

Lettre à la rédaction : Attention : faux positifs en GC-MS

Be carefull for false positive results by GC-MS

**Marion VILLAIN*, Véronique DUMESTRE, Vincent CIRIMELE,
Bertrand LUDES, Pascal KINTZ**

Institut de Médecine Légale, 11, rue Humann - 67000 STRASBOURG - FRANCE

* Auteur à qui adresser la correspondance : Marion VILLAIN, Laboratoire de Toxicologie,
Institut de Médecine Légale, 11, rue Humann - 67000 STRASBOURG
Tél : 03 90 24 33 56 - E-mail : marion.villain@netcourrier.com

(Reçu le 28 octobre 2002 ; accepté le 14 novembre 2002)

Les anabolisants sont des dérivés naturels ou de synthèse de la testostérone, utilisés à des fins médicales en cas de déficience en testostérone ou dans le traitement de certaines formes de cancers chez la femme (1).

Parmi l'arsenal des substances dopantes, les agents anabolisants ont une place prépondérante. Ils sont utilisés pour augmenter la masse musculaire, favoriser la récupération physique et également réparer les micro-traumatismes (1). Leur utilisation dans les milieux sportifs remonte aux années 50 et c'est en 1974 que les stéroïdes anabolisants ont été ajoutés à la liste des produits dopants interdits par le CIO.

Lors des contrôles anti-dopage, l'analyse des cheveux peut se révéler être un excellent complément aux tests urinaires classiques (2).

Dans une affaire judiciaire devenue médiatique au mois

d'août 2002, plusieurs mèches de cheveux d'un sportif suspecté de consommer de la méthandiénone ont été prélevés et envoyés au laboratoire de toxicologie de l'institut de médecine légale de Strasbourg, pour analyse. Comme c'est la règle dans ce laboratoire en matière de dopage, les analyses ont d'abord été réalisées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, puis, par spectrométrie de masse en tandem, pour confirmation.

Les cheveux ont été extraits selon la méthode standard suivante (3) :

- Décontamination des cheveux dans deux bains successifs de 2 minutes de dichlorométhane
- Incubation de 100 mg de cheveux dans 1 ml NaOH 1M (15 minutes à 95° C) en présence de 1 ng de testostérone-d₃, utilisée comme standard interne

- Neutralisation avec 1 ml HCl 1M et 2 ml de tampon phosphate 0,2M (pH 7)

- Extractions successives :

• en phase solide : colonne Isolute C18 conditionnée avec 3 ml de méthanol et 2 ml d'eau bidistillée, dépôt de l'échantillon et élution fractionnée avec 3 fois

0,5 ml de méthanol, après 2 lavages avec 1 ml d'eau bidistillée et séchage des colonnes sous vide pendant 1 heure

• liquide/liquide : résidu sec, additionné de 100 mg Na₂CO₃/NaHCO₃ (1/10 ; w/w), repris dans 1 ml de tampon phosphate 0,2M (pH 7) et 2 ml de pentane

- Agitation, centrifugation et évaporation de la phase organique

-Dérivation avec 50 µl MSTFA/NH₄I/2-Mercaptoéthanol (1000/2/5 ; v/v/v), 20 minutes à 60° C

Les analyses chromatographiques ont été réalisées selon les 2 procédures suivantes :

GC-MS (6890 HP, 5973 HP)

Injection pulsée de 4 µl en mode splitless

Injecteur : 270° C

Four : 150° C, 1 min

rampe de 30° C/min

295° C, 10 min

Colonne : HP 5MS (30 m ; 0,25 mm I.D. ; 0,25 µm d'épaisseur de film)

Gaz vecteur : hélium (1 ml/min à débit constant)

Acquisition en mode SIM, IE

eM + 600V

Testostérone- d₃ (m/z : 435)

Méthandiénone (m/z : 444, 339, 206)

GC-MS/MS (5890 HP, TSQ700 FINNIGAN)

Injection 2 µl en mode splitless

Injecteur : 270° C

Four : 100° C, 1 min

rampe de 30° C/min

295° C, 5 min

Colonne : HP 5MS (30 m ; 0,25 mm I.D. ; 0,25 µm d'épaisseur de film)

Gaz vecteur : hélium (1 ml/min)

Acquisition en mode SRM, IE

eM : 1900V

Collision offset : -5V

Testostérone- d₃ (m/z : 435 → 209)

Méthandiénone (m/z : 444 → 339 et 206)

Les ions parents (444, 435) sont sélectionnés dans le premier quadripôle ; les ions fils correspondants (339, 206, 209) sont sélectionnés dans le troisième quadripôle, après collision avec l'argon (0,6 mT).

Résultats

L'analyse a été réalisée sur 100 mg de cheveux, longs de 2 cm.

Le chromatogramme obtenu en GC-MS (figures 1 et 2) peut être interprété comme positif pour la méthandiénone. En effet, on observe un pic au temps de rétention de la méthandiénone, de fragmentation identique, superposable à celui de l'échantillon surchargé.

La quantification contre la testostérone-d₃ nous donne une concentration apparente de 22 ng/mg.

L'analyse du même extrait en GC-MS-MS conduit à un chromatogramme plat pour la méthandiénone (figures 3 et 4).

Ce résultat est non équivoque et montre les limites de la GC-MS en infirmant un résultat positif.

La GC-MS-MS apparaît ici comme un outil indispensable, d'une spécificité absolue correspondant aux standards chromatographiques demandés par le Code Médical du Comité International Olympique pour toute confirmation urinaire.

Références

1. Steven B. Karch, M.D. Karch's Pathology of Drug Abuse. CRC Press, 2002 ; 7 : 481-500.
2. Kintz P. Quelle place pour les cheveux dans la lutte contre le dopage ? Ann. Toxicol Anal. 2002 ; 12 : 49-55.
3. Kintz P., Cirimele V., Dumestre-Toulet V., Villain M., Ludes B. Doping control for methenolone using hair analysis by gas chromatography - tandem spectrometry. J. Chromatogr. B ; 2002 ; 766 : 161-7.

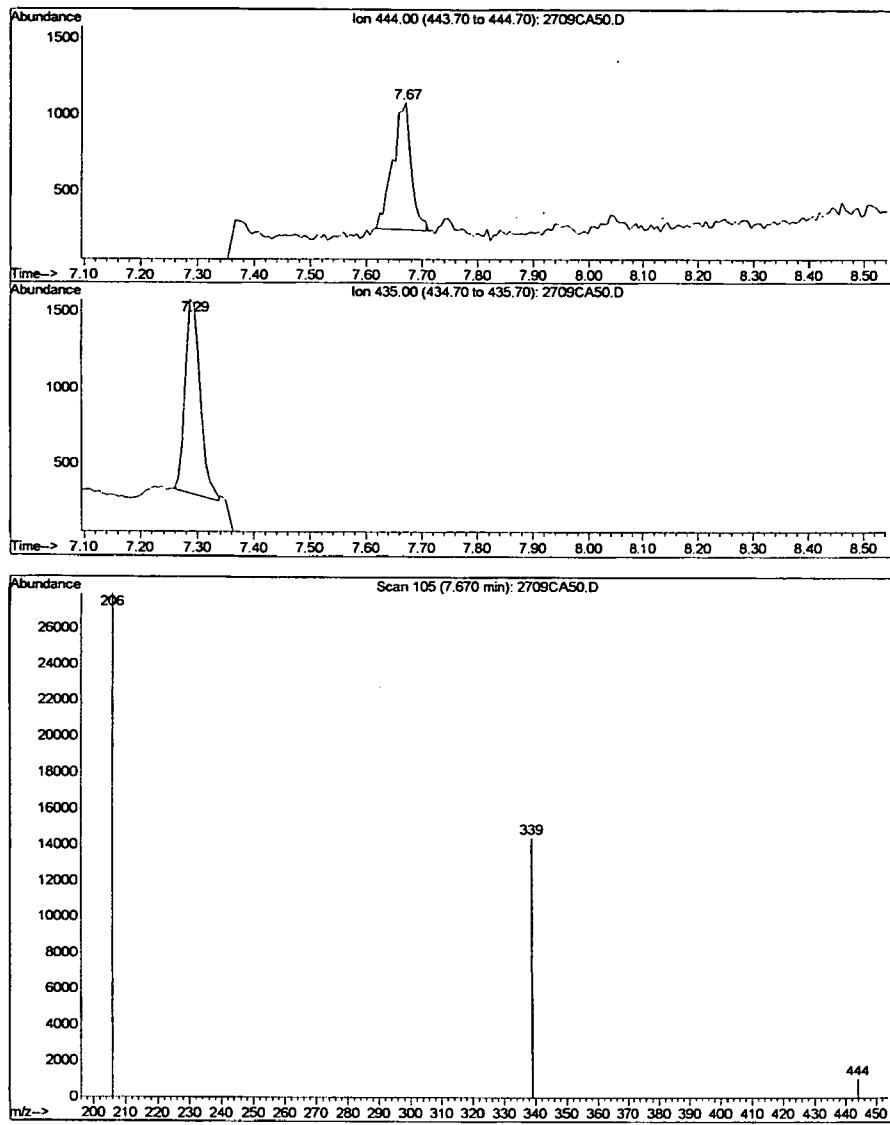


Figure 1 : Chromatogramme et impact électronique en GC/MS d'un échantillon de cheveux négatif surchargé à 50 pg/mg de méthandiénone.

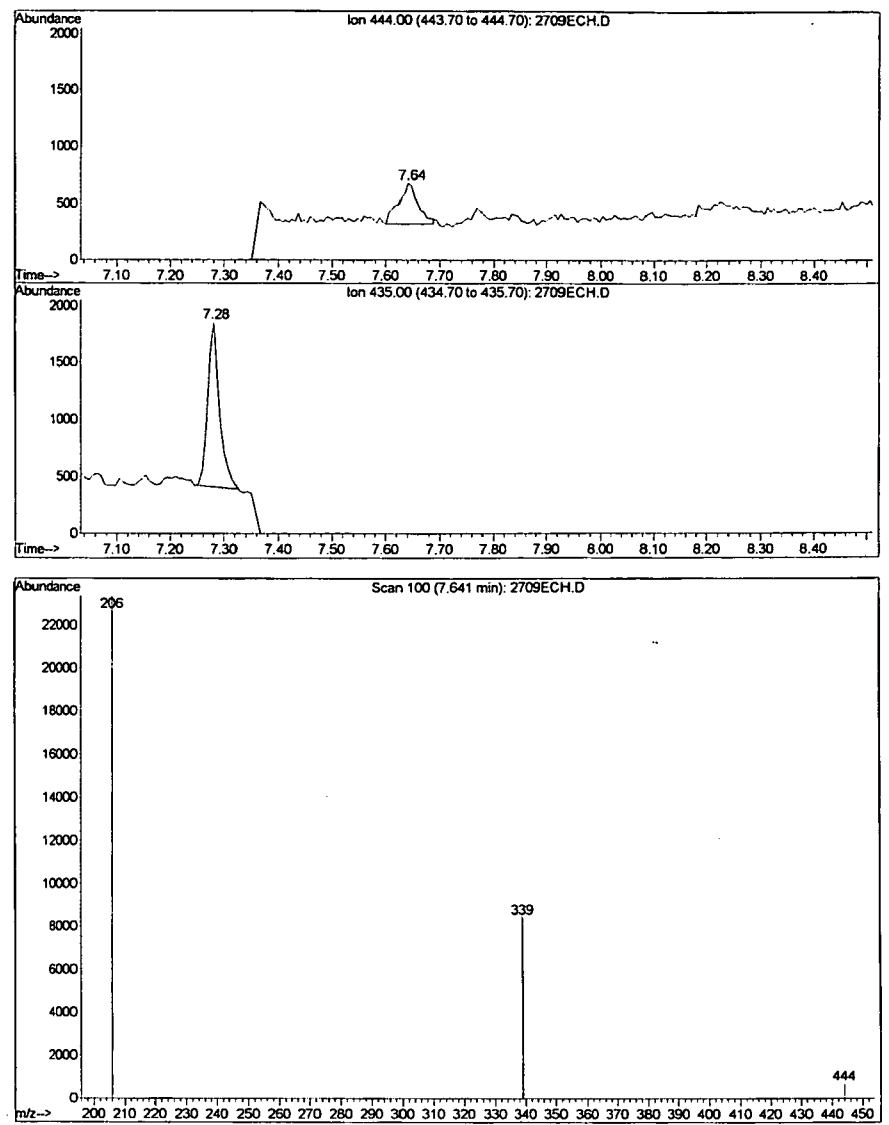


Figure 2 : Chromatogramme et impact électronique en GC/MS d'un échantillon de cheveux du sportif avec une réponse apparente à 22 pg/mg de méthandiénone.

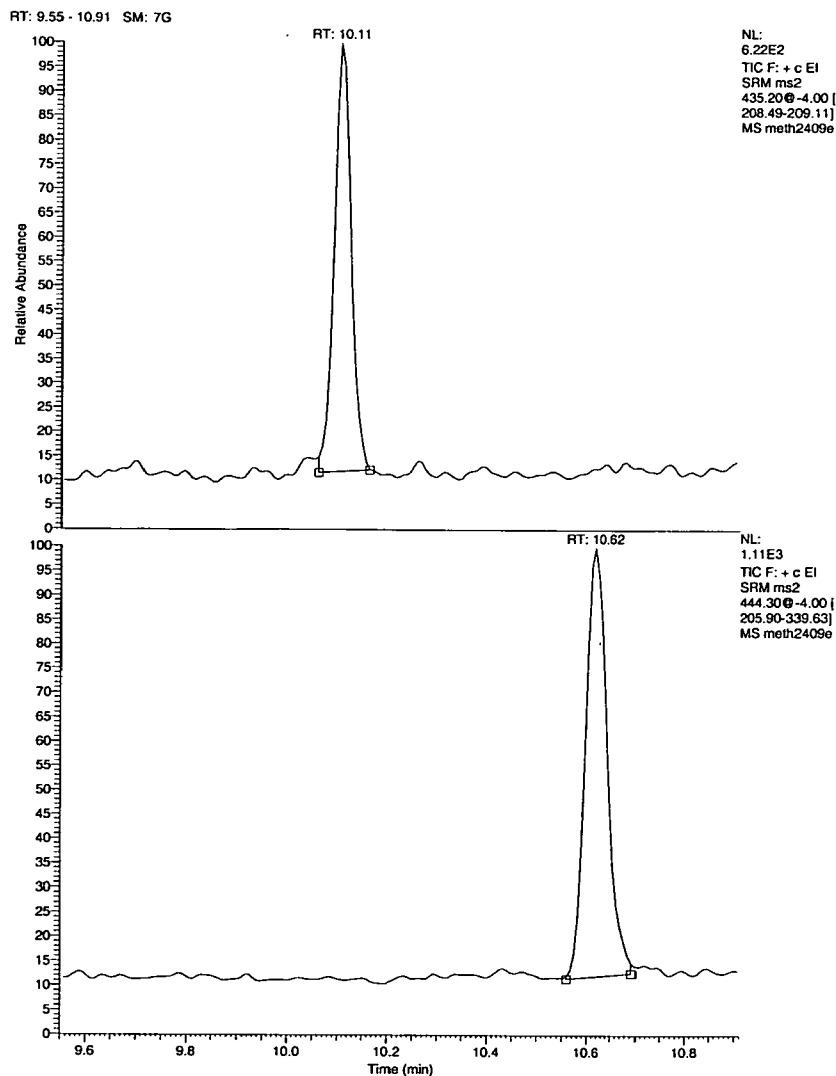


Figure 3 : Chromatogramme en GC/MS/MS d'un échantillon de cheveux négatif surchargé à 50 pg/mg de méthandiénone.

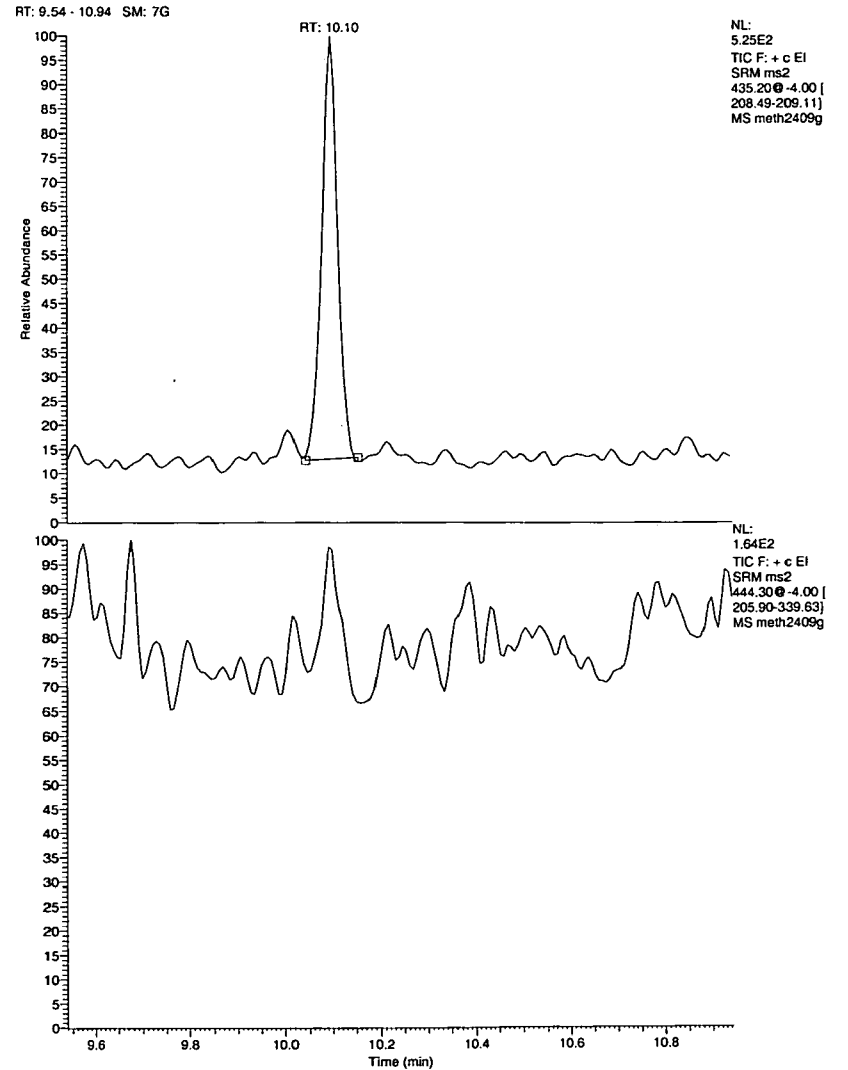


Figure 4 : Chromatogramme en GC/MS/MS de l'échantillon de cheveux du sportif, négatif pour la méthandiénone.