

CHROM. 23 006

Détection spécifique par chromatographie gazeuse–spectrométrie de masse des amines sympathomimétiques urinaires dans le cadre des contrôles antidopage

A. FRANCESCHINI, J. M. DUTHEL et J. J. VALLON*

Laboratoire de Biochimie, Toxicologie et Analyse des Traces, Hôpital Edouard Herriot, Place d'Arsonval, 69437 Lyon Cédex 03 (France)

(Reçu le 20 juin 1990; manuscrit modifié reçu le 23 novembre 1990)

ABSTRACT

Use of gas chromatography–mass spectrometry for urinary sympathomimetic amine detection in anti-doping control

A specific, sensitive and reliable gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) technique for detection of sympathomimetic amines following urinary extraction is proposed.

Amphetamine, phentermine, ephedrine, mephénorex, methylphénidate, benzphétamine, clobenzorex and internal standard (fenfluramine) are extracted from urines at pH 7.0 using elution by chloroform–isopropanol on C₁₈ cartridges. Derivatization followed by GC–MS analysis allows identification of these drugs founded on relative retention times and mass spectra.

The quantitation limit for derivatizable drugs was found to be 200 ng/ml and 500 ng/ml for underivatizable drugs.

INTRODUCTION

Les amines sympathomimétiques non phénoliques: amphétamine (AM), phentermine (PT), éphédrine (EPH), méfénorex (MF), clobenzorex (CB), benzphétamine (BM), méthylphénidate (MPD) sont largement utilisées chez les sportifs [1] et chez les drogués [2,3]; de ce fait, il est nécessaire de développer des techniques de détection sensibles et fiables. Les techniques de dosage radioimmunologique (RIA) [4] ou fluoroimmunologique [5] ne sont pas spécifiques d'une molécule donnée et présentent des réactions croisées avec des substances de structure voisine. La détection des amphétamines par chromatographie sur couche mince [6] offre des limites de détection plus élevées que par chromatographie gazeuse–spectrométrie de masse (CG–SM). D'autre part, les screenings réalisés en chromatographie gazeuse couplée, soit à un détecteur NPD [7], soit à un détecteur à ionisation de flamme [8], ne permettent d'identifier la drogue recherchée que par son temps de rétention relatif à un étalon interne.

La CG–SM permet une détection de faibles quantités de drogues dans l'urine et

leur identification absolue directement, de façon précise et exacte, par leur temps de rétention relatif et leur spectre de masse. La technique que nous avons développée utilise une extraction des drogues sur cartouche C_{18} suivie d'une dérivation par l'anhydride trifluoro acétique (TFA). Les amines sympathomimétiques sont ensuite analysées par CG-SM.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Appareillage

Ensemble chromatographe en phase gazeuse-spectromètre de masse, CG-SM, QP 1000, Shimadzu; passeur automatique d'échantillon AOC-9, Shimadzu; système informatique pour le stockage et le traitement des données, ordinateur V 286 Victor relié à une imprimante KX-P 1083 Panasonic.

Matériels et réactifs

Bac d'extraction Vac-Elut; cartouches C_{18} , 500 mg de phase, 3 ml, Bond-Elut; thermobloc Gebr-Liebisch, Brackwede (R.F.A.); vortex Janke et Kunfel, IKA-Werk (R.F.A.); pH-mètre, PHN 75, Tacussel; méthanol, Uvasol, Merck; éthanol absolu, pro analysis, Merck; 2-propanol, pro analysis, Merck; eau pour préparations injectables, Aguettant; chloroforme, Spectrosol, SDS; acétate d'éthyle, Codex, Carlo Erba; TFA anhydride, Pierce; soude, R. P. Normapur, Prolabo; acide chlorhydrique, Rectapur, Prolabo; amphétamine sulfate, Rhone Poulenc; méthyl amphétamine hydrochloride, Delagrangé; phentermine base, Roussel Uclaf; clobenzorex hydrochloride, Roussel Uclaf; (\pm) éphédrine hydrochloride, Aldrich; fenfluramine hydrochloride, Servier; benfluorex hydrochloride, Servier; méfénorex hydrochloride, Roche; méthylphénidate hydrochloride, Ciba-Geigy; benzphétamine hydrochloride, Upjohn.

Les solutions mères sont préparées par dissolution du produit pur dans l'éthanol, sauf pour l'amphétamine qui est dissoute dans l'eau. Elles ont une concentration de 1000 mg de produit pur sous forme base par litre de solvant.

Conditions opératoires de la séparation par CG-SM

Chromatographie. Colonne "wide-bore" en verre, SPB-1, 30 m \times 0,75 mm I.D., 1,0 μ m d'épaisseur de film, Supelco; gaz vecteur hélium N 60, Air liquide; pression en tête de colonne: 0,25 bar; injecteur: mode splitless, 300°C; programmation des températures du four: 120°C pendant 4 min puis programmation de 20°C/min jusqu'à 260°C puis stable pendant 1 min; durée du cycle chromatographique: 20 min.

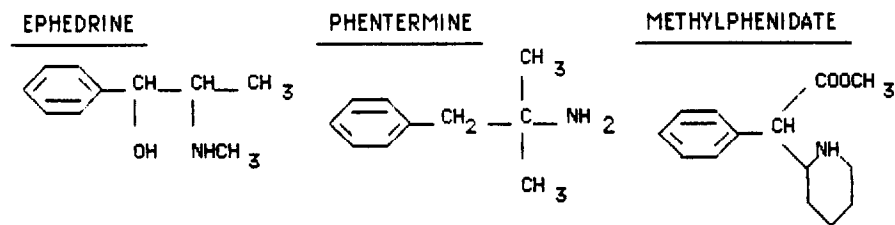
Injecteur automatique. Volume d'injection, 1 μ l.

Spectromètre de masse. Mode d'ionisation, impact électronique à 70 eV; filament, 60 μ A; température du séparateur, 280°C; température de la source, 250°C; gaz d'appoint, 20 ml/min; gain, 1750 V; gamme de balayage de 49 à 549 u.m.a. (vitesse de balayage de 1,1 s.).

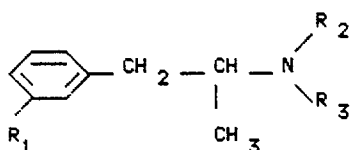
MISE AU POINT DE LA DÉRIVATION

Certaines amines sympathomimétiques possédant un groupement amine I ou amine II sont polaires (Tableau I). Cette polarité provoque un effet de traînée sur les tracés chromatographiques d'où un manque de résolution des pics. En transformant

TABLEAU I
STRUCTURE CHIMIQUE DES AMINES SYMPATHOMIMÉTIQUES



AMPHÉTAMINE ET DERIVÉS AMPHÉTAMINIQUES



Dénomination Commune Internationale	R ₁	R ₂	R ₃
Amphétamine	H	H	H
Fenfluramine	CF ₃	H	C ₂ H ₅
Benzphétamine	H	CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅
Méfénorex	H	H	(CH ₂) ₃ Cl
Clobenzorex	H	H	CH ₂ C ₆ H ₄ Cl
Benfluorex	CF ₃	H	(CH ₂) ₂ OCOC ₆ H ₅

ces amines I et II en amines III trifluorées, ce problème disparaît. L'agent de dérivation utilisé est le TFA [9].

Nous avons choisi le benfluorex (BFR) comme étalon pour la mise au point de la dérivation car il présente une structure chimique et un comportement chromatographique proche des amines sympathomimétiques, et il n'est pas dérivable.

Les différents essais de dérivation ont été réalisés avec des solutions de travail à 100 mg/l pour AM, PT, EPH, FFR, MF, CB et MPD, et à 250 mg/l pour BFR. Les solutions de travail sont préparées par dilution des solutions mères dans un volume approprié d'éthanol.

Quantité de réactif

Sur deux résidus secs A et B (A = AM, PT, EPH, FFR et BFR; B = MF, MPD, CB et BFR) ont été testées différentes quantités de TFA: 50, 100, 200 et 500 µl. Pour chaque quantité, deux essais ont été réalisés. Les variations des intensités relatives des pics chromatographiques sont sensiblement identiques (± 5% d'écart) quelque soit la quantité de TFA. Nous avons opté pour une quantité de TFA de 200 µl.

Température de dérivation

Les résidus secs A et B, après ajout du réactif de dérivation, ont été soumis à différentes températures: 55, 65, 75, 85, et 95°C. Deux essais ont été réalisés pour chaque température. Les réponses relatives sont plus importantes de 18 à 20% pour AM et PT, pour une température comprise entre 75 et 95°C. Pour les autres substances, les variations des intensités relatives des pics chromatographiques restent identiques: une variation de $\pm 3\%$ a été observée.

Temps de réaction

Nous avons testé les temps de contact: 5, 10, 15, 30 et 60 min sur les résidus A et B. Deux essais ont été faits pour chaque temps. Pour le temps 5 min, nous obtenons la meilleure réponse. La répétabilité de la dérivation dans les conditions suivantes —volume de réactif de 200 μl , température de 85°C et temps de contact de 5 min— donne des coefficients de variation allant de 5,4 à 9,2% sauf pour EPH pour laquelle il est de 11% (nombre d'essais égal à 6). Alors que pour un temps de 15 min [9], les coefficients de variation varient entre 2,5 et 5,6% (sauf pour EPH pour laquelle il est de 9,2%, pour un même nombre d'essais). Malgré une réponse inférieure de 13 à 28% à 15 min par rapport à 5 min, nous avons choisi le temps de contact de 15 min car nous avons une meilleure répétabilité de dérivation.

Donc, les conditions de dérivations sont: quantité de TFA, 200 μl ; température, 85°C; temps de réaction, 15 min.

MISE AU POINT DE L'EXTRACTION URINAIRE

Le screening est pratiqué en CG-SM, mode courant ionique total (TIC). Un logiciel de fragmentométrie a été utilisé pour l'intégration des pics. Nous avons utilisé le mode TIC et non la fragmentométrie de masse (SIM) car l'un des intérêts de ce screening est, d'une part, la détection rapide des amines sympathomimétiques, et d'autre part la future adaptation de cette méthode à beaucoup d'autres composés.

Un essai préliminaire, par injection des amines sympathomimétiques, a permis d'obtenir leurs spectres de masse (Figures 1 et 2). Le Tableau II regroupe les ions utilisés en fragmentométrie. La Figure 3 représente le fragmentogramme d'un extrait urinaire avec les ions principaux de chaque substance.

Choix de la technique d'extraction

Les techniques d'extraction liquide-liquide fréquemment employées [8,10,11] décrivent une méthodologie consommatrice de temps, de solvants et nécessitant des extractions multiples pour obtenir un rendement correct et des extraits débarrassés des impuretés.

Pour remédier à ces inconvénients, nous avons choisi l'extraction solide-liquide sur cartouche C_{18} . En effet, cette méthodologie présente les avantages suivants [12,13]: économie de solvants, rapidité de la manipulation, faibles volumes d'échantillons traités, taux de récupération élevés, et elle permet d'obtenir des extraits propres.

Description de notre technique

Nous avons utilisé des cartouches C_{18} à 500 mg de phase greffée. Un échantillon de 10 ml d'urine amené au pH désiré et contenant l'étalon interne fenfluramine (FFR)

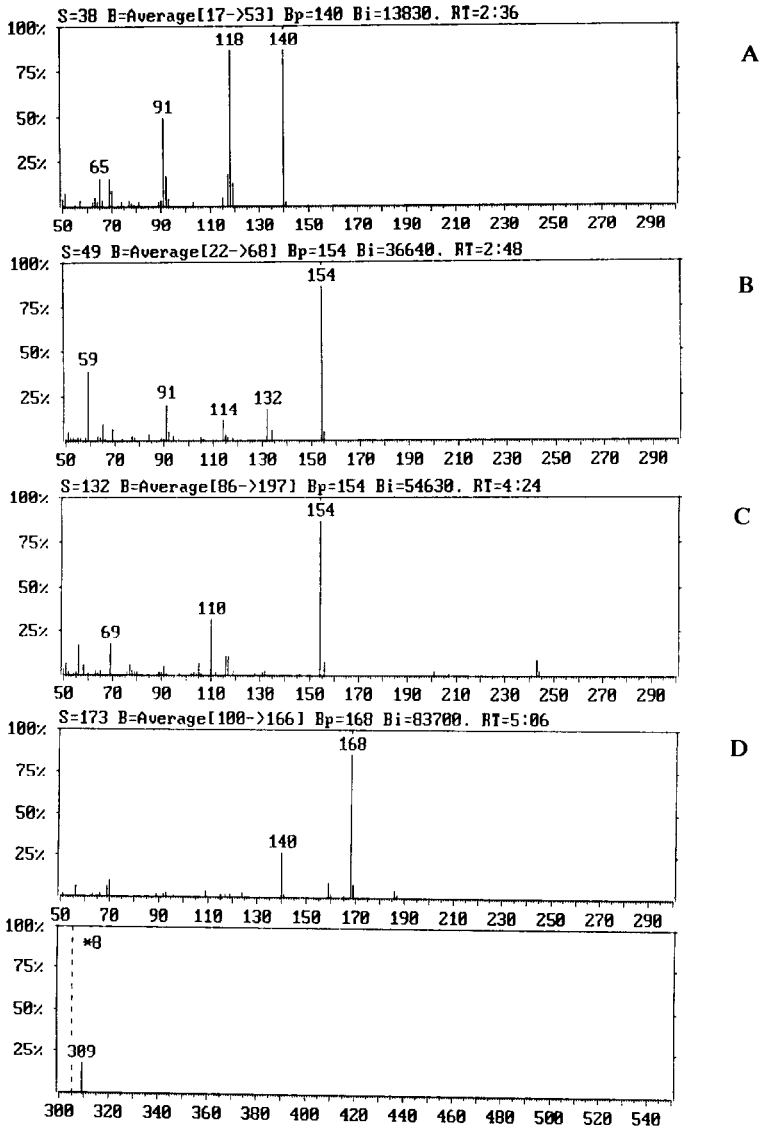


Fig. 1. Spectres de masse des amines sympathomimétiques (impact électronique:70 eV). (A) Amphétamine-TFA; (B) phentermine-TFA; (C) éphédrine; (D) fenfluramine-TFA.

a été passé goutte à goutte sur la colonne. Après rinçage de la colonne par 1 ml d'eau, l'éluant a été fait par divers mélanges chloroforme-isopropanol. Après évaporation de l'éluant sous courant d'azote à une température inférieure à 70°C, le résidu sec est dérivé par le TFA. Après évaporation du TFA sous courant d'azote à température ambiante, le résidu sec est repris par 300 μ l d'acétate d'éthyle. L'injection de 1 μ l dans le chromatographe a été faite par l'injecteur automatique.

Les différents paramètres de l'extraction sont testés dans les paragraphes

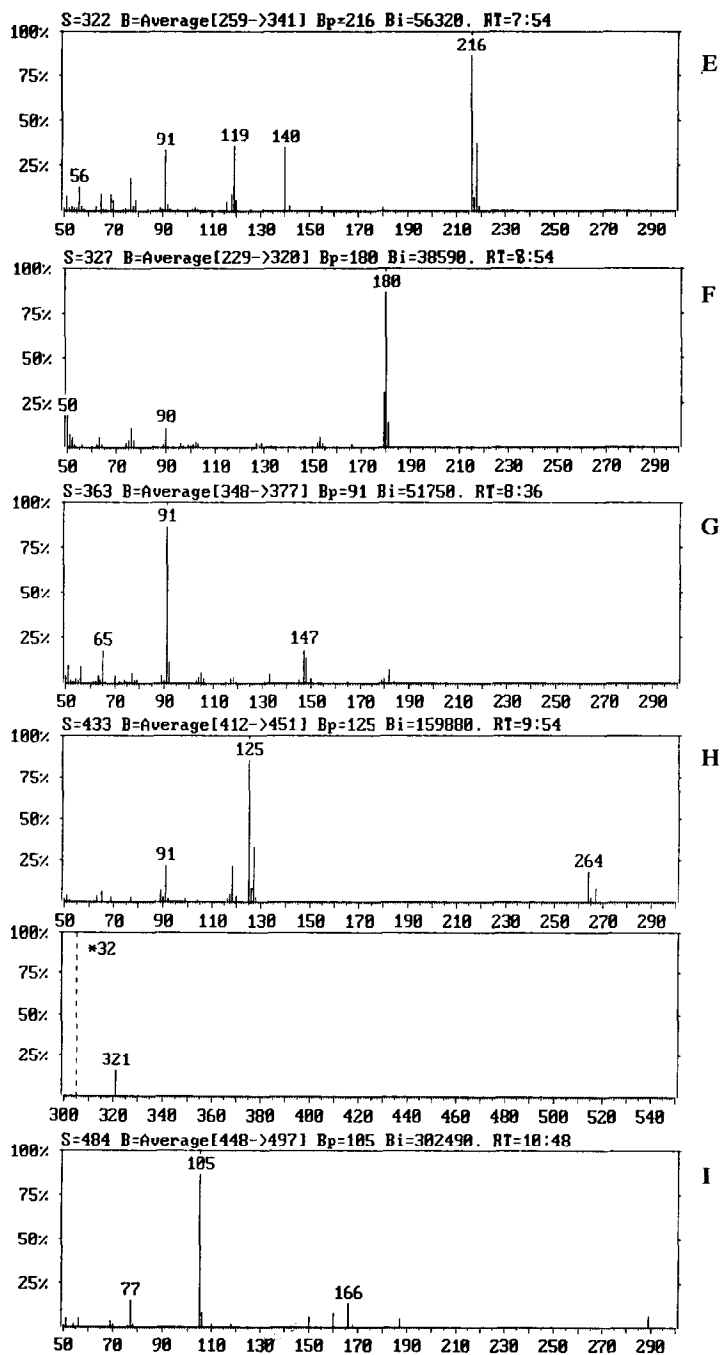


Fig. 2. Spectres de masse des amines sympathomimétiques (impact électronique: 70 eV). (E) Méfénorex TFA; (F) méthylphénidate-TFA; (G) benzphétamine; (H) clobenzorex-TFA; (I) benfluorex.

TABLEAU II
IONS UTILISÉS POUR LA FRAGMENTOMÉTRIE

Substances	Ions (m/z)
AM-TFA	140
PT-TFA	140
EPH-TFA	154
FFR-TFA	168
MF-TFA	216
MPD-TFA	180
CB-TFA	125
BM	91

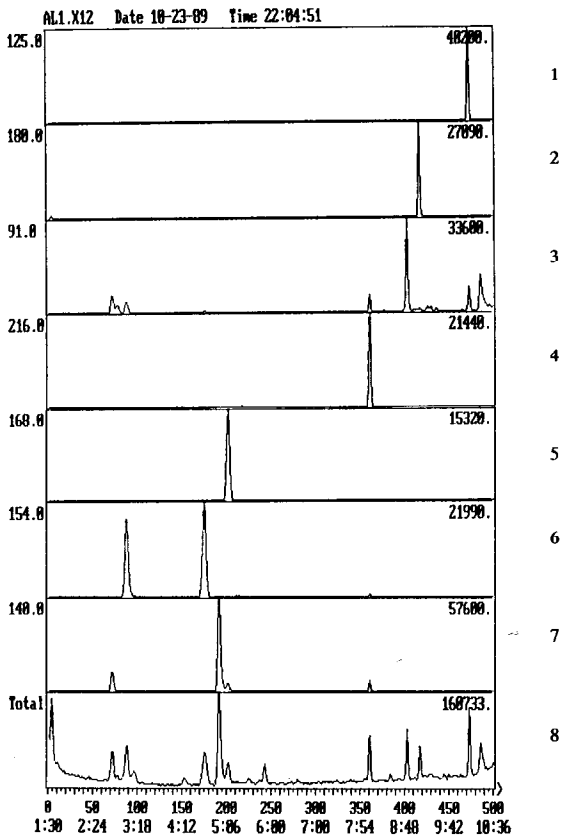


Fig. 3. Fragmentogramme d'un extrait urinaire, chargé en amines sympathomimétiques ($1 \mu\text{g/ml}$). 1 = Clobenzorex; 2 = méthylphénidate; 3 = benzphétamine; 4 = méfénorex; 5 = fenfluramine; 6 = phentérmine et éphédrine; 7 = amphétamine; 8 = courant ionique total du chromatogramme correspondant. Temps de rétention en min:s.

suiuants. Pour évaluer leur variabilité, la FFR est alors utilisée comme étalon externe; elle est introduite avant l'étape de dérivation.

Choix du solvant à pH fixe

Par transposition de l'extraction liquide-liquide [10] à l'extraction solide-liquide, nous avons testé différents mélanges de chloroforme-isopropanol.

Pour un volume de chloroforme 1,5 à 3,5 fois supérieur au volume d'isopropanol, la quantité de substance éluée reste constante.

Nous avons choisi le mélange de solvant chloroforme-isopropanol (3:2, v/v).

Volume de solvant nécessaire

Le volume de solvant, à pH 7, nécessaire pour une élution supérieure à 95% des amines sympathomimétiques, est de 3 ml.

Par mesure de sécurité, nous avons choisi un volume de 4 ml.

Influence du pH urinaire

Dans la gamme de pH testé, la Figure 4 montre que l'élution est la plus importante à pH 7 pour la majorité des substances.

Limite de quantification

La concentration minimale urinaire d'amines sympathomimétiques détectables en utilisant le TIC est de 200 ng/ml pour les substances dérivables et de 500 ng/ml pour les substances non dérivables.

Validation de la technique d'extraction

Pour la validation, nous avons effectué des essais de stabilité des amines sympathomimétiques dans l'urine, de reproductibilité et de rendement d'extraction.

Essai de stabilité des produits dans l'urine. Deux pools d'urines chargées P_1 (contenant AM, PT et BM) et P_2 (contenant EPH, MF, MPD et CB) ont été stockés à jour 0 (J_0) à + 4°C pendant 21 jours.

À J_0 , $J + 1$, $J + 7$, $J + 14$ et $J + 21$, deux aliquots de chaque pool sont prélevés et analysés.

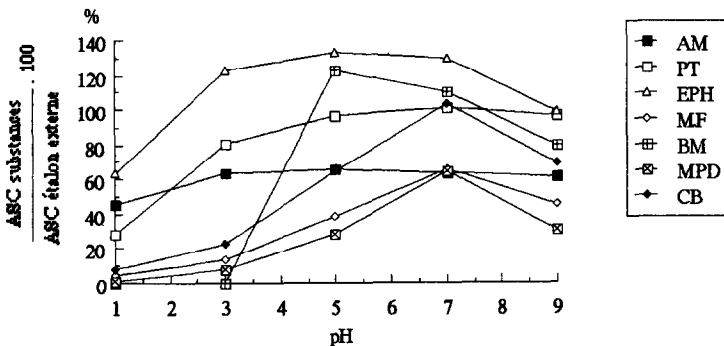


Fig. 4. Influence du pH sur l'extraction des amines sympathomimétiques.

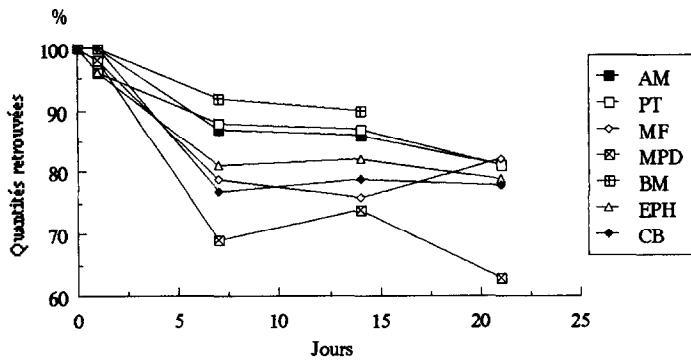


Fig. 5. Étude de la stabilité dans les urines des amines sympathomimétiques en fonction du temps à +4°C.

La Figure 5 montre la stabilité des produits sur 21 jours. Entre J + 1 et J + 7, nous constatons une diminution de la quantité de substance extraite puis une stabilisation des pourcentages extraits (pour BM, nous n'avons obtenu des résultats que sur 14 jours). Au vu de ces résultats, un stockage des échantillons urinaires à -20°C est préférable.

Essai de stabilité des extraits urinaires. Des extraits ont été conservés à température ambiante pendant trois jours. Pour les substances dérivées, nous obtenons le troisième jour une variation de $\pm 2\%$ de la réponse par rapport au premier jour. Pour la benzphétamine (non dérivable), nous obtenons une variation supérieure à $\pm 10\%$.

Reproductibilité de l'extraction. Elle a été testée sur trois jours à trois niveaux de concentration différents: le niveau bas qui correspond à la limite de quantification (Lq), le niveau moyen qui est égal à cinq fois Lq et le niveau haut qui vaut 50 fois Lq.

Sur ces trois jours, pour chacun des trois niveaux de concentration, nous avons extrait cinq aliquots. L'étalon interne (FFR) est ajouté à l'urine au moment de l'extraction. Le Tableau III donne les coefficients de variation obtenus sur l'ensemble

TABLEAU III

REPRODUCTIBILITÉ DE L'EXTRACTION

Les moyennes sont celles des rapports de surface des pics par rapport à l'étalon externe (FFR). C.V. = Coefficient de variation.

Drogue	Niveau					
	Bas		Moyen		Haut	
	\bar{x}	C.V. (%)	\bar{x}	C.V. (%)	\bar{x}	C.V. (%)
AM	66,25	9,7	62,55	3,9	56,82	4,0
PT	129,85	4,5	159,9	3,7	176,0	3,9
BM	92,45	10,6	109,3	9,2	172,9	7,7
EPH	136,1	6,7	127,0	4,8	160,4	5,6
MPD	111,1	4,7	88,6	8,9	125,2	5,5
MF	95,3	4,8	87,0	6,9	87,8	4,1
CB	140,2	4,6	142,8	4,7	151,0	4,8

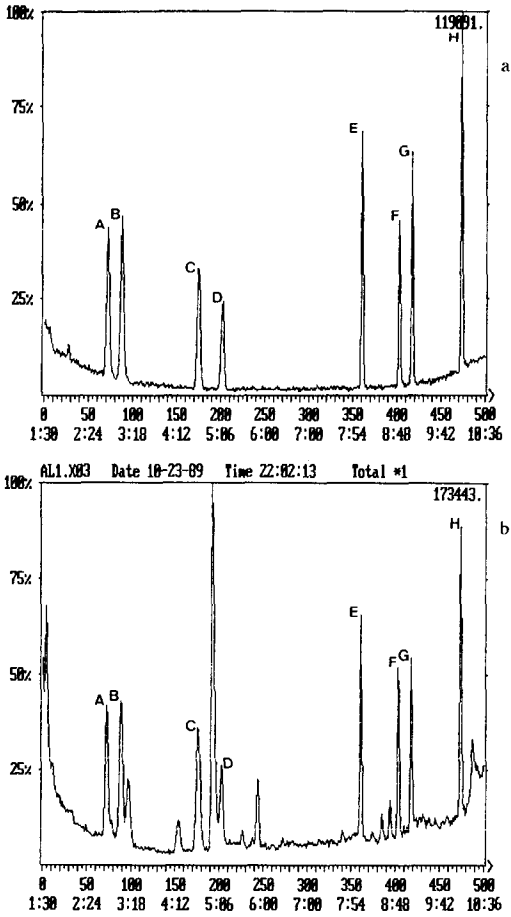


Fig. 6. Courants ioniques totaux d'amines sympathomimétiques (1 µg/ml). (a) Mélanges de solutions pures; (b) extrait urinaire. A = Amphétamine; B = phentermine; C = éphédrine; D = fenfluramine; E = méfénorex; F = benzphétamine; G = méthylphénidate; H = clobenzorex. Temps de rétention en min:s.

TABLEAU IV
RENDEMENT D'EXTRACTION

Drogue	Rendement (%; $n = 5$)
AM	101 ± 4,1
PT	99 ± 3,9
EPH ^a	97 ± 3,0
MF	101 ± 7,2
BM	108 ± 10,0
MPD	95 ± 8,9
CB	102 ± 5,2

^a Nombre d'essais = 2.

des trois jours et pour chaque niveau. La Figure 6a montre le courant ionique total obtenu à partir d'un mélange de solutions pures, alors que la Figure 6b montre celui d'un extrait urinaire pour une quantité injectée équivalente.

Rendement ou taux de récupération. Les essais de rendement ont été faits sur l'ensemble des substances pour une concentration urinaire de 1 $\mu\text{g/ml}$. Les résultats sont consignés dans le Tableau IV.

CONCLUSION

L'extraction des urines sur cartouche C_{18} suivie d'une acétylation et d'une analyse par CG-SM permet un screening rapide et fiable des amines sympathomimétiques.

Après administration orale, 30 à 80% de la dose sont éliminés dans les urines de 24 h sous forme inchangée [14-16]. Les limites de quantification obtenues par notre méthode correspondent à une prise orale minimale par jour de 10 mg pour les substances dérivables et de 25 mg pour les drogues non dérivables, ce qui correspond aux limites basses des posologies thérapeutiques [17].

Par conséquent, la technique peut servir au dosage des amines sympathomimétiques dans les liquides biologiques.

Nous proposons de l'utiliser comme technique de contrôle antidopage chez les sportifs et pour la surveillance des drogués.

REMERCIEMENTS

Nous remercions tout particulièrement les laboratoires Rhône-Poulenc, Dela-grange, Roussel Uclaf, Aldrich, Servier, Roche, Ciba-Geigy et Upjohn pour la fourniture des amines sympathomimétiques étalon.

RÉSUMÉ

Une technique rapide, sensible, spécifique et fiable d'extraction et de détection des amines sympathomimétiques dans les urines, utilisant la CG-SM, est décrite.

Après ajustement du pH urinaire à 7 et addition de l'étalon interne (fenfluramine), l'amphétamine, la phentermine, l'éphédrine, le méfénorex, le méthylphénidate, la benzphétamine et le clobenzorex sont extraits sur cartouche C_{18} par un mélange chloroforme-isopropanol. Le solvant organique est évaporé. Les drogues sont dérivées par l'anhydride trifluoro acétique (TFA), qui est ensuite évaporé. L'extrait final est repris dans l'acétate d'éthyle et injecté en CG-SM.

Les drogues sont identifiées par leur temps de rétention relatif et leur spectre de masse. La limite de quantification est de 200 ng/ml pour les substances dérivables et de 500 ng/ml pour celles qui ne le sont pas.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. P. Rapp, *Le Dopage des Sportifs*, Éditions Médicales et Universitaires, Paris, 1977, pp. 24-42.
- 2 E. C. Klatt, S. Montgomery, T. Namiki et T. T. Noguchi, *Clin. Toxicol.*, 24 (1986) 441.
- 3 D. N. Bailey, *Clin. Toxicol.*, 25 (1987) 399.
- 4 P. A. Mason, T. S. Bal, B. Law et A. C. Moffat, *Analyst*, 108 (1983) 603.

- 5 Y. H. Caplan, B. Levine et B. Golberger, *Clin. Chem.*, 33 (1987) 1200.
- 6 B. A. O'Brien, J. M. Bonicamp et D. W. Jones, *J. Anal. Toxicol.*, 6 (1982) 143.
- 7 D. Fretthold, P. Jones, G. Sebrosky et I. Sunshine, *J. Anal. Toxicol.*, 10 (1986) 10.
- 8 B. Kinberger, A. Holmen et P. Wahrgren, *J. Chromatogr.*, 207 (1981) 148.
- 9 D. H. Catlin, R. C. Kammerer, C. K. Hatton, M. H. Sekera et J. L. Merdink, *Clin. Chem.*, 33 (1987) 319.
- 10 V. Aggarwal, R. Bath et I. Sunshine, *Clin. Chem.*, 20 (1974) 307.
- 11 S. J. Mule et G. A. Casella, *J. Anal. Toxicol.*, 12 (1988) 102.
- 12 H. Sekine et Y. Nakahara, *Bunseki Kagaku*, 32 (1983) 453.
- 13 R. W. Taylor, S. D. Le, S. Philip et N. C. Jain, *J. Anal. Toxicol.*, 13 (1989) 293.
- 14 L. G. Dring, R. L. Smith et R. T. Williams, *J. Pharm. Pharmacol.*, 18 (1966) 402.
- 15 A. H. Beckett et G. R. Wilkinson, *J. Pharm. Pharmacol.*, 17 Suppl. (1965) 1075.
- 16 A. H. Beckett et M. Rowland, *J. Pharm. Pharmacol.*, 17 Suppl. (1965) 1095.
- 17 *AHFS Drug Information*, American Society of Hospital Pharmacists, Bethesda, MD, 1989.