

Développement d'une méthode d'analyse des produits anabolisants dans les compléments alimentaires par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Dr SONIA TRIKI¹, Dr FATMA FEKI², Dr JIHENE KHELIF³, Dr MERIAM HACHED⁴

¹ Direction Régionale de la Santé – MONASTIR, ² Laboratoire National de contrôle des médicaments

³ Direction Régionale de la Santé – SFAX, ⁴ Institut Mohamed Kassab d'orthopédie

INTRODUCTION

Les compléments alimentaires peuvent présenter des risques pour la santé et au niveau du dopage par inadvertance.

La contamination par des substances anabolisantes suscite un contrôle rigoureux de ces produits.

L'objectif de notre travail est de rechercher les stéroïdes anabolisants dans les compléments alimentaires commercialisés sous forme solide par des méthodes analytiques pertinentes : Testostérone, Androsterone, Nandrolone, Dehydroepiandrosterone, Boldenone, Methanedione, 5 alpha androstane-3alpha, 17beta-diol et Dihydrotestosterone .

MATERIELS ET METHODES

Prétraitement de l'échantillon

Extraction liquide-liquide

- Mettre 1g de matrice solide
- Ajout 4 ml de NaOH
- Ajout de 50 µL d'étalon interne
- Ajout de 5 mL de solvant d'extraction
- Agitation mécanique pendant 1 h
- Centrifugation à 3000 tours/minute pendant 5 minutes
- Congélation de la phase aqueuse à -26°C dans le méthanol
- Récupération de la phase organique

Dérivatisation

- Evaporation de la phase organique sous flux d'azote et/ou sous vide.
- Ajout de 50µL de réactif de dérivation (ST_D)
- Incubation à 65°C pendant 30 minutes
- Mise en vial et analyse par GC/MS

Analyse par GC-MS

L'analyse est effectuée par un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse de type Hewlett Packard automatisé dont les éléments de base sont : une GC de type HP 6890, un injecteur Split/Splitless, un détecteur MS quadripolaire de type HP5973 à ionisation par impact électronique (EI) et un logiciel Chem Gb pour le traitement des données.

Colonne	- Type : capillaire - Phase stationnaire : 5% phényl 95% diméthylpolysiloxane - Longueur : 30 m -Diamètre interne : 0,25mm -Epaisseur du film: 0.25µm
Paramètres du débit	-Gaz vecteur : Hélium - Débit initial: 03 ml/min - Pression: 6 psi à 190°C
Paramètres d'injection	-Température de l'injecteur : 250°C -Mode d'injection : Split - Rapport de split : 1/10 - Volume d'injection : 3µl
Paramètres du détecteur MS	- Mode d'ionisation : impact électronique (EI) à 70 eV - Mode d'acquisition : SCAN - Température de l'interface : 280°C - Température de la source : 230°C - Température du quadripôle : 150°C

Programme de température du four

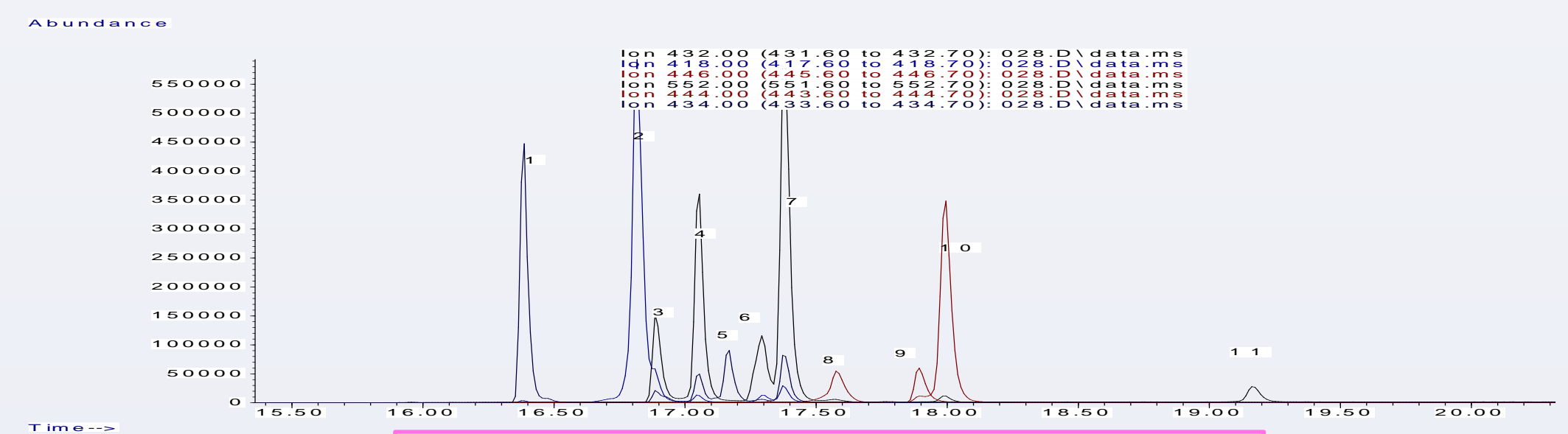
Température (°C)	Vitesse (°C/min)	Temps (min)	Régime
190-235	2	0	Gradient linéaire
235-320	30	5	Gradient linéaire
320		5	Isotherme

Validation analytique

La validation analytique a été réalisée conformément aux conditions de l'International Standard for Laboratories (ISL). Elle a porté sur les critères suivants : spécificité, limites de détection, fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire).

RESULTATS

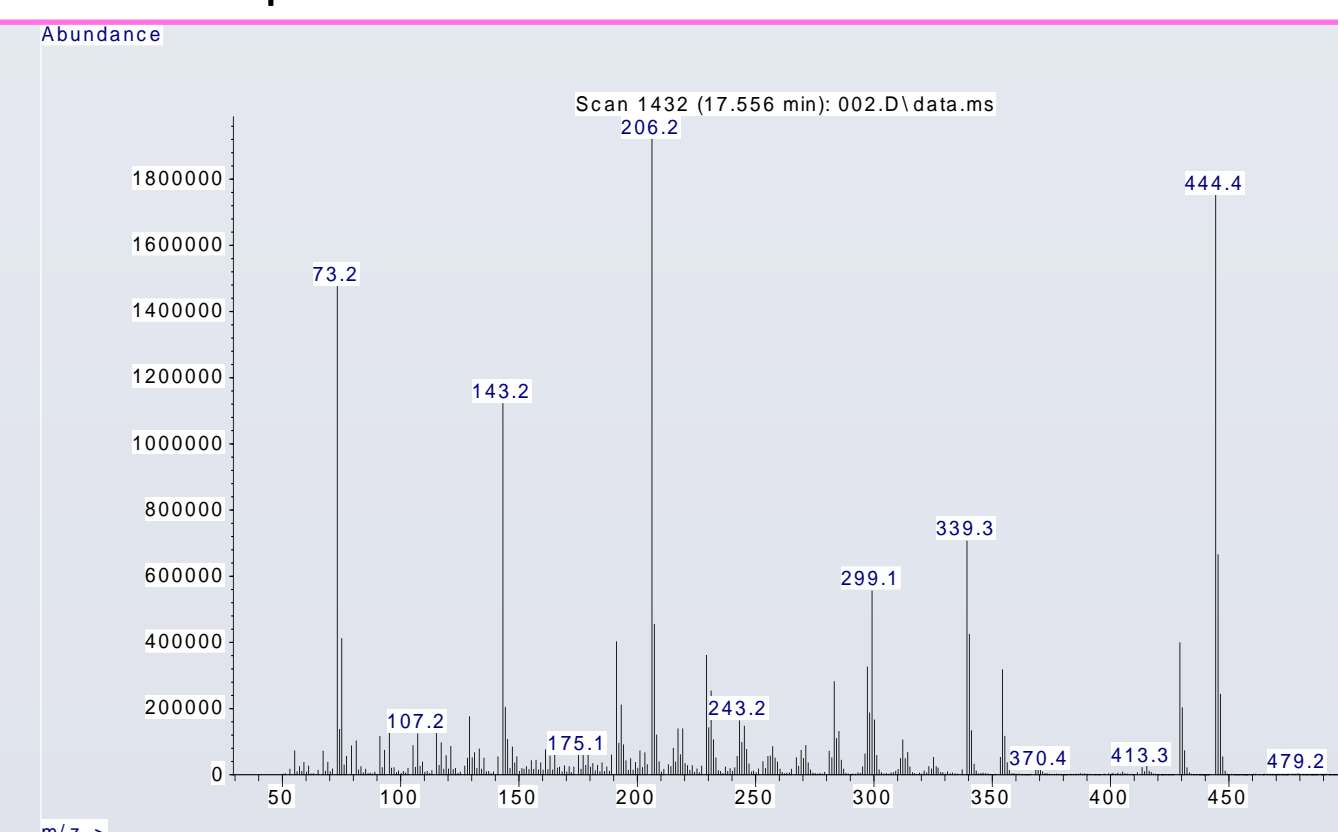
Chromatogramme d'un mélange de substances anabolisantes



Identification des différents composés

Composé	TR	TRR	m/z
Androstérone di O-TMS	16,501	0,921	419/434/329/421/239
Nandrolone di O-TMS	16,839	0,940	418/194/403/313
DHEA di O-TMS	16,922	0,945	432/417/327/237
5- α androstène 3,17-β diol di-O-TMS	17,400	0,972	421/241/346/436
DHT di O-TMS	17,302	0,966	434/143/405/202/417
Boldénone di O-TMS	17,408	0,961	430/206/325/415
Testostérone di O-TMS	16,901	0,946	432/417/341/208/239
Metanedione di O-TMS	17,858	0,997	444/143/206/429
Etalon interne	17,400	1	301/446/339/241/431

Spectre de masse: exemple de la methanedienone di-O-TMS



Le spectre montre l'apparition des fragments caractéristiques de la Methanedienone m/z= 444, 429, 206 et 143.

Nous notons les pics : Pic de base = 444 ; M**= 444 ;M** (-CH3) = 429

PARAMETRES

RESULTATS

Spécificité	Les différents pics sont bien séparés et n'interfèrent avec aucun pic venant de la matrice.
Fidélité	Fidélité intermédiaire
	Répétabilité
Limites de détection	Variet entre 10 ng/g et 20 ng/g

APPLICATION

Dans le cadre d'une mise au point d'une méthode analytique de contrôle des compléments alimentaires, nous avons appliqué notre méthode sur six échantillons dont cinq sont vendus sur le marché tunisien formel et ayant l'AMC et un échantillon provenant du marché tunisien informel, n'ayant pas l'AMC et qui s'est avéré qu'il contient de la methanedienone après analyse .

Ce complément alimentaire contaminé a été procuré difficilement auprès d'un vendeur clandestin dans une salle de sport.

CONCLUSION

Les compléments alimentaires sont des produits à la frontière du médicament, jouissant d'une législation moins contraignante. Mais si les bénéfices d'une telle consommation ne sont pas toujours évidents, les risques pour la santé et au niveau du dopage demeurent présents.

La recherche des stéroïdes anabolisants dans les compléments alimentaires permet d'assurer la sécurité du consommateur et protéger les sportifs du risque de dopage.

En effet, le screening des anabolisants par GC-MS demeure une méthode séparative de choix dotée d'une bonne sensibilité.