

Identification de la prednisone et de la méthylprednisolone dans les cheveux par HPLC-ES-MS

Identification of prednisone and methylprednisolone in human hair by HPLC-ES-MS

Vincent CIRIMELE⁽¹⁾, Pascal KINTZ⁽¹⁾, Jean-Pierre GOULLÉ⁽²⁾, Bertrand LUDES⁽¹⁾

(1) Institut de Médecine Légale, 11, rue Humann - F-67085 STRASBOURG France

(2) Laboratoire de Biochimie - BP 24 - F-76083 LE HAVRE France

(Reçu le 15 juin 2000 ; accepté le 5 septembre 2000)

RÉSUMÉ

Cet article décrit une méthode de dosage de la prednisone et de la méthylprednisolone par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse par une interface de type electrospray. Les cheveux ont été prélevés chez 11 patients sous corticothérapie après avoir obtenu leur consentement oral. Dans la majorité des cas, ce traitement faisait suite à une greffe. Les cheveux ont été préalablement lavés par deux bains successifs de dichlorométhane et réduits en poudre dans un broyeur à boulet. La solubilisation des composés a été réalisée par incubation de 100 mg de poudre de cheveux dans du tampon Soerensen (16h à 40° C) en présence de 50 ng de cortisol-d₃ utilisé en temps qu'étalon interne. La purification a été réalisée sur cartouches Isolute C18 suivie d'une extraction liquide-liquide par de l'éther à pH alcalin. La phase organique finale a été évaporée puis l'extrait sec repris dans 30 µl de méthanol. La séparation chromatographique des composés a été réalisée sur une colonne Novapak C18 à l'aide d'un gradient d'acétonitrile de 20 à 60 % en 4 min. Le détecteur utilisé était un spectromètre de masse Perkin Elmer Sciex API 100. La réponse du détecteur était linéaire pour des concentrations de prednisone et de méthylprednisolone variant de 20 à 2000 pg/mg. Les rendements d'extraction pour des cheveux surchargés en corticostéroïdes à la concentration finale de 250 pg/mg étaient de 70 % pour la prednisone et 75 % pour

SUMMARY

This paper describes a screening procedure based upon high-performance liquid chromatography / electrospray / mass spectrometry for the identification and quantification of prednisone and methylprednisolone in human hair. Hair specimens were obtained from 11 patients under corticosteroids treatment after verbal consent. Hair strands were washed in methylene chloride, pulverized in a ball mill and 100 mg of the powdered hair were incubated in 1 ml Soerensen buffer, pH 7.6 for 16 h at 40 °C, in presence of 50 ng cortisol-d₃ used as internal standard. Purification of the incubation medium was achieved on SPE C18 Isolute extraction columns followed by an alkaline liquid-liquid extraction with diethylether. The eluate was evaporated to dryness and resuspended in 30 µl of methanol. The chromatography was operated on a Novapak C18 column using a linear gradient of acetonitrile from 20 to 60 % in 4 min. The detector was a Perkin Elmer Sciex API 100 mass spectrometer. The detector response was linear for prednisone and methylprednisolone concentrations ranging from 20 to 2000 pg/mg. Extraction recovery at 250 pg/mg was 70 % for prednisone and 75 % for methylprednisolone. Repeatability (CV values) at 250 pg/mg were 8 and 12 % for prednisone and methylprednisolone, respectively. The limits of detection, calculated for a signal to noise ratio of 2, were 15 and 10 pg/mg for predni-

la méthylprednisolone. A cette même concentration, la répétabilité intra-jour était de 8 % pour la prednisone et 12 % pour la méthylprednisolone. Les limites de détection, déterminées pour un rapport signal/bruit de fond équivalent à 2, étaient de 15 pg/mg pour la prednisone et 10 pg/mg pour la méthylprednisolone. Lors de cette étude, la prednisone a pu être identifiée dans les cheveux de 9 patients sur 10 traités par Cortancyl® (30 à 130 pg/mg, moyenne 65 pg/mg). La méthylprednisolone a pu être dosée (15 pg/mg) dans les cheveux de l'unique patient traité par Médrol®.

MOTS-CLÉS

Corticostéroïdes, cheveux, HPLC/MS, suivi, dopage.

Introduction

Les corticostéroïdes naturels et de synthèse sont largement utilisés en milieu médical pour leurs propriétés anti-inflammatoires. Ils peuvent être administrés suite à une greffe ou pour traiter une ostéoporose, une néphropathie ou encore une glomérulonéphrite. Lorsqu'ils sont administrés par voie systémique, ils influencent la production naturelle de corticostéroïdes de l'organisme. Différents procédés analytiques ont été publiés à ce jour pour le dosage des corticostéroïdes dans les fluides biologiques comme les tests radio-immunologiques (1), la chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec détection spectrophotométrique (2), la chromatographie en phase gazeuse (GC) (3) et la chromatographie (HPLC ou GC) couplée à la spectrométrie de masse (MS) (4, 5). Le sang et les urines sont généralement analysés pour déterminer la prise d'un médicament, mais l'élimination de ces substances intervient en quelques heures pour le sang et en quelques jours pour les urines (7 jours pour l'acétonide de triamcinolone). Par contre, la recherche au niveau des phanères tels que les cheveux permet de suivre une administration prolongée sur plusieurs mois (en fonction de la longueur de la mèche de cheveux analysée) et donc de mettre en évidence une exposition répétée (6). Ce moyen d'investigation peut se révéler intéressant pour le suivi des patients sous corticothérapie pour deux raisons essentielles : ces substances sont souvent prescrites à long terme pour traiter des maladies chroniques et leurs nombreux effets secondaires conduisent souvent à un mauvais suivi du traitement prescrit.

Dans le monde du sport, l'utilisation des corticostéroïdes pour leurs propriétés anti-inflammatoires et régénératrices des microtraumatismes cellulaires a conduit la commission médicale du Comité International Olympique à les classer dans la liste des substances dopantes soumises à restrictions. En effet, l'utilisation des corticostéroïdes est interdite, excepté pour usage local, par inhalation et par injection intra-

sone and methylprednisolone, respectively. In the presented study, prednisone was identified in the hair of 9/10 patients treated by Cortancyl® (30 à 130 pg/mg, mean 65 pg/mg). Methylprednisolone was detected (15 pg/mg) in the hair specimen obtained from the unique patient treated with Medrol®.

KEY-WORDS

Corticosteroids, hair, HPLC/MS, monitoring, doping.

articulaire ou locale, à condition de produire une ordonnance médicale avant la compétition (7). Dans le cadre de la protection de la santé des sportifs (suivi longitudinal), l'usage chronique de ces substances immunosuppressives ne peut être mis en évidence par une analyse urinaire. Par contre, le cheveu possède la propriété unique d'être le marqueur des expositions répétées ou chroniques, permettant en outre d'établir le profil de consommation à long terme et son évolution. L'analyse des cheveux permettra d'augmenter la fenêtre de détection des corticostéroïdes et de faire la différence entre usage unique et abus chronique ou de mettre en évidence un dopage hors compétition.

Les premiers travaux concernant le dosage des corticostéroïdes dans les cheveux ont été récemment publiés (8-11). Ces substances rejoignent donc la longue liste des molécules incorporées dans les cheveux, mais le faible nombre d'échantillons positifs recensé ne permet pas de préjuger de la sensibilité des techniques mises au point.

Cette étude rapporte le développement d'une nouvelle méthode pour le dosage de certains corticostéroïdes dans les cheveux.

Matériel et méthodes

Réactifs

Le dichlorométhane, l'acétone, l'hexane, l'acétonitrile, l'éther diéthylique et le méthanol (MeOH) étaient de qualité HPLC (Merck, Allemagne). L'acide formique (HCOOH) était de qualité Normatom (Prolabo, France) et le formiate d'ammonium (NH₄COOH) de qualité analytique (Fluka, Allemagne).

La prednisolone et la méthylprednisolone ont été achetées chez Sigma (France). L'analogue deutéré du cortisol (cortisol-d₃) a été acheté chez Cambridge Isotope Laboratories (CIL, USA).

Les colonnes Isolute C18 provenaient de chez Touzart et Matignon (France).

Préparation des solutions

Le tampon Soerensen a été préparé en ajoutant 38,8 ml de tampon KH_2PO_4 (9,07 g/l) à 61,2 ml de tampon Na_2HPO_4 (11,87 g/l). La valeur du pH a été ajustée à 7,6.

Le tampon de la phase mobile était constitué d'une solution 2mM de NH_4COOH ajustée à un pH de 3 avec HCOOH .

Les solutions de prednisone et de méthylprednisolone ont été préparées aux concentrations finales de 10, 1 et 0,1 mg/L dans du méthanol. La solution méthanolique de cortisol- d_3 a été préparée à la concentration finale de 1 mg/L.

Prélèvements

Les échantillons de cheveux ont été prélevés chez 11 patients sous corticothérapie après avoir obtenu leur consentement oral. Dans la majorité des cas, ce traitement faisait suite à une greffe ou pour traiter une ostéoporose, une néphropathie ou encore une glomérulonéphrite. Pour chacun d'entre eux, une mèche de cheveux de la région occipitale a été cerclée par une cordelette, coupée le plus près possible du cuir chevelu et stockée dans une enveloppe à température ambiante.

Avant l'analyse, les cheveux ont été lavés dans deux bains successifs de dichlorométhane (5 ml, 2 min à température ambiante) puis réduits en poudre dans un broyeur à boulet (Retsch, type MM2, Allemagne).

Extraction

Dans chaque cas, environ 100 mg de poudre de cheveux ont été incubés dans 1 ml de tampon Soerensen (16 h à 40° C) en présence de 50 ng d'étalon interne, le cortisol- d_3 . La purification des substances a été réalisée sur colonne Isolute C18 : le milieu d'incubation a été déposé sur les colonnes activées (méthanol et eau bidistillée), puis rincé successivement par 1 ml du mélange acétone/eau bidistillée (2:8, v/v), 1 ml d'eau bidistillée, et finalement 1 ml d'hexane. Après séchage des colonnes (30 min), les corticostéroïdes ont été élués par 3 volumes (0,5 ml) successifs de MeOH. L'éluat a été évaporé sous azote et le résidu sec repris par 0,5 ml de soude 0,2N pour être ré-extrait par 3 ml d'éther diéthylique. Après agitation et centrifugation, la phase organique finale a été évaporée et l'extrait repris par 30 μl de MeOH.

Conditions d'analyse

Une fraction de 2 μl a été injectée dans la colonne chromatographique (Waters, 4- μm Novapak C18, 150 x 2 mm) protégée par une pré-colonne (5 μm Opti-Guard

C18, 15 x 1 mm). La séparation a été obtenue à l'aide d'une phase mobile composée d'acétonitrile et de tampon NH_4COOH 2 mM pH 3. Le gradient linéaire d'acétonitrile (20 to 60 % en 4 min) était généré par une pompe HPLC (Applied Biosystems, Modèle 140B) au débit de 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. Un diviseur post-colonne (1:3) a permis d'infuser un débit optimal de 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ au niveau de l'interface.

La détection a été réalisée par un spectromètre de masse Perkin Elmer Sciex API 100. L'azote (degré de pureté 99.95 %) a été utilisé comme gaz nébuliseur. La tension d'orifice a été optimisée et fixée à la valeur +20V pour la détection des fragments positifs. L'acquisition a été réalisée en mode sélection d'ions (m/z : prednisone 359, méthylprednisolone 375, cortisol- d_3 366).

Paramètres de validation

Les courbes de calibration ont été obtenues après extraction, par le procédé établi, de 100 mg de poudre de cheveux témoins (négatifs pour les corticostéroïdes) additionnés de prednisone et de méthylprednisolone aux concentrations finales de 20 ; 50 ; 250 ; 1000 et 2000 pg/mg. La répétabilité intra-jour ($n=8$) et le rendement d'extraction ont été déterminés à la concentration finale de 250 pg/mg pour les deux corticostéroïdes. Les limites de détection pour les deux molécules ont été obtenues en abaissant leur concentration finale jusqu'à obtenir un rapport signal/bruit de fond égal à 2.

Tous ces paramètres de validation ont été déterminés après ajout de 50 ng de cortisol- d_3 et extraction par le procédé établi.

Résultats

Validation

Dans les conditions opératoires décrites, il n'a pas été noté une quelconque interférence des constituants du cheveu avec les substances recherchées ou l'étalon interne. Les chromatogrammes en mode sélection d'ions de la figure 1 ont été obtenus par le même procédé d'extraction et de purification mais avec 2 milieux d'incubation différents. En haut, le cas d'un échantillon de cheveu positif pour la prednisone à la concentration de 1,28 ng/mg après incubation de la poudre de cheveux homogénéisée dans du tampon Soerensen. En bas, le même échantillon incubé dans du méthanol (prednisone : 0,32 ng/mg). En accord avec les données de la littérature (12), les solutions aqueuses solubilisent les xénobiotiques incorporés dans les cheveux avec un meilleur rendement que les solvants organiques.

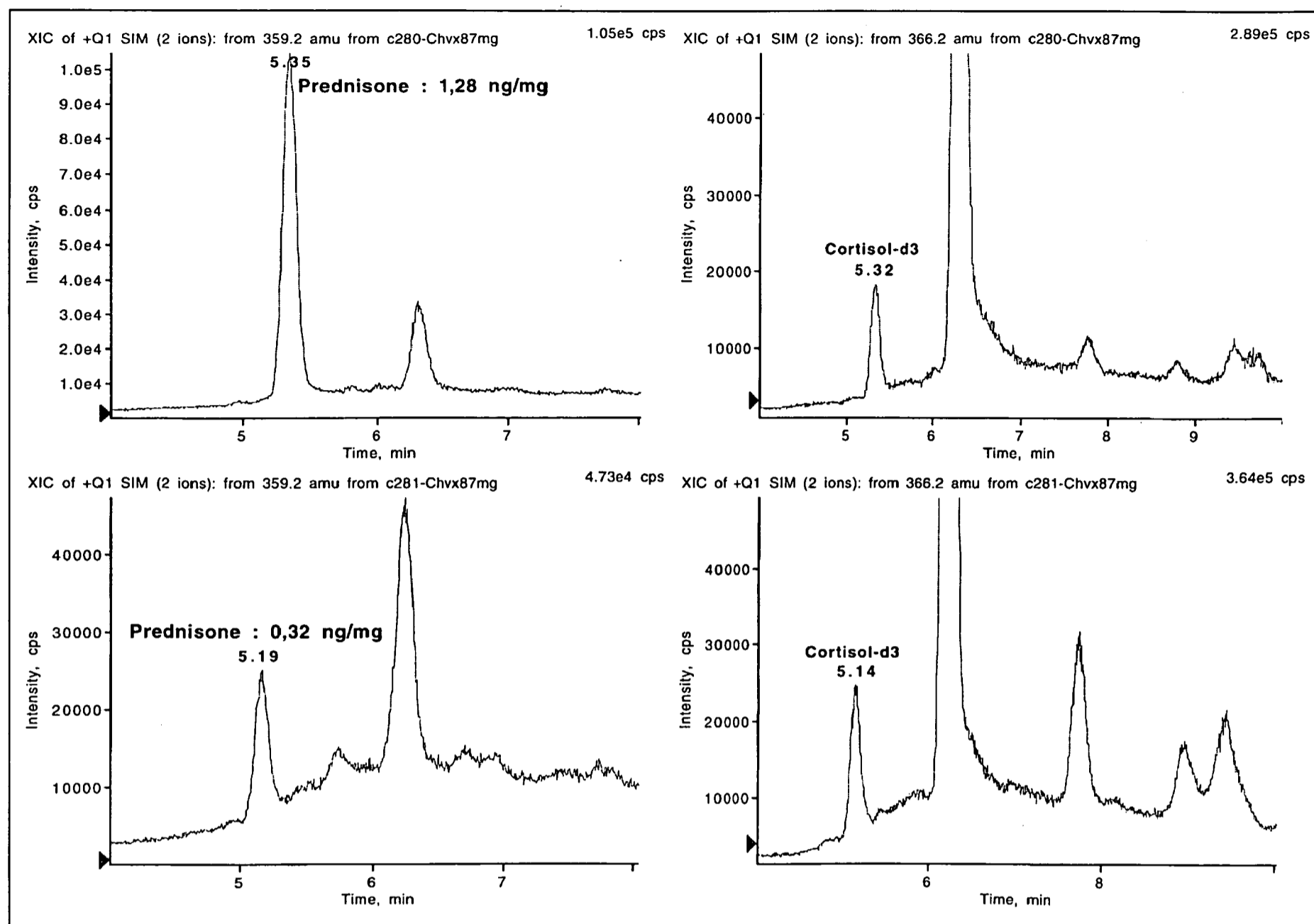


Figure 1 : Chromatogrammes en mode sélection d'ions d'un échantillon de cheveux positif pour la prednisone. En haut, le tracé obtenu après incubation dans le tampon Soerensen et extraction par le procédé décrit. En bas, le tracé obtenu après incubation méthanolique et extraction par le même procédé. Le rendement de solubilisation de la prednisone est 4 fois meilleur dans le tampon que dans le solvant.

Les résultats concernant les paramètres de validation sont donnés dans le tableau I. La réponse du détecteur était linéaire pour des concentrations de prednisone ($r = 0,998$) et de méthylprednisolone ($r = 0,997$) variant de 20 à 2000 pg/mg. Les coefficients de variation (répétabilité intra-jour à 250 pg/mg) étaient de 8 % pour la prednisone et 12 % pour la méthylprednisolone, avec des rendements d'extraction respectifs de 70 et 75 %. Les limites de détection, déterminées pour un rapport signal/bruit de fond égal à 2, étaient de 15 pg/mg pour la prednisone et 10 pg/mg pour la méthylprednisolone.

Étude clinique

Les échantillons de cheveux ont été prélevés chez 11 patients sous corticothérapie : dix étaient traités par Cortancyl® (prednisone) et un seul par Médrol® (méthylprednisolone). Les résultats analytiques sont

rapportés dans le tableau II. La prednisone a pu être identifiée dans les cheveux de 9 patients sur 10 traités par Cortancyl®. Les concentrations déterminées variaient de 30 à 130 pg/mg avec une valeur moyenne de 65 pg/mg. Le chromatogramme en ion sélectionné de la figure 2 illustre le cas d'un échantillon de cheveu positif pour la prednisone. La concentration calculée était de 45 pg/mg.

Le seul prélèvement resté négatif avait été prélevé chez une femme traitée par Cortancyl® à la posologie de 5 mg/j mais dont les cheveux avaient été colorés. Plusieurs publications rapportent qu'un traitement cosmétique tel que la coloration, la décoloration ou la permanente conduisent à la perte plus ou moins importante du contenu en xénobiotiques des cheveux (13, 14).

La méthylprednisolone a pu être dosée à la concentration de 15 pg/mg dans les cheveux de l'unique patient traité par Médrol® (Tableau II).

Tableau I : Linéarité, rendement d'extraction, répétabilité intra-jour et limite de détection pour la prednisone et la méthylprednisolone après purification par la procédure décrite.

	Prednisone	Méthylprednisolone
Linéarité (20 à 2000 pg/mg)	r = 0,998	r = 0,997
Rendement d'extraction (250 pg/mg)	70 %	75 %
Coefficient de variation (250 pg/mg)	8 %	12 %
Limite de détection (S/N=2)	15 pg/mg	10 pg/mg

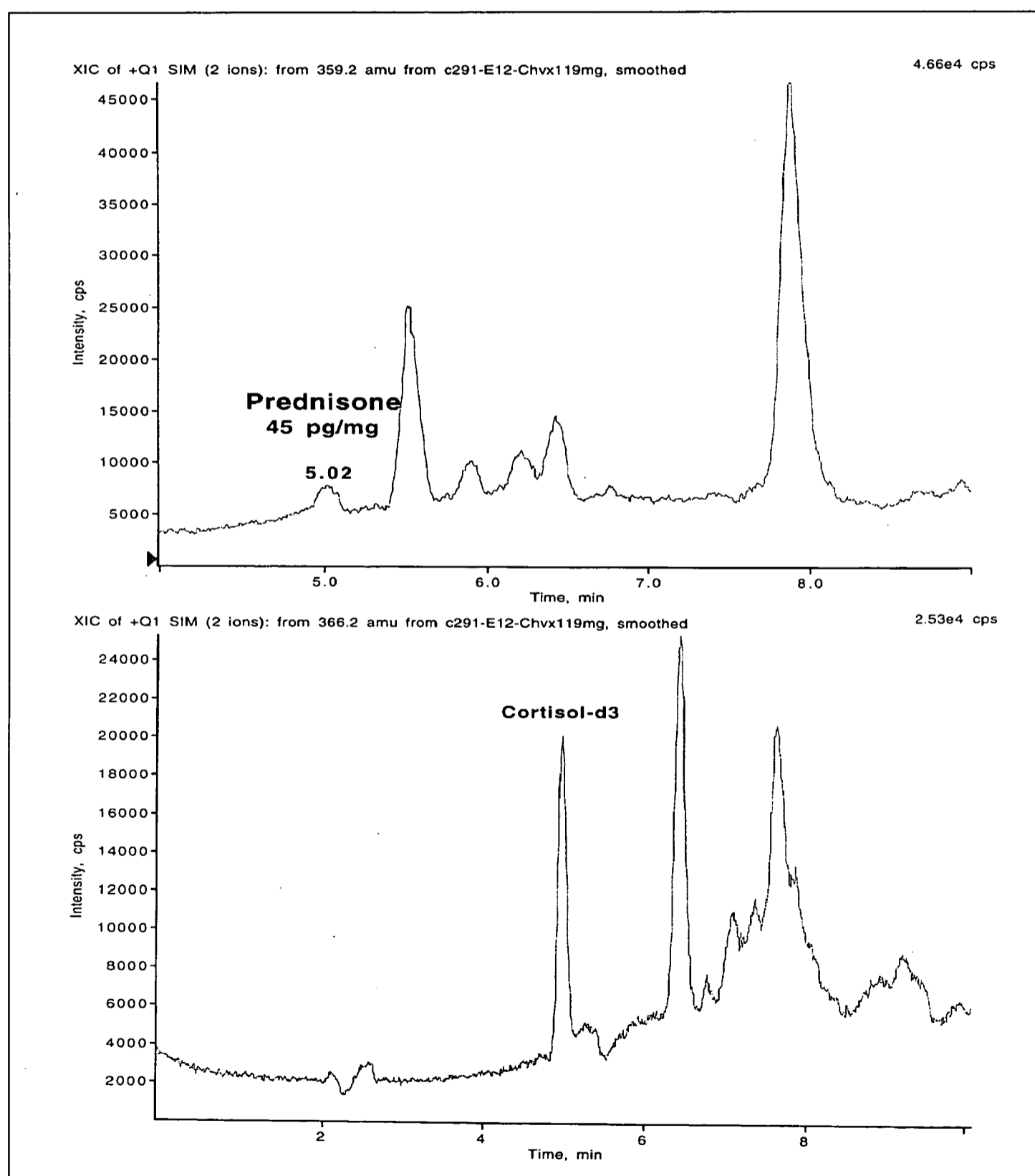


Figure 2 : Chromatogrammes en mode sélection d'ions d'un échantillon de cheveux positif pour la prednisone. La concentration calculée était de 45 pg/mg.

Tableau II : Résultats des dosages de prednisone et méthylprednisolone chez 11 patients traités par Cortancyl® (n=10) et par Médrol® (n=1).

Patient	Traitement / Posologie	Concentration
1*	Cortancyl® / 5 mg/j	Prednisone < 15 pg/mg
2	Cortancyl® / 5 mg/j	Prednisone 30 pg/mg
3	Cortancyl® / 5 mg/j	Prednisone 39 pg/mg
4	Cortancyl® / 10 mg/j	Prednisone 30 pg/mg
5	Cortancyl® / 10 mg/j	Prednisone 57 pg/mg
6	Cortancyl® / 20 à 6 mg/j	Prednisone 45 pg/mg
7	Cortancyl® / 55 à 9 mg/j	Prednisone 63 pg/mg
8	Cortancyl® / 40 à 35 mg/j	Prednisone 103 pg/mg
9	Cortancyl® / 50 à 25 mg/j	Prednisone 130 pg/mg
10	Cortancyl® / 60 à 35 mg/j	Prednisone 90 pg/mg
11	Médrol® / 4 à 2 mg/j	Méthylprednisone 15 pg/mg

* Patient dont les cheveux étaient colorés

Discussion

Les concentrations de prednisone détectées lors de cette étude sont inférieures à celle déterminée (1,28 ng/mg) dans le cadre d'une expertise médico-légale (8). Lors d'une étude préliminaire (9), la recherche de corticostéroïdes par une méthode de *screening* n'avait permis de recenser que 2 cas positifs sur 6 testés (prednisone 140 pg/mg, béclo méthasone 230 pg/mg).

Plus récemment, deux études ont été réalisées sur deux groupes de sportifs. Dans le premier cas (10), il s'agissait de 12 cyclistes professionnels pour lesquels la recherche de corticostéroïdes par HPLC/MS/MS s'est avérée positive dans 5 cas avec les concentrations suivantes : triamcinolone acétonide 0,14 à 0,33 ng/mg (n=3), hydrocortisone acétate 1,31 ng/mg (n=1), méthylprednisolone 1,21 ng/mg (n=1). La deuxième étude (11), réalisée auprès de 19 athlètes, a permis de déterminer l'abus chronique de corticostéroïdes dans 4 cas avec les concentrations suivantes : triamcinolone acétonide 0,28 ng/mg (n=1), hydrocortisone acétate 0,43 ng/mg (n=1), méthylprednisolone 1,35 ng/mg (n=1), béta/dexaméthasone 1,31 ng/mg (n=1). Dans ce cas, les analyses étaient réalisées par HPLC/MS.

Conclusion

En regard des concentrations mesurées dans le cadre de cette étude clinique, le procédé de purification (solubilisation, double extraction sur cartouche et en phase liquide) et les moyens de détection semblent plus satisfaisants que ceux décrits lors de la précédente étude (9). Certes, le nombre d'échantillons testés reste faible (n=11), mais le fort taux de positivité dans les cheveux (>90 %) atteste de la qualité de la procédure mise en place. La sensibilité analytique est donc d'une importance capitale pour le dosage des corticostéroïdes dans les cheveux.

Après une validation complète de la procédure analytique, la recherche des corticostéroïdes dans les cheveux peut apporter un complément d'informations aux tests conventionnels pratiqués dans le monde du sport (15). Les moyens d'éviter des résultats urinaires positifs pour les corticostéroïdes (prescription médicale) seront inefficaces puisque les cheveux permettront d'établir un profil de consommation de ces substances sur des périodes plus longues, alors que ces substances sont prescrites généralement pour un usage ponctuel. De plus, le prélèvement est simple, moins invasif que le recueil d'urines et peut être conservé à température ambiante.

Références

1. Altmeyer P., Buhles N., Hölzel C., Spiteller G., Stöhr L., Holzmann H., Influence of topical corticosteroids and hormones in urine and plasma. *Arzneimittelforsch.* 1986 ; 36 : 993-6.
2. Jusko W.J., Pyszczynski N.A., Bushway M.S., D'Ambrosio R., Mis S.M., Fifteen years of operation of a high-performance liquid chromatographic assay. *J. Chromatogr. B* 1994 ; 658 : 47-54.
3. Logunov V.P., Mazklar S.A., Chromatographic measurement of urinary steroids in patients with psoriasis. *Klin. Lab. Diagn.* 1994 ; 4 : 11-3.
4. Shibasaki H., Furuta T., Kasuya Y., Quantification of corticosteroids in human plasma by liquid chromatography-thermospray mass spectrometry using stable isotope dilution. *J. Chromatogr. B* 1997 ; 692 : 7-14.
5. Delahaut P., Jacquemin P., Colemonts Y., Dubois M., De Graeve J., Deluyker H., Quantitative determination of several synthetic corticosteroids by gas chromatography - mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 1997 ; 696 : 203-15.
6. Drug testing in hair. In P. Kintz (Ed.), CRC Press, Boca Raton, 1996.
7. http://www.nodoping.org/medch2_f.html
8. Cirimele V., Kintz P., Tracqui A., Ludes B., First identification of prednisone in human hair by HPLC-IS/MS. *J. Anal. Toxicol.* 1999 ; 23 : 225-6.
9. Cirimele V., Kintz P., Dumestre V., Goullé J.P., Ludes B., Identification of ten corticosteroids in human hair by liquid chromatography-ionspray mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* 2000 ; 107 : 381-8.
10. Gaillard Y., Vayssette F., Pépin G., Compared interest between hair analysis and urinalysis in doping controls. Results for amphetamines, corticosteroids and anabolic steroids in racing cyclists. *Forensic Sci. Int.* 2000 ; 107 : 361-79.
11. Bevalot F., Gaillard Y., Lhermitte M.A., Pépin G., Analysis of corticosteroids in hair by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2000 ; 740 : 227-36.
12. Kintz P., Sachs H., Critical review of chromatographic procedures since 1992. *J. Chromatogr. B* 1998 ; 713 : 147-61.
13. Cirimele V., Kintz P., Mangin P., Drug concentrations in human hair after bleaching. *J. Anal. Toxicol.* 1995 ; 19 : 331-2.
14. Yegles M., Marson Y., Wennig R., Influence of bleaching on stability of benzodiazepines in hair. *Forensic Sci. Int.* 2000 ; 107 : 87-92.
15. Kintz P., Hair testing and doping control in sport. *Toxicol. letters* 1998 ; 102 : 109-13.