sur la séparation par chromatographie en phase liquide (CPL) et la détection par absorption ultraviolette (UV) ou spectrométrie de masse (SM) sont utilisées pour l'analyse d'une large gamme de substances. L'identification des composés présents dans un échantillon comprend fréquemment une comparaison des temps de rétention chromatographiques de l'étalon chimique avec ceux des composés présumés observés dans un échantillon. Toutefois, les temps de rétention absolus des analytes peuvent être très variables d'un laboratoire à un autre ou d'un appareil à un autre. L'analyse d'étalons avec chaque série d'échantillons fait croître la charge de travail et les coûts. Dans de nombreux cas, des étalons ne sont pas disponibles dans le commerce pour tous les composés d'intérêt. Une manière utile pour évaluer et rapporter les données sur les temps de rétention est l'utilisation d'« indices de rétention (IR) » [2]. Pour cette procédure, une série de composés de référence homologues est injectée conjointement avec l'échantillon. Une interpolation des temps de rétention de l'analyte dans une courbe des temps de rétention des composés de référence en fonction de leur IR permet d'obtenir un IR pour chaque analyte. Plusieurs systèmes d'IR différents ont été rapportés pour une utilisation en CPL-UV [3], mais les étalons chimiques utilisés pour ces systèmes ont un certain nombre de limites, comme une mauvaise réponse en CPL-SM, une couverture incomplète de la gamme des temps de rétention ou leur indisponibilité commerciale.

Le RM-RILC est conçu pour la mesure des IR de divers composés avec des systèmes de CPL à phase inversée et avec élution à gradient et détection UV ou par SM. Ceci est obtenu en mesurant les temps de rétention des analytes d'échantillons relativement à ceux d'étalons de type NAPS. Le RM-RILC est aussi utile pour prédire le temps de rétention d'analytes en se basant sur des IR précédemment documentés et pour tester la pertinence de la performance d'appareils d'analyse.

Instructions pour le stockage et l'utilisation

Pour s'assurer de la stabilité du RM-RILC, les ampoules devraient être conservées dans le noir à +4 °C. Il a été observé que certains des NAPS ayant les chaînes les plus longues peuvent précipiter ou s'adsorber sur les parois en verre s'ils sont conservés dans un congélateur.

Avant d'ouvrir une ampoule, il faut la laisser s'équilibrer à la température ambiante pendant au moins 2 h et son contenu doit être bien mélangé. L'ampoule devrait être ouverte au niveau de la marque. Une fois l'ampoule ouverte, son contenu doit être transféré dans un flacon à vis pour utilisation ultérieure et conservation.

Une aliquote du RM-RILC peut être mélangée ou co-injectée avec des échantillons. Sinon, elle peut être analysée séparément chaque jour si la reproductibilité des temps de rétention de l'appareil est bonne. La concentration de RM-RILC à utiliser ou le volume à injecter dépend du diamètre interne de la colonne de CPL et de la sensibilité de l'appareil. Typiquement, pour une méthode avec une colonne de 2 mm de diamètre interne et un système de CPL-SM modérément sensible, de 0,1 à 0,5 µL doivent être injectés pour obtenir un bon signal. Veuillez noter que des injections importantes de RM-RILC peuvent entraîner un élargissement des pics des NAPS élués les premiers en raison de la forte teneur en méthanol du matériau de référence. Pour la co-injection avec un échantillon, un rapport volumique matériau de référence:échantillon de 1:5 à 1:25 devrait convenir.

Les étalons de NAPS [1] présents dans le RM-RILC ont été conçus avec deux fonctions ionisées en permanence (amine quaternaire et sulfonate), qui améliorent la détectabilité en CPL-SM en mode ion positif et en mode ion négatif. Les étalons de NAPS sont aussi de bons chromophores UV avec une absorption maximale à 265 nm. En SM en mode ionisation par électropulvérisation positif, les molécules de NAPS sont protonées pour former des ions $[M+H]^+$ (figure 1a). En mode ionisation négatif, un ion formate $[M+HCOO]^-$ est produit (figure 1c). La dissociation induite par collision donne des ions communs à des m/z de 160 et 79 en mode positif et un m/z de 80 en mode négatif (figures 1b

et 1d). Ceux-ci peuvent être créés en utilisant soit une tension de cône élevée soit la SM/SM dans une cellule de collision. Les mécanismes de fragmentation proposés sont représentés à la figure 2. L'analyse peut être faite par suivi d'ions sélectionnés ou par suivi de réactions sélectionnées en utilisant respectivement des masses ioniques individuelles ou des transitions de masse (tableau 2). Autrement, une tension de cône élevée plus une transition m/z 160 \rightarrow 160 à faible énergie de collision peuvent être utilisées. Des méthodes de SM en balayage complet, avec ou sans balayage des fragments en alternance, peuvent aussi être utilisées.

Les étalons de NAPS ont un excellent comportement chromatographique en CPL à phase inversée avec élution avec gradient, couvrant une élution allant d'une phase 100 % aqueuse à une phase 100 % organique, permettant ainsi la mesure des IR de composés très polaires ou de composés lipophiles. La figure 3 représente l'analyse du RM-RILC par CPL-UV et CPL-SM. Les étalons de NAPS ont un état de charge globale neutre qui ne variera pas de manière significative lors de modifications du pH de la phase mobile. Leurs temps de rétention ne sont donc pas sensibles aux modifications de pH de la phase mobile.

Un graphique des temps de rétention en fonction des IR (100 x la longueur de la chaîne carbonée) et une interpolation linéaire entre les points ou de fonction spline cubique permettent d'obtenir une courbe d'étalonnage telle que celle représentée à la figure 4. La forme et la pente de cette courbe varieront en fonction de la pompe du CPL, de la longueur de la colonne, du débit de phase mobile et des conditions de gradient.

Préparation du RM-RILC

Les étalons de NAPS ont été préparés en faisant réagir une série de halogénures de n-alkyle avec de l'acide 3-pyridinesulfonique, suivi d'une purification par chromatographie sur colonne C18 en silice ou par extraction en phase solide selon la polarité du NAPS. Les structures des composés synthétisés ont été confirmées par CPL-SMHR (spectrométrie de masse haute résolution). Chaque NAPS a donné un $[M+H]^+$ adéquat et précis et des masses d'ions fragments à 2 ppm près de celles calculées. Les structures d'un sous-ensemble de NAPS ont été vérifiées par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton.

La solution de RM-RILC a été préparée en mélangeant les solutions mères individuelles des 20 étalons de NAPS et en diluant avec du méthanol dégazé et filtré (0,2 μ m) contenant environ 1 % d'eau. La solution finale du matériau de référence a été mise dans des ampoules en verre préalablement remplies d'argon, puis immédiatement scellées à la flamme. Chaque ampoule contient environ 0,75 mL de solution.

Méthodes d'analyse et valeurs assignées

Des valeurs de concentration à titre d'information ont été assignées au RM-RILC grâce à une combinaison de données obtenues par RMN quantitative [4] sur un sous-ensemble de NAPS et par CPL-UV-DAC sur le matériau de référence final.

Homogénéité

Un nombre représentatif d'ampoules de RM-RILC ($n = 17$) a été sélectionné parmi toutes les ampoules, et la réponse des NAPS a été mesurée par CPL-UV. Les résultats ont été évalués en utilisant ANOVA, aucune hétérogénéité significative n'a été détectée.

Stabilité

Les études sur la stabilité ont montré une bonne stabilité à long terme des solutions de RM-RILC conservées dans des ampoules scellées à +4, +20 et +40 °C, sans décomposition détectable observée pendant un an, dans les limites d'incertitude de la méthode d'analyse (CPL-UV).

Consignes de sécurité

La solution de NAPS (RM-RILC) devrait être manipulée avec précaution en utilisant un équipement de protection personnelle approprié. L'inhalation ou l'ingestion de méthanol est dangereuse. Seules des personnes qualifiées devraient manipuler la solution et des méthodes d'élimination appropriées devraient être suivies. Des gants épais et une protection pour les yeux devraient être utilisés pour l'ouverture des ampoules en cas de brisure du verre. Une fiche de données de sécurité (FDS) est disponible pour le RM-RILC.

Période de validité

Si les ampoules non ouvertes sont conservées dans les conditions recommandées (~ +4°C et dans le noir), la concentration assignée du RM-RILC est valide pendant 3 ans à partir de la date de vente.

Références

1. Quilliam MA, *Retention index standards for liquid chromatography*. US Patents 9,594,063 B2 (Mar. 14, 2017) and 10,228,356 B2 (Mar. 12, 2019). Quilliam MA, *Retention index standards for liquid chromatography*. Patent: US9,594,063 B2, Mar. 14, 2017.
2. Babushok VI (2015). Chromatographic retention indices in identification of chemical compounds. *TRAC - Trend Anal Chem* 69: 98-104.
3. Smith RM (1995). Retention index scales used in high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr Libr* 57: 93-144.
4. 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.

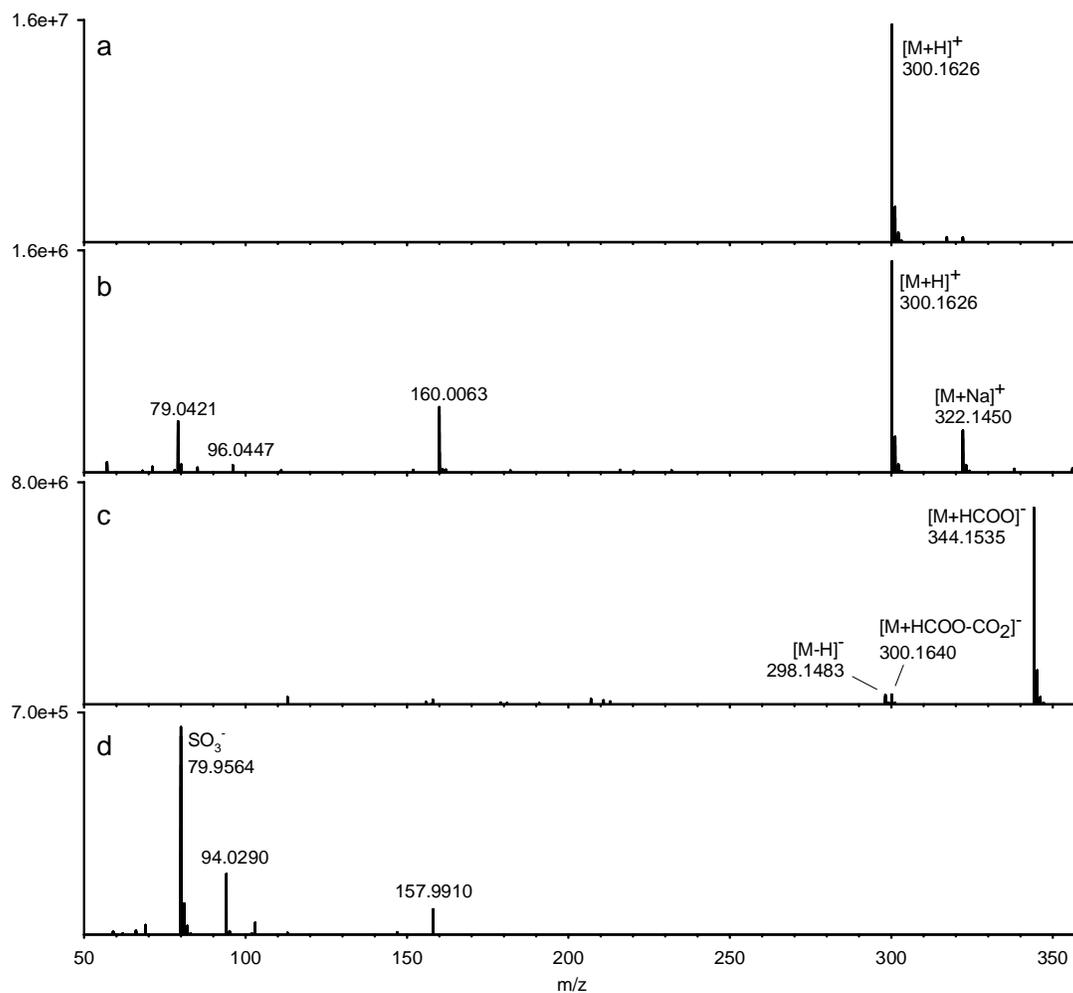


Figure 1 : Spectres de masse en mode positif (a, b) et en mode négatif (c, d) du C10-NAPS acquis avec un SM Exactive Orbitrap sans fragmentation (a, c) ou avec fragmentation avec DCH (b, d).

Tableau 2 : Données de spectrométrie de masse pour les étalons de NAPS.

RI Value	n	Elemental Composition					MW	Positive Ion m/z values				Negative Ion m/z values					
		C	H	N	O	S		[M+Na] ⁺	[M+H] ⁺	PosFrag1	PosFrag2	[M+HCOO] ⁻	[M+H] ⁻	[M-H] ⁻	NegFrag1	NegFrag2	
100	0	6	7	1	3	1	173.19	196.0039	174.0219	92.0495			218.0129	174.0230	172.0074	157.9917	79.9574
200	1	7	9	1	3	1	187.22	210.0195	188.0376	160.0063	79.0170		232.0285	188.0387	186.0230	157.9917	79.9574
300	2	8	11	1	3	1	201.25	224.0352	202.0532	160.0063	79.0170		246.0442	202.0543	200.0387	157.9917	79.9574
400	3	9	13	1	3	1	215.27	238.0508	216.0689	160.0063	79.0170		260.0598	216.0700	214.0543	157.9917	79.9574
500	4	10	15	1	3	1	229.30	252.0665	230.0845	160.0063	79.0170		274.0755	230.0856	228.0700	157.9917	79.9574
600	5	11	17	1	3	1	243.32	266.0821	244.1002	160.0063	79.0170		288.0911	244.1013	242.0856	157.9917	79.9574
700	6	12	19	1	3	1	257.35	280.0978	258.1158	160.0063	79.0170		302.1068	258.1169	256.1013	157.9917	79.9574
800	7	13	21	1	3	1	271.38	294.1134	272.1315	160.0063	79.0170		316.1224	272.1326	270.1169	157.9917	79.9574
900	8	14	23	1	3	1	285.40	308.1291	286.1471	160.0063	79.0170		330.1381	286.1482	284.1326	157.9917	79.9574
1000	9	15	25	1	3	1	299.43	322.1447	300.1628	160.0063	79.0170		344.1537	300.1639	298.1482	157.9917	79.9574
1100	10	16	27	1	3	1	313.46	336.1604	314.1784	160.0063	79.0170		358.1694	314.1795	312.1639	157.9917	79.9574
1200	11	17	29	1	3	1	327.48	350.1760	328.1941	160.0063	79.0170		372.1850	328.1952	326.1795	157.9917	79.9574
1300	12	18	31	1	3	1	341.51	364.1917	342.2097	160.0063	79.0170		386.2007	342.2108	340.1952	157.9917	79.9574
1400	13	19	33	1	3	1	355.54	378.2073	356.2254	160.0063	79.0170		400.2163	356.2265	354.2108	157.9917	79.9574
1500	14	20	35	1	3	1	369.56	392.2230	370.2410	160.0063	79.0170		414.2320	370.2421	368.2265	157.9917	79.9574
1600	15	21	37	1	3	1	383.59	406.2386	384.2567	160.0063	79.0170		428.2476	384.2578	382.2421	157.9917	79.9574
1700	16	22	39	1	3	1	397.62	420.2543	398.2723	160.0063	79.0170		442.2633	398.2734	396.2578	157.9917	79.9574
1800	17	23	41	1	3	1	411.64	434.2699	412.2880	160.0063	79.0170		456.2789	412.2891	410.2734	157.9917	79.9574
1900	18	24	43	1	3	1	425.67	448.2856	426.3036	160.0063	79.0170		470.2946	426.3047	424.2891	157.9917	79.9574
2000	19	25	45	1	3	1	439.70	462.3012	440.3193	160.0063	79.0170		484.3102	440.3204	438.3047	157.9917	79.9574

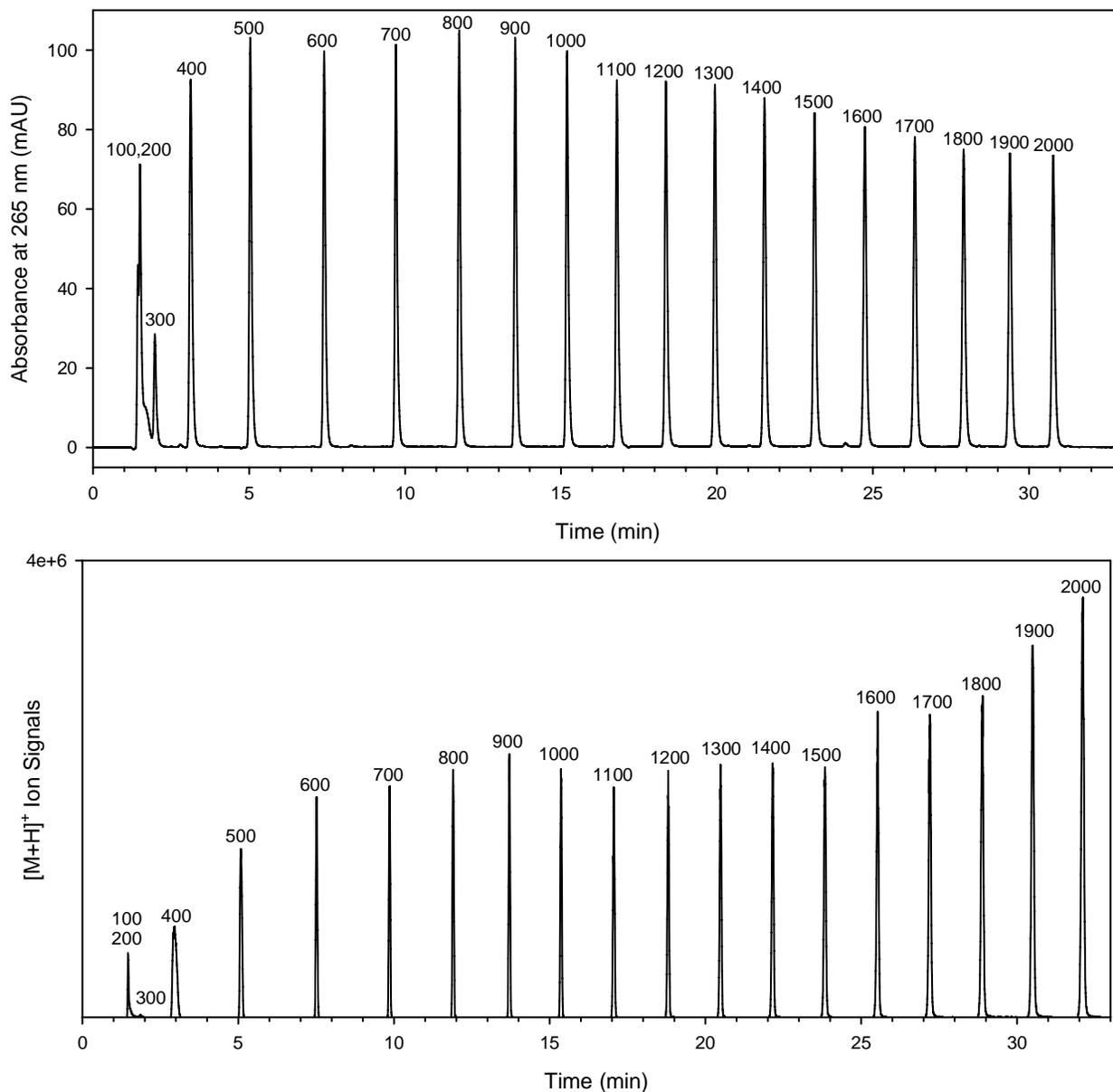


Figure 3 : Analyses par CPL-UV (en haut) et CPL-SM (en bas) du RM-RILC. Les pics sont indiqués avec les valeurs d'IR des 20 étalons de NAPS. Conditions pour la CPL : colonne Poroshell 120Å SB-C18 2,7 µm (150 × 2 mm); solvant A = H₂O avec HCOOH 50 mM, HCOONH₄ 2 mM; solvant B = CH₃CN avec HCOOH 50 mM, HCOONH₄ 2 mM; gradient = 5-100 % de B en 30 min; débit = 0,25 mL/min.

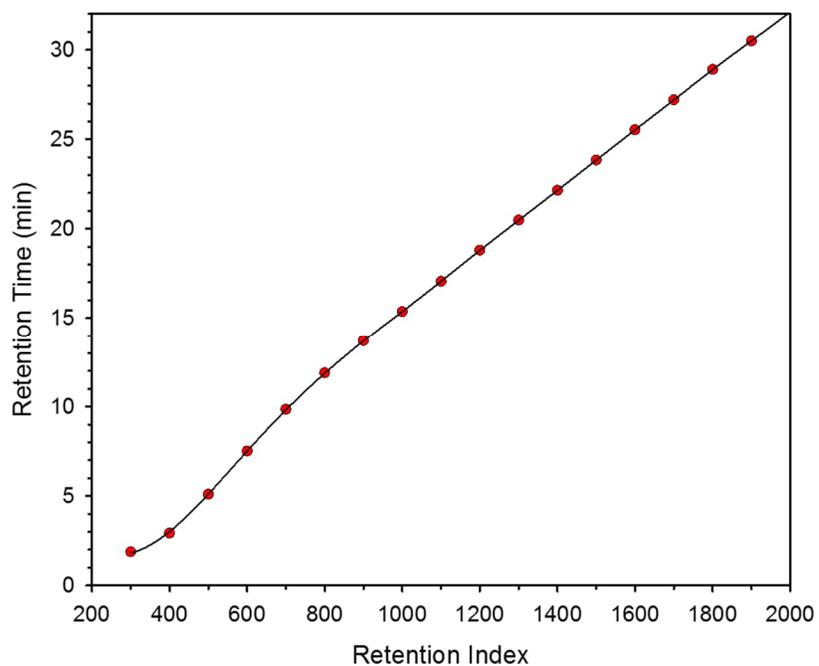


Figure 4 : Une courbe des temps de rétention en fonction des IR pour les étalons de NAPS. Une interpolation linéaire ou de fonction spline cubique (celle de la présente figure) conduit à une courbe d'étalonnage pour la détermination des IR des analytes.

Remerciements

Les membres suivants du personnel du CNRC ont contribué à la production et à la caractérisation du RM-RILC : M.A. Quilliam, S.D. Giddings, C. McNamara, K. Bekri, P. McCarron, W. Hardstaff, P. LeBlanc, D. Beach, K. Thomas, K.L. Reeves, R.A. Perez, S. Crain et E.J. Wright.

Le présent document devrait être cité de la manière suivante :

M.A. Quilliam, S.D. Giddings, C. McNamara, K. Bekri. "RM-RILC, a reference material for measurement of liquid chromatography retention indices", Biotoxin Metrology Technical Report RM-RILC-20140827, National Research Council Canada, Halifax.

DOI <https://doi.org/10.4224/crm.2019.rilc.20140827>

Date de délivrance : Septembre 2019

Version du document : 20220413

Date de révision : avril 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, information ou requête à :

Conseil national de recherches du Canada
1411, rue Oxford
Halifax (Nouvelle-Écosse) B3H 3Z1
Canada

Téléphone : 1-902-426-8281

Télécopieur : 1-902-426-5426

Courriel : CRM-MRCBiotoxin-Biotoxines@nrc-cnrc.gc.ca