Certificat d'analyse

CNRC·NRC Matériau de référence certifié

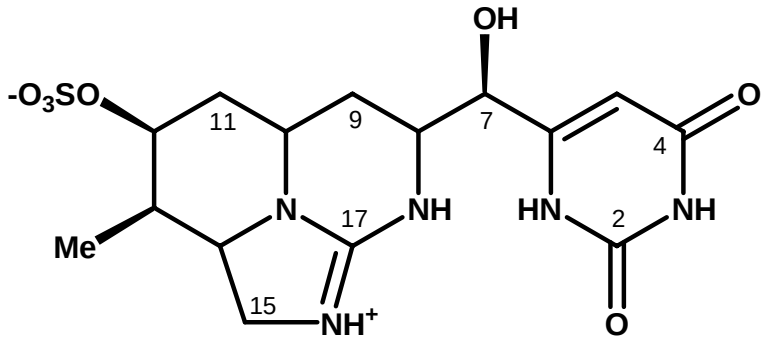
CRM-CYN (lot numéro 20050531)

Solution d'étalonnage certifiée pour la cylindrospermopsine

La cylindrospermopsine (CYN) est une toxine cyanobactérienne associée à des cas d'intoxication [1]. Le CRM-CYN est une solution d'étalonnage pour les instruments, certifiée et préparée afin d'aider l'analyste à doser la CYN. Chaque ampoule contient environ 0,5 mL d'une solution de CYN dissoute dans de l'eau désionisée, filtrée, à une concentration convenant à l'étalonnage de systèmes de chromatographie en phase liquide et au dopage d'échantillons de contrôle à des fins d'études de taux de récupération.

Tableau 1 : Valeurs des concentrations certifiées pour le CRM-CYN.

Composé	µmol/L (à +20 °C)	µg/mL (à +20 °C)	µg/g
CYN	30 ± 2	12,6 ± 0,8	12,7 ± 0,8



Cylindrospermopsine
Numéro de registre CAS : 143545-90-8
Formule moléculaire : $C_{15}H_{21}N_5O_7S$
Masse moléculaire : 415,42 g/mol
$[M+H]^+$: *m/z* 416,12345

Date d'expiration : 1 an à partir de la date de vente
Conditions de stockage : +4 °C

Utilisation prévue

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

Préparation du CRM-CYN

La matière de départ était une culture à grande échelle en laboratoire de l'algue *Cylindrospermopsis raciborskii* [2,3]. La CYN a été extraite, puis purifiée par chromatographie préparative [4], desséchée sous vide, puis dissoute dans de l'eau désionisée pour obtenir une solution mère. La solution CRM-CYN a été préparée dans de l'eau désionisée, filtrée (0,2 µm) et dégazée puis transférée dans des ampoules en verre ambré 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 CYN a été confirmée par spectroscopie RMN et par spectrométrie de masse en tandem. Le spectre RMN et le spectre de masse des ions produits sont respectivement donnés aux figures 1 et 2.

La pureté du CRM-CYN a été vérifiée au moyen des techniques suivantes : spectroscopie RMN des protons à 500 MHz, CL-UV (figure 3), CL-SM [5] (figure 2), électrophorèse capillaire avec détection UV (EC-DUV) [6] et chromatographie en phase liquide avec détection de l'azote par chimiluminescence (CL-DNCL) [7].

Homogénéité

Ce MRC étant une solution vraie, il devrait donc être homogène. Pour le confirmer, la concentration de CYN dans des ampoules prélevées au hasard, représentant 1,2 % des ampoules produites, a été mesurée par CL-UV. La variation d'une ampoule à l'autre a été déterminée comme étant inférieure à la variation pour des sous-échantillons d'une même ampoule, ce qui montre une homogénéité acceptable pour l'ensemble des ampoules.

Étude de stabilité

Des études sur la stabilité ont mis en évidence une excellente stabilité à long terme des solutions de CYN conservées à +4 °C. Les solutions sont aussi stables quand elles sont conservées dans un congélateur fiable, sans dégivrage (préférablement ≤ -20 °C). Il a aussi été déterminé que les solutions de CRM-CYN exhibent une bonne stabilité à la température ambiante, avec aucune décomposition détectable observée après douze mois.

Valeur certifiée

La valeur certifiée pour le CRM-CYN, 30 ± 2 µmol/L (à +20 °C) (tableau 1), est basée sur des résultats obtenus au CNRC en utilisant deux méthodes d'analyse indépendantes : CL-DNCL et spectroscopie RMN quantitative (RMNq) [8]. Les étalonnages pour ces deux techniques ont été réalisés en utilisant des solutions précises de caféine de qualité USP.

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.

Coefficient d'absorption molaire par UV

Plusieurs valeurs différentes ont été rapportées dans la littérature pour le coefficient d'absorption molaire de la CYN. Nous avons déterminé les données d'absorbance suivantes en utilisant le CRM-CYN :

Tableau 2 : Valeur du coefficient d'absorption molaire de la CYN.

λmax (nm)*	ε (M^{-1} cm^{-1})*
262	9800 ± 300

* Mesures faites avec l'eau comme solvant à pH 7 et à +23 °C. Veuillez noter que des pH différents peuvent conduire à des valeurs différentes.

Incertitude

L'estimation de l'incertitude globale (U_{CRM}) pour le CRM-CYN 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}) [9,10]. Ces éléments peuvent être 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 (= 2).

Toutes ces sources d'incertitude ont été prises en compte pour l'estimation de l'incertitude finale de la concentration certifiée du CRM-CYN [11,12]. Des tests sur l'homogénéité ont été réalisés (voir la section Homogénéité) et la variation des résultats pour une même ampoule ou pour une ampoule à l'autre a été déterminée comme étant négligeable. Des études sur la stabilité pour une durée excédant la durée de vie spécifiée du CRM-CYN ont été réalisées et aucune perte significative de matière n'a été observée. La CYN exhibe une stabilité raisonnable à la température ambiante (voir la section Étude de stabilité), en cas de délai au cours de l'expédition. Il s'ensuit que la contribution relative de l'incertitude due à la stabilité pendant le stockage (u_{stab}) a été déterminée négligeable.

Toutes les sources raisonnables d'erreur liées à la caractérisation du CRM-CYN ont été prises en compte et quantifiées. La valeur certifiée pour la concentration de CYN est basée sur des dosages par RMNq et CL-DNCL, qui ont contribué ensemble à une incertitude relative de 0,030 (calculée à partir de l'incertitude-type de la moyenne produite par les méthodes et l'incertitude des calibrations). L'incertitude relative associée à la dilution de la solution mère pour produire la solution MRC finale est négligeable en raison de l'utilisation de procédures gravimétriques. En appliquant un facteur de couverture de 2, nous avons calculé une incertitude-type relative finale pour la concentration certifiée de CYN dans le CRM-CYN de 0,061.

Instructions pour le stockage

Pour assurer la stabilité à long terme du CRM-CYN, les ampoules non ouvertes devraient être conservées à l'abri de la lumière dans un réfrigérateur à environ +4 °C. Il a été montré que cette toxine est stable dans ces conditions. Les solutions sont aussi stables quand elles sont conservées dans un congélateur fiable, sans dégivrage (de préférence ≤ -20 °C). Le présent MRC a été préparé dans des conditions qui réduisent au minimum toute chance de contamination bactérienne, mais il est quand même recommandé que les aliquotes et dilutions de ce MRC soient conservées congelées (≤ -20 °C).

Expiration

Quand les ampoules non ouvertes sont conservées dans les conditions 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 d'ouvrir une ampoule, il faudrait la laisser revenir à la température ambiante, puis bien mélanger son contenu. L'ampoule devrait être renversée plusieurs fois, puis maintenue à la verticale et tapotée pour faire descendre le liquide. Elle devrait être ouverte au niveau de la marque à cet effet. Une fois l'ampoule ouverte, des aliquotes précises devraient être prélevées au moyen d'équipement volumétrique étalonné, puis transférées dans des fioles ou des flacons jaugés. Une augmentation de la concentration due à l'évaporation du solvant aura lieu si la solution est laissée ouverte à l'air libre pendant plus de quelques minutes. Il est recommandé de ne pas faire évaporer totalement ce MRC, en raison d'une perte potentielle sur les parois en verre. 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 finale diluée, en assumant que de l'eau est utilisée comme diluant. *Veuillez noter :* Le volume de la solution n'est pas certifié, seule la concentration l'est.

Consignes de sécurité

La CYN inhibe de manière irréversible la synthèse des protéines et peut aussi être génotoxique [4,13]. Seules des personnes qualifiées devraient manipuler cette solution et des méthodes d'élimination appropriées devraient être suivies. Il faudrait porter des gants épais et une protection pour les yeux quand on ouvre une ampoule en cas de brisure du verre. Une fiche signalétique (FS) est disponible pour le CRM-CYN.

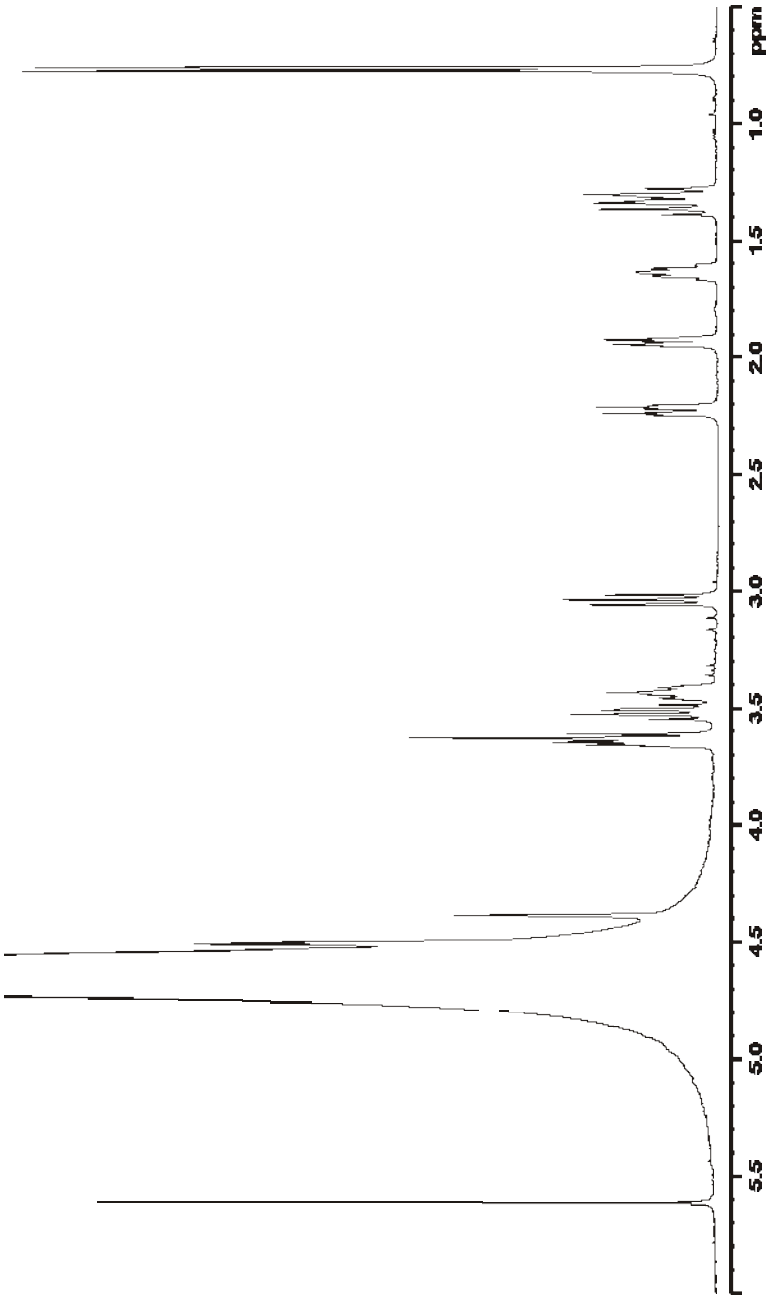


Figure 1 : Spectre RMN des protons (500 MHz) de la solution mère de CYN (dans H_2O) utilisée pour la préparation du CRM-CYN.

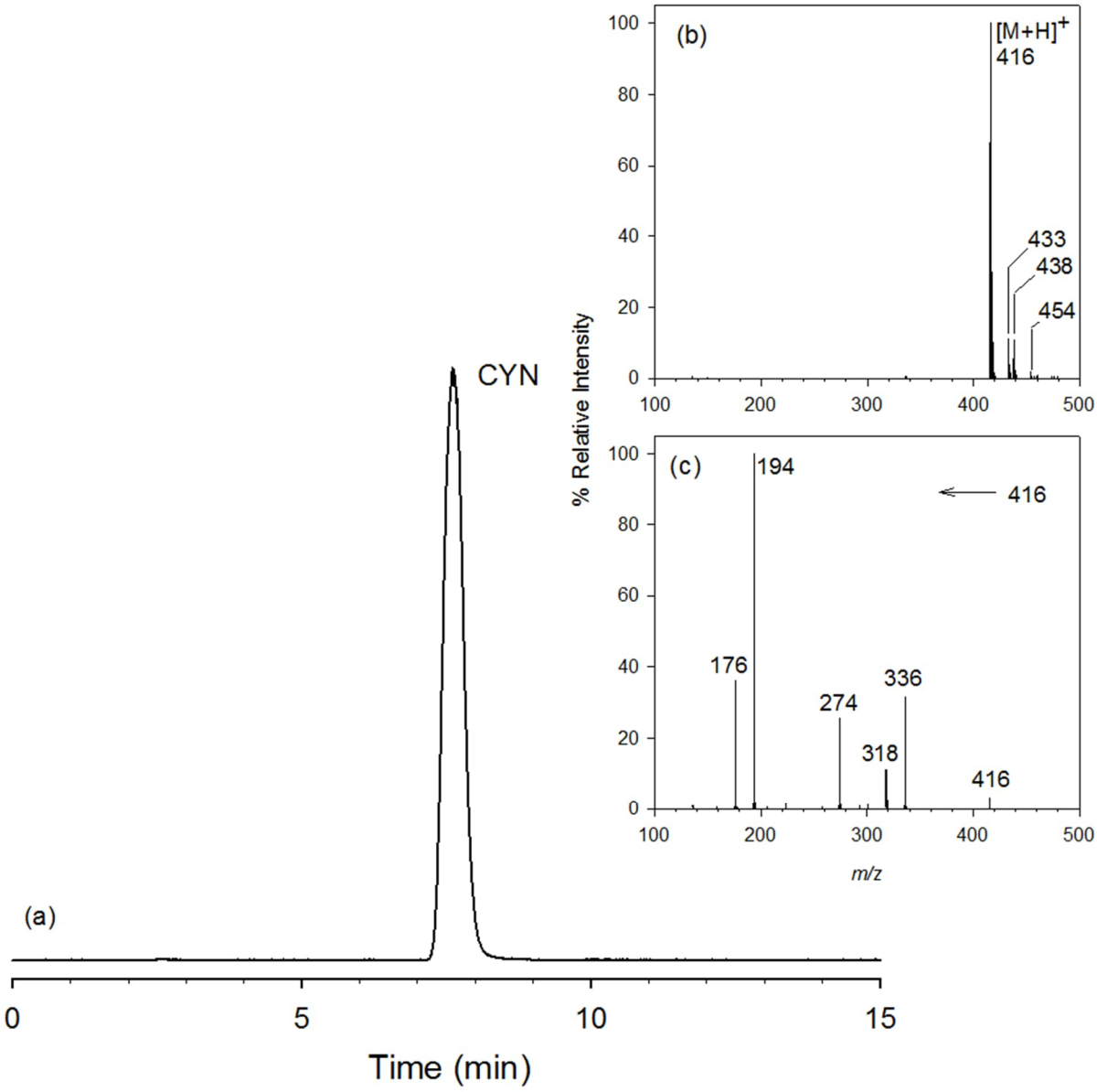


Figure 2 : Analyse du CRM-CYN par CL-SM. Conditions : colonne = TosoHaas TSKgel Amide-80, 2,1 × 250 mm à +30 °C; phase mobile = 71 % CH_3CN/H_2O, acide formique 3,6 mM, formate d'ammonium 2 mM (isocratique); débit = 0,2 mL/min; injection de 10 µL. (a) spectromètre de masse API-165 à simple quadripôle, suivi en mode de détection d'ions sélectionnés (*m/z* 416,4) avec ionisation par électronébulisation en mode positif, durée d'acquisition = 150 msec; (b) spectre de masse par électronébulisation; (c) spectre des ion produits de *m/z* 416.

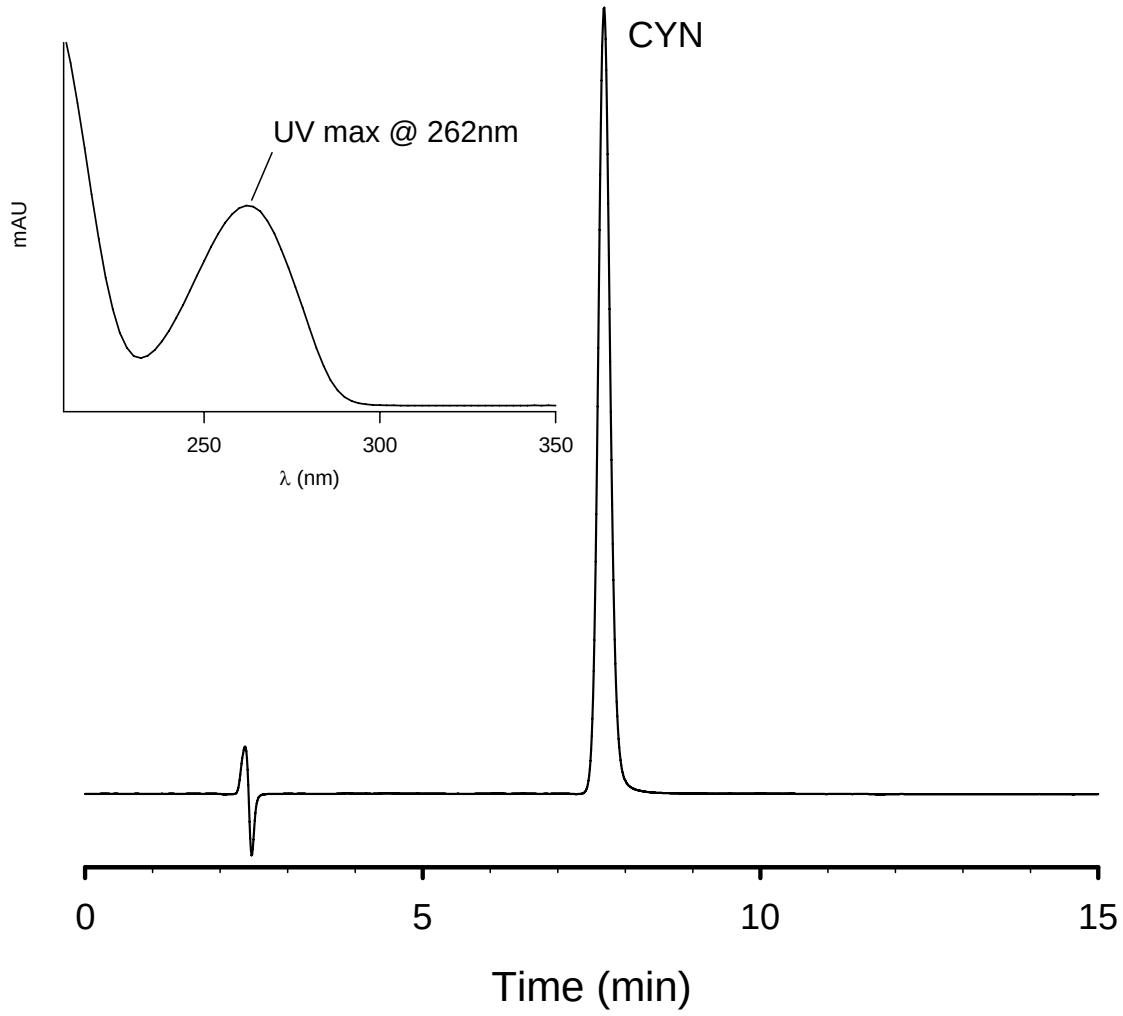


Figure 3 : Analyse du CRM-CYN par CL-UV à 262 nm. Conditions : colonne = Zorbax SB-C8, 2,1 × 150 mm, maintenue à +30 °C; phase mobile = 5 % CH_3OH/H_2O avec acide heptane sulfonique 2 mM (isocratique); débit = 0,2 mL/min; injection de 10 µL.

Références

1. Griffiths DJ, and Saker ML (2003). The Palm Island mystery disease 20 years on: a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environ Toxicol* 18:78-93.
2. Ohtani I, Moore RE, Runnegar MTC (1992). Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J Am Chem Soc* 114:7941-7942.
3. Heintzelman GR, Fang WK, Keen SP, Wallace GA, Weinreb SM (2002). Stereoselective total syntheses and reassignment of stereochemistry of the freshwater cyanobacterial hepatotoxins cylindrospermopsin and 7-epicylindrospermopsin. *J Am Chem Soc* 124:3939-3945.
4. Humpage AR, Fenech M, Thomas P, Falconer IR (2000). Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutat Res* 472:155-161.
5. Dell'Aversano C, Eaglesham GK, Quilliam MA (2004). Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr A 1028:155-164.
6. Vasas G, Gáspár A, Surányi G, Batta G, Gyémánt G, M-Hamvas M, Máthé C, Grigorszky I, Molnár E, Borbély G (2002). Capillary electrophoresis assay and purification of cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from Aphanizomenon ovalisporum, by plant test (blue-green Sinapis test). Anal Biochem 302:95-103.
7. Quilliam MA, manuscrit en préparation.
8. 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.
9. Pauwels J, Lamberty A, Schimmel H (2000). Evaluation of uncertainty of reference materials. Accred Qual Assur 5:95-99.
10. Pauwels J, Lamberty A, Schimmel H (1998). The determination of the uncertainty of reference materials certified by laboratory intercomparison. Accred Qual Assur 3, p. 180-184.
11. 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.
12. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, ISBN 92-67-10188-9, 1st edition ISO, Geneva, Switzerland (1993).
13. Froscio SM, Humpage AR, Burcham PC, Falconer IR (2003). Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. Environ Toxicol 18:243-251.

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-CYN : Y.M. Chen, S. Crain, W. Hardstaff, J. Ku, D. Marciniak, M. Quilliam, K. Reeves, K. Thomas et J. Walter.

La biomasse de plancton a été produite et la cylindrospermopsine isolée par A.R. Humpage, Australian Water Quality Centre, Adélaïde, Australie.

Le présent document devrait être cité comme suit :

Y.M. Chen, K. Thomas, S. Crain and M.A. Quilliam: “CRM-CYN, a certified calibration solution reference material for cylindrospermopsin”, Biotoxin Metrology Technical Report CRM-CYN-20050531, National Research Council Canada, Halifax, February 2006.
DOI https://doi.org/10.4224/crm.2006.cyn.20050531

Première certification complétée : février 2006
Version du document : 20220321

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