Certificat d'analyse

CNRC·NRC Matériau de référence certifié

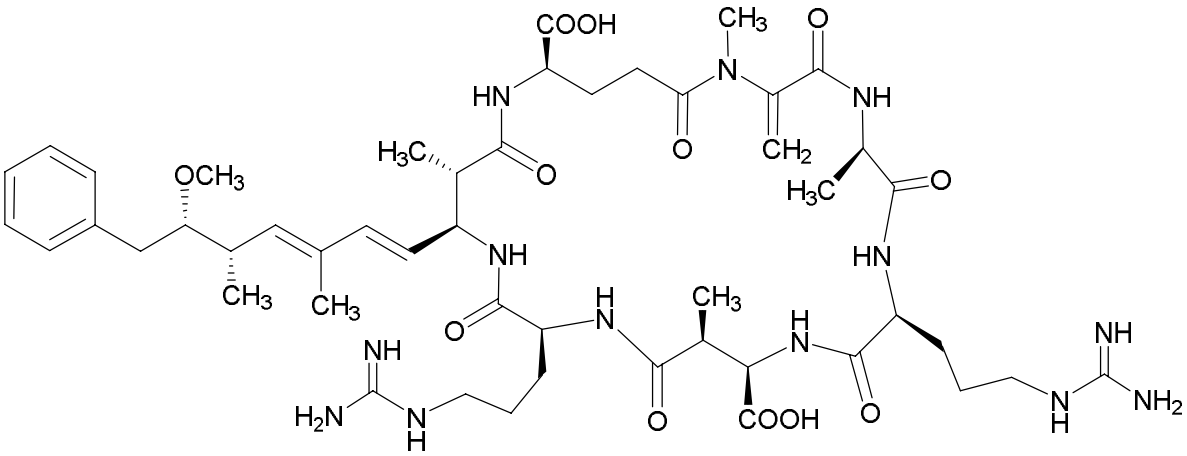
CRM-MCRR (lot numéro 20070207)

Solution d'étalonnage certifiée pour la microcystine-RR

La microcystine-RR (MCRR) est une toxine peptidique cyclique produite par des cyanobactéries d'eau douce [1]. Les microcystines ont été associées à des empoisonnements d'animaux domestiques et sauvages et elles posent un risque pour la santé humaine lors d'une contamination des approvisionnements en eau potable. Le CRM-MCRR est une solution certifiée pour l'étalonnage d'instruments préparée afin d'aider l'analyste à doser la microcystine-RR. Chaque ampoule contient environ 0,5 mL d'une solution de la toxine dissoute dans du méthanol aqueux (1/1, v/v) à une concentration convenant à l'étalonnage de méthodes d'analyse par chromatographie en phase liquide.

Tableau 1 : Concentrations certifiées de la microcystine-RR dans le CRM-MCRR.

Composé	µmol/L (à +20 °C)	µg/mL (à +20 °C)	µg/g
Microcystine-RR	9,91 ± 0,48	10,3 ± 0,5	11,2 ± 0,5



Microcystine-RR
Numéro de registre du CAS : 111755-37-4
Formule moléculaire : $C_{49}H_{75}N_{13}O_{12}$
Masse moléculaire : 1038,2 g/mol
$[M+H]^+$: *m/z* 1038,5731

Date d'expiration : 1 an après la date de vente
Conditions de stockage : congélateur (-12 °C ou moins)

Utilisation prévue

Le CRM-MCRR est une solution d'étalonnage de MRC conçue pour le développement de méthodes d'analyse et le dosage précis de la microcystine-RR. La concentration de toxine dans ce MRC convient à la préparation d'une série de dilutions à des fins d'étalonnage d'un appareil, comme un système de chromatographie en phase liquide avec détection par absorption ultraviolette (CL-DUV) ou par spectrométrie de masse (CL-SM).

Préparation du CRM-MCRR

La microcystine-RR a été obtenue de l'Université Åbo Akademi (Turku, Finlande). La toxine a été extraite d'une culture d'*Anabaena sp.*, purifiée par chromatographie et desséchée sous vide. Une partie de la toxine pure a été dissoute dans un mélange de 50 % de CD_3OH et de H_2O pour obtenir une solution mère qui a été utilisée pour la préparation du MRC. La solution de CRM-MCRR a été préparée dans une solution méthanol/eau (1/1, v/v) filtrée (0,2 µm) et dégazée, puis placée dans des ampoules en verre ambrées préremplies d'argon qui ont 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 structure moléculaire de la microcystine-RR a été confirmée par spectroscopie RMN, mesure précise de la masse et spectrométrie de masse en tandem (figures 1-3). La pureté de la microcystine-RR a été vérifiée au moyen des techniques suivantes : spectroscopie RMN des protons à 500 MHz, CL-DUV, CL-SM, CL avec détection de l'azote par chimiluminescence (CL-DNCL) [2] et électrophorèse capillaire (EC-UV). La présence de trois impuretés, [D-Asp^3]-MCRR, [Dha^7]-MCRR et un ester méthylique de la MCRR, à de faibles teneurs a été confirmée. Les niveaux de ces impuretés ont été estimés par CL-SM avec le CRM-MCRR comme étalon, en faisant l'hypothèse d'une même réponse molaire (tableau 2).

Tableau 2 : Valeurs à titre d'information pour d'autres composés présents dans le CRM-MCRR au moment de l'emballage.

Composé	$[M+H]^+$, *m/z*	Concentration (µmol/L) (à +20 °C)
[D-Asp^3]-Microcystine-RR	*m/z* 1024	0,03*
[Dha^7]-Microcystine-RR	*m/z* 1024	0,08*
Ester méthylique de la microcystine-RR	*m/z* 1052	0,01*

* Ces concentrations ne sont pas certifiées.

Homogénéité

Ce MRC étant une véritable solution, il devrait être homogène. Pour le confirmer, nous avons mesuré par CL-DUV la concentration de microcystine-RR dans des ampoules prélevées au hasard et représentant 1,4 % des ampoules produites. Au moyen d'une analyse de la variance des données, aucune hétérogénéité n'a pu être détectée.

Étude de stabilité

Des études exhaustives ont été faites pour déterminer la stabilité de cette toxine dans diverses conditions. La microcystine-RR est sensible à l'oxygène et subira aussi une isomérisation graduelle en 6(*Z*)-Adda [3] si elle est exposée à la lumière. Une étude sur la stabilité pendant 15 mois a été réalisée avec le CRM-MCRR, à diverses températures (-80, -16, +4, +20 et +37 °C). Aucune perte de toxine n'a pu être détectée à +4 °C pendant le cours de cette étude. Une dégradation inférieure à 1 % a été observée à +20 °C après 2 mois, ce qui indique une bonne stabilité à des fins d'expédition. Une perte de 5 % de matière a été observée à +37 °C après 2 mois.

Valeur certifiée

La valeur certifiée pour le CRM-MCRR, 9,91 ± 0,48 µmol/L (à +20 °C) (tableau 1), est basée sur des résultats obtenus au CNRC en suivant deux méthodes d'analyses indépendantes : spectroscopie de résonance magnétique nucléaire quantitative (RMNq) [4] et CL-DNCL. L'étalonnage de ces deux méthodes a été réalisé en utilisant des solutions précises de caféine.

Les résultats indiqués sur le présent certificat sont traçables selon la norme du SI au moyen d'étalons de pureté établie préparés par gravimétrie. Le présent produit convient comme matériau de référence pour les programmes d'assurance de la qualité des laboratoires.

Incertitude

L'estimation de l'incertitude globale (U_{CRM}) pour le CRM-MCRR comprend les incertitudes associées à la caractérisation du lot (u_{char}), à la variation d'une ampoule à l'autre (u_{hom}) et à l'instabilité associée au stockage à long terme (u_{stab}) [5-6]. Ces éléments peuvent être combinés de la manière suivante :

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

avec *k* comme facteur de couverture (généralement 2 ou 3).

Les mesures quantitatives par DNCL et RMNq ont contribué aux incertitudes les plus importantes. Une fois combinées, elles conduisent à une incertitude relative pour la caractérisation du lot (u_{char}) de 0,024. Ce MRC étant une véritable solution, u_{hom} était non significative, les solutions étant intrinsèquement homogènes [7]. Néanmoins, des tests d'homogénéité ont été réalisés (voir la section Homogénéité), et la variance d'une ampoule à l'autre a été déterminée comme inférieure à la variance de la mesure, résultant en une valeur relative de 0,0033 pour u_{hom}. Une étude sur la stabilité à long terme a été réalisée sur ce MRC (voir la section Étude de stabilité). Elle a mis en évidence qu'aucune perte observable de matière n'a lieu quand il est stocké dans les conditions recommandées. La microcystine-RR possède une stabilité raisonnable à la température ambiante au cas où un retard de livraison aurait lieu. L'incertitude due à la stabilité (u_{stab}) [8] n'était pas significative, avec une valeur relative de 0,0041. En appliquant un facteur de couverture de 2, on obtient une incertitude-type relative finale de 0,049 pour la valeur certifiée.

Instructions pour le stockage

Pour assurer la stabilité de la microcystine-RR, ce MRC et toute dilution de celui-ci devraient être stockés dans le noir dans un congélateur (de préférence à -12 °C ou moins).

Expiration

Quand il est conservé non ouvert dans les conditions de stockage recommandées (voir la section Instructions pour le stockage), la concentration certifiée de ce MRC est valide pendant 1 an à partir de la date de vente.

Instructions pour l'utilisation

Avant de l'ouvrir, on devrait laisser chaque ampoule revenir à la température ambiante et mélanger à fond son contenu. L'ampoule devrait être renversée plusieurs fois, puis maintenue verticalement. La tapoter pour s'assurer que son contenu passe au bas de l'ampoule. L'ouvrir au niveau de la marque. Une fois l'ampoule ouverte, des aliquotes précises devraient être prélevées au moyen d'équipement volumétrique calibré et placées dans des fioles ou des flacons jaugés. Si la solution est laissée ouverte 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 évaporer complètement ce MRC en raison de pertes potentielles sur les parois en verre. Il faut prendre soin d'utiliser de l'équipement avec des surfaces en verre pour transférer et stocker les solutions, car des pertes de microcystines peuvent avoir lieu sur les matières plastiques [9]. De plus, les solutions finales devraient contenir au moins 25 % de méthanol afin d'assurer la solubilité complète de l'analyte.

Une procédure utile pour s'assurer de faire des dilutions précises est d'utiliser une balance pour peser l'aliquote prélevée ainsi que la solution diluée finale, en assumant que le mélange méthanol/eau (1/1, v/v) est utilisé comme diluant (la masse volumique de la solution de MRC est de 0,925 g/mL à +25 °C). *Veuillez noter* : Le volume de la solution n'est pas certifié, seule la concentration l'est.

Consignes de sécurité

Les microcystines sont connues pour être hépatotoxiques et peuvent être génotoxiques. Seules des personnes qualifiées devraient manipuler cette solution et des mesures d'élimination appropriées devraient être prises. Il faut porter des gants épais et une protection pour les yeux quand on ouvre les ampoules en cas de brisure du verre. Une fiche signalétique (FS) est disponible pour le CRM-MCRR.

Références

1. Carmichael WW (1994). The toxins of cyanobacteria. *Sci Am* 270:78-86.
2. Quilliam MA et al., manuscript in preparation.
3. Tsuji K, Nalto S, Kondo F, Ishikawa N, Watanabe M, Suzuki M, Harada K (1994). Stability of microcystins from cyanobacteria: effect of light on decomposition and isomerisation. *Environ Sci Technol* 28:173-177.
4. Burton IW, Quilliam MA, Walter JA (2005). Quantitative ^{1}H NMR with external standards: use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products. *Anal Chem* 77:3123-3131.
5. Pauwels J, Lamberty A, Schimmel H (2000). Evaluation of uncertainty of reference materials. *Accred Qual Assur* 5:95-99.
6. Pauwels J, Lamberty A, Schimmel H (1998). The determination of the uncertainty of reference materials certified by laboratory intercomparison. *Accred Qual Assur* 3:180-184.
7. 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. *Accred Qual Assur* 6:274-277.
8. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, ISBN 92-67-10188-9, 1st ed. ISO, Geneva, Switzerland (1993).
9. Hyenstrand P, Metcalf JS, Beattie KA, Codd GA (2001). Losses of the cyanobacterial toxin microcystin-LR from aqueous solution by adsorption during laboratory manipulations. *Toxicon* 39:589-594.

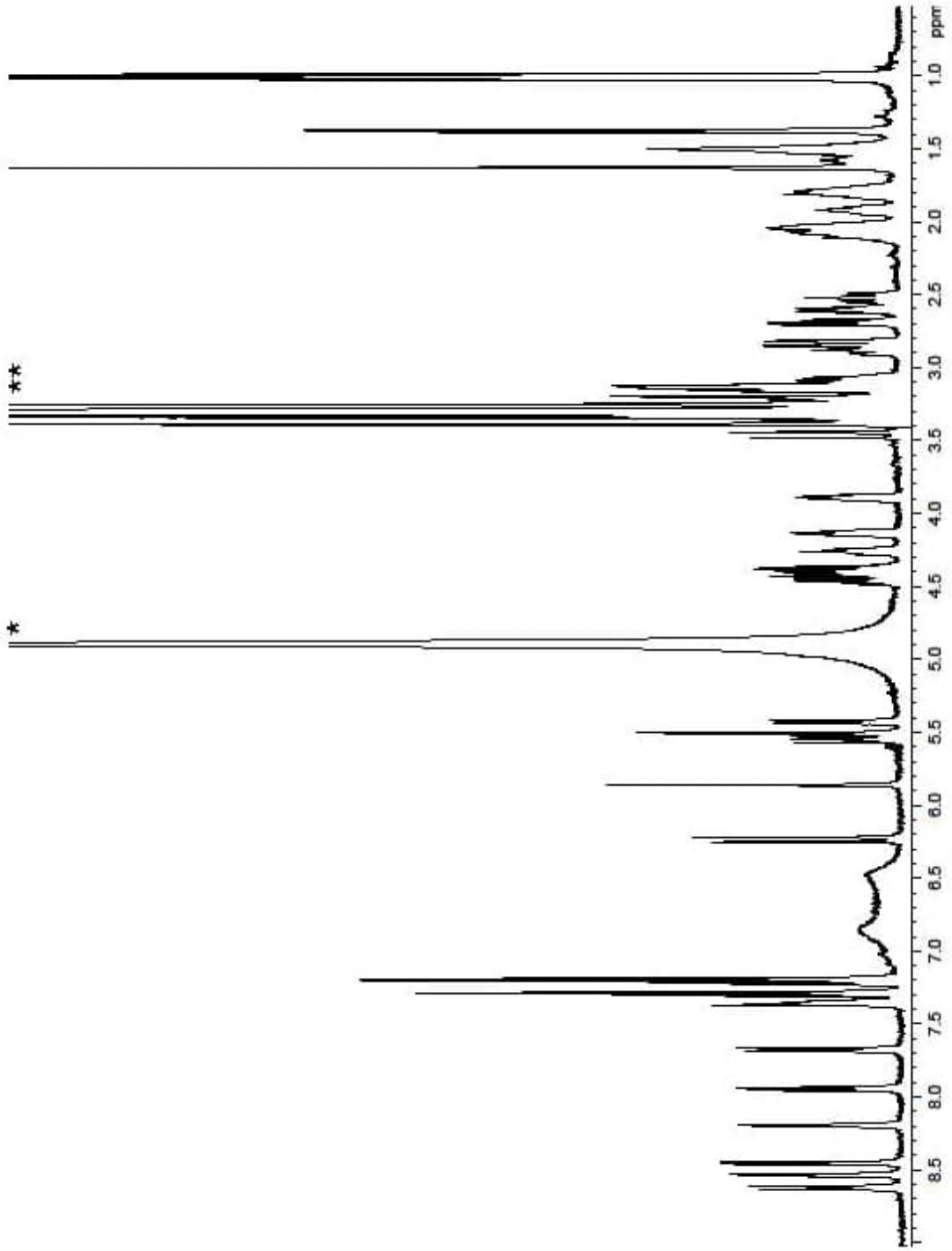


Figure 1 : Spectre RMN des protons de la microcystine-RR dans une solution eau/CD_3OH. Les pics tronqués représentent les protons de l'eau (*) et du méthanol (**).

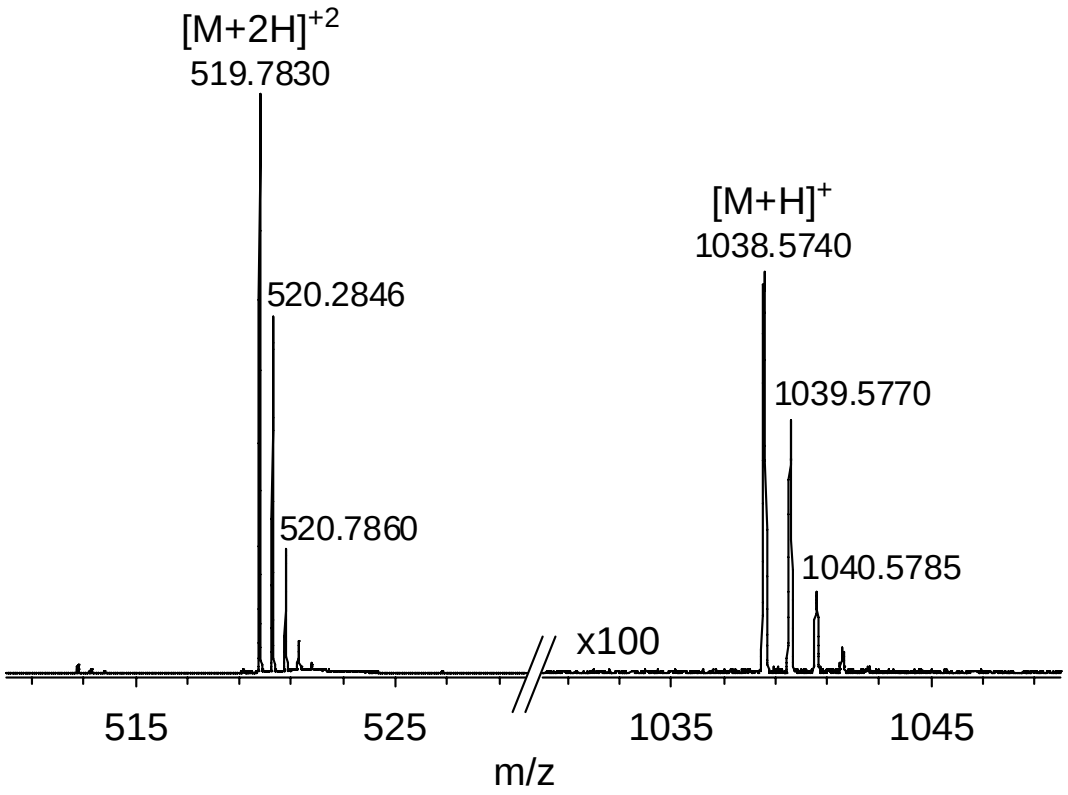


Figure 2: Spectre de masse à haute résolution de la microcystine-RR. Le CRM-MCRR a été dilué dans un mélange de 50 % de CH_3CN dans H_2O avec 0,1 % de HCOOH et infusé dans un spectromètre de masse Waters QToF Premier à 1 µL/min. De la leucine enképhaline (556,2771 Da) a été utilisée comme masse de référence afin de corriger toute variabilité à court terme de la calibration, et elle a été infusée dans le spectromètre de masse par une chaîne distincte à 1 µL/min. La masse observée de l'ion $[M+H]^+$ était de 1038,5740, ce qui est en bon accord avec la masse théorique de 1038,5731.

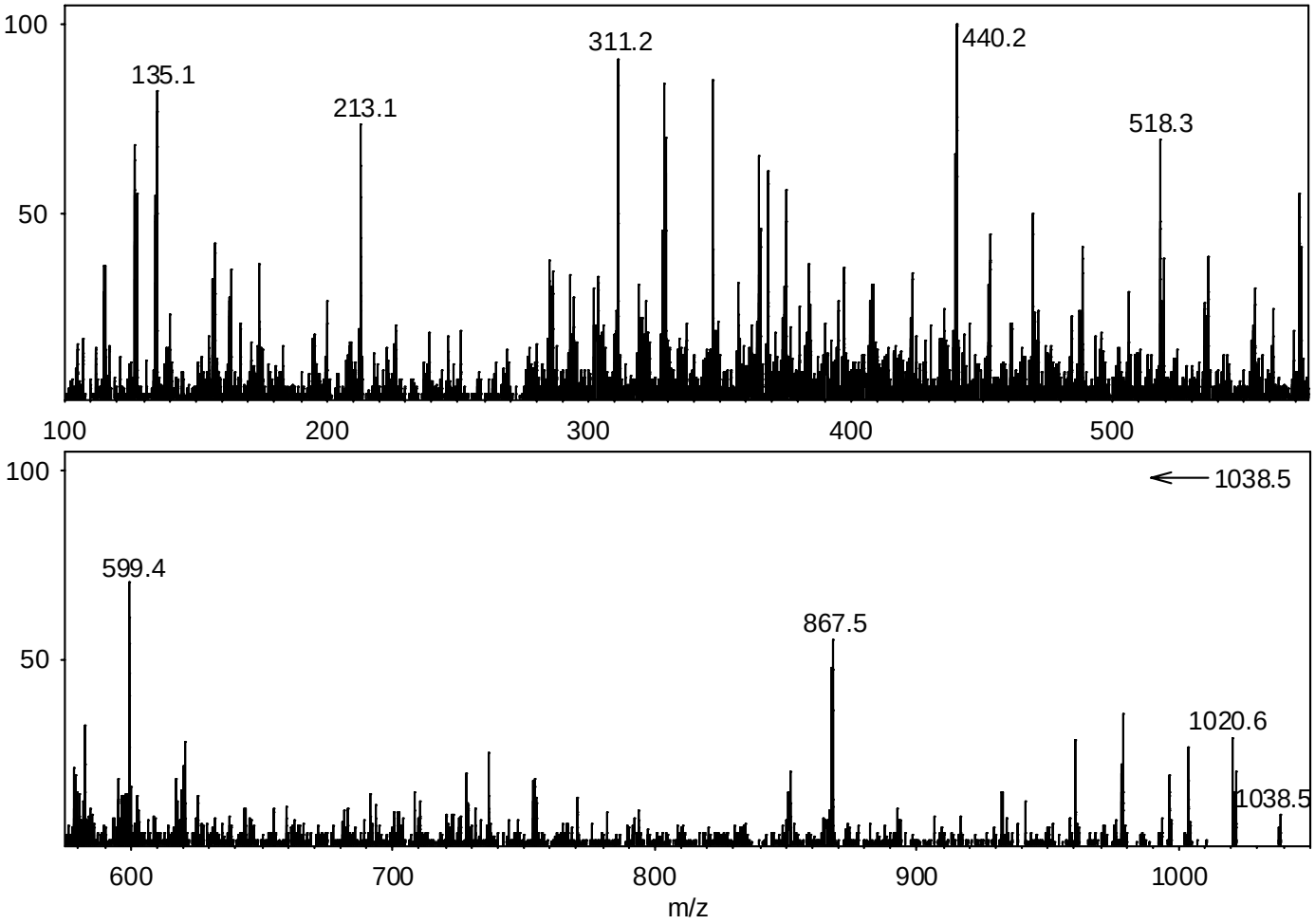


Figure 3: Spectre de masse des ions produits de l'ion $[M+H]^+$ (*m/z* 1038) de la microcystine-RR généré lors de l'analyse par CL-SM/SM. Conditions : CL Agilent 1200 et SM AB-Sciex API4000 QTRAP avec ionisation par électronébulisation; potentialité de défragmentation 80 V; énergie de collision 38 V; colonne Zorbax SB-C18, 1,8 µm, 50 mm × 2 mm d.i. à +40 °C; débit de 0,2 mL/min; élution avec gradient, 30 % à 65 % de B en 5 min, avec A = eau, B = 95 % acétonitrile, les deux avec du formate d'ammonium 2 mM et de l'acide formique 50 mM.

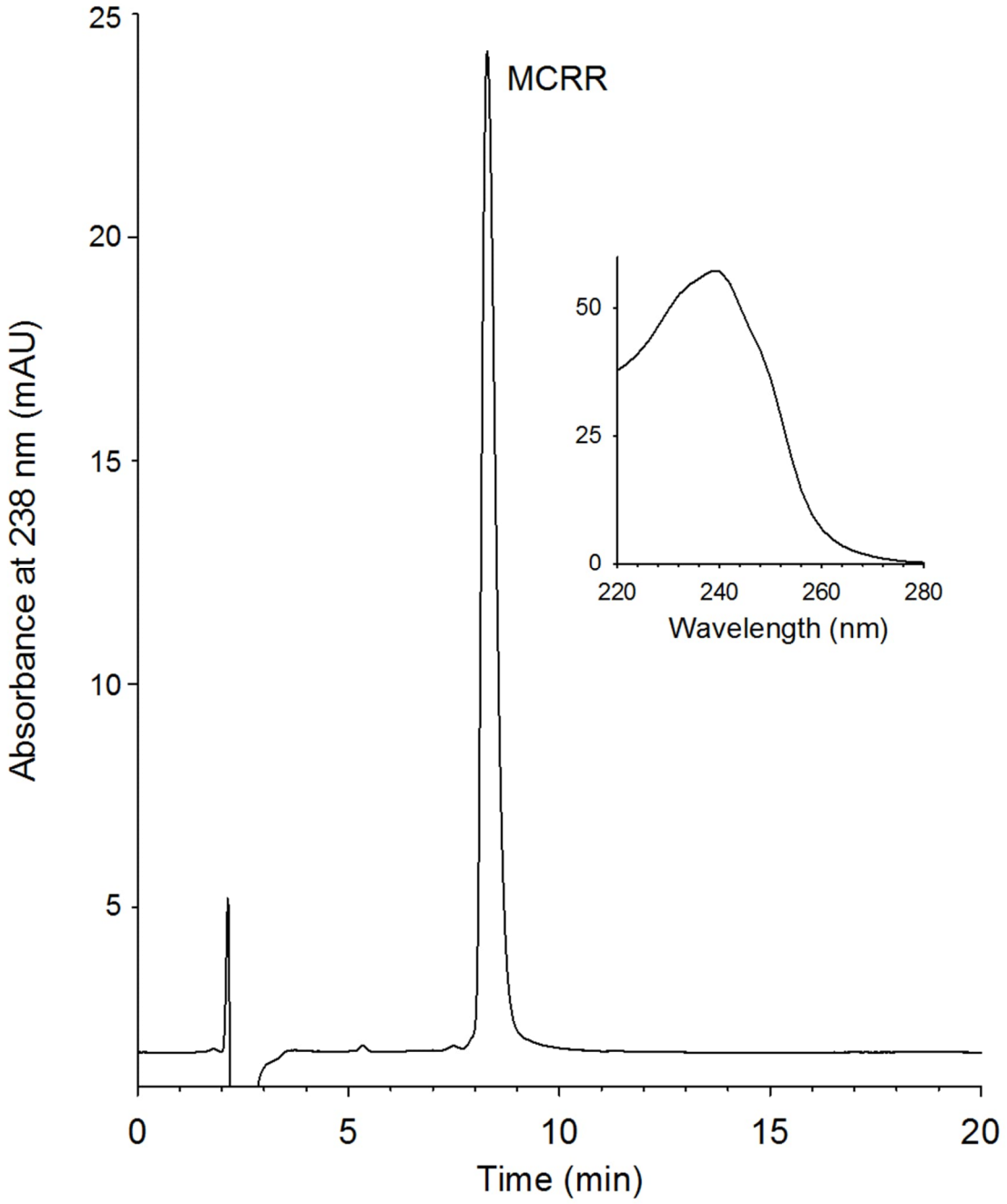


Figure 4: Analyse du CRM-MCRR par chromatographie en phase liquide avec détection dans l'ultraviolet (CL-DUV). Conditions : colonne Zorbax SB-C8, 2,1 × 150 mm à +40 °C; analyse isocratique avec CH_3OH/H_2O (1/1) avec HCOOH à 0,2 %; débit de 0,2 mL/min; injection de 10 µL; détection UV à 238 nm. Le spectre UV a été acquis en utilisant un détecteur à réseau de diodes lors d'une analyse distincte.

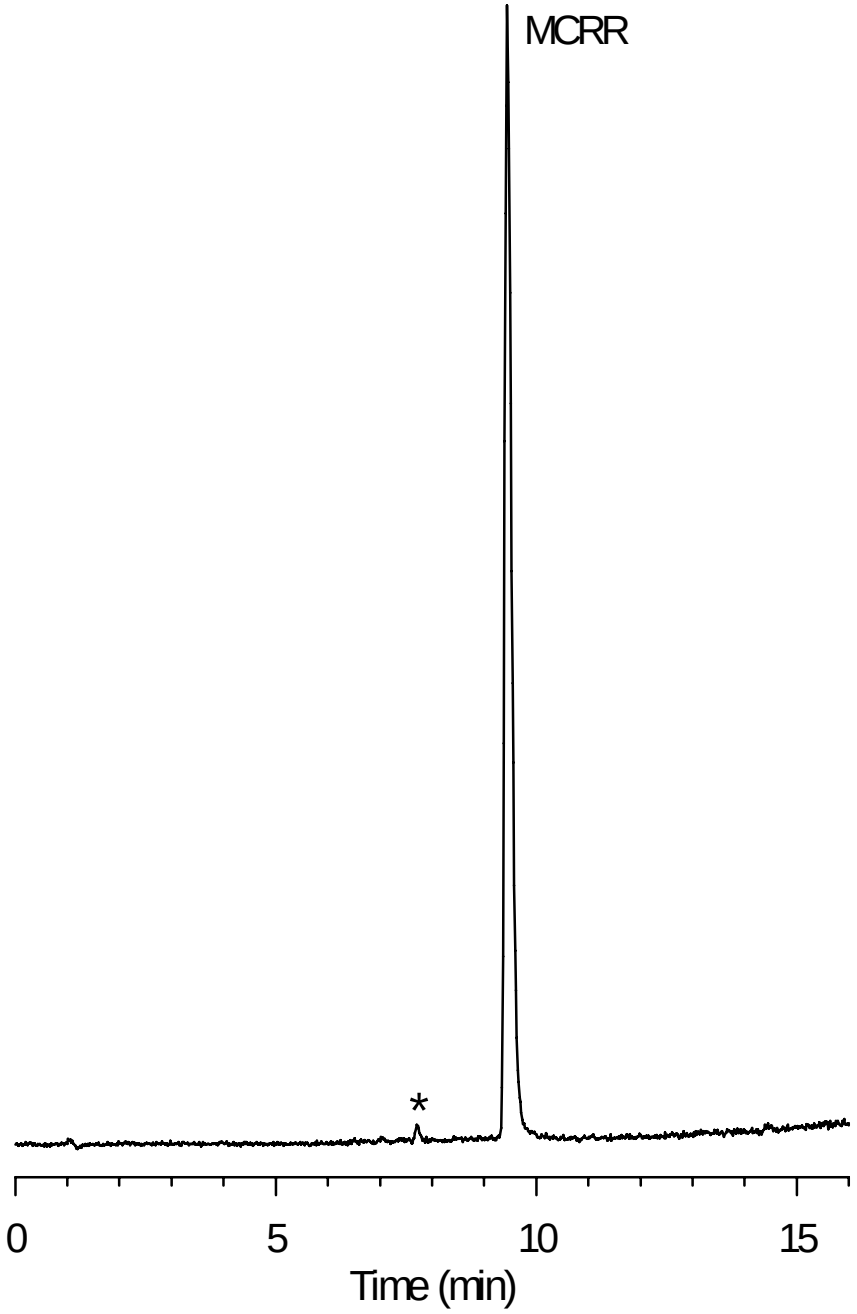


Figure 5: Analyse d'une dilution de la solution mère du CRM-MCRR par chromatographie en phase liquide avec détection par spectrométrie de masse (CL-SM). Conditions : colonne Keystone BDS Hypersil C8, 2,1 × 50 mm à +40 °C; élution avec gradient de 20 % à 80 % de B en 10 min (maintien jusqu'à 20 min), avec A = H_2O; B = 95 % CH_3CN/H_2O les deux avec HCOOH 50 mM et NH_4COOH 2 mM; débit de 0,2 mL/min. Balayage complet au moyen d'un spectromètre de masse à simple quadripôle AB-Sciex API165. Le pic marqué d'un astérisque (*) est celui d'un composé inconnu.

Remerciements

Les membres suivants du personnel du portefeuille Science des mesures et étalons du CNRC ont contribué à la production et à la certification du CRM-MCRR : P. Blay, S. Crain, I. Burton, W. Hardstaff, D. Marciniak, J. Melanson, G. Pitcher, M. Quilliam, K. Reeves, K. Thomas, C. Trudeau et J. Walter.

Les membres suivants du personnel du Département de biochimie et pharmacie de l'Université Åbo Akademi (Turku, Finlande) ont contribué à la production et à la caractérisation de la microcystine-RR utilisée pour le CRM-MCRR : L. Spoof et J. Meriluoto.

Un financement partiel a été fourni par le Ministère de l'Environnement de l'Ontario et l'Académie de Finlande (décision numéro 108947).

Le présent document devrait être cité comme suit :

K. Thomas, J. Meriluoto, L. Spoof, J. E. Melanson, K. Reeves, J. A. Walter and M. A. Quilliam. "CRM-MCRR, a certified calibration solution reference material for microcystin-RR", Biotoxin Metrology Technical Report CRM-MCRR-20070207, National Research Council Canada, Halifax, August, 2013.

DOI https://doi.org/10.4224/crm.2013.mcrr.20070207

Première certification complétée : août 2013
Version du document : 20220330

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