

## IDENTIFICATION DU POLYTHIAZIDE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN TANDEM AVEC IONISATION ELECTROSPRAY EN MODE NÉGATIF

F. Oueslati <sup>a</sup>, N. Ben Hamida <sup>b\*</sup>, A. Toumi <sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Laboratoire National de Contrôle des Médicaments et de Dépistage du Dopage,  
11 Rue Djebel Lakhdar, Bab Saadoun, 1006 Tunis, Tunisie*

<sup>b</sup> *Laboratoire de Chimie analytique et Electrochimie, Faculté des Sciences de Tunis, 1060 Tunis, Tunisie*

(Reçu le 10 Février 2007, accepté le 15 Avril 2008)

**RESUME:** Le Polythiazide est un composé thiazidique qui figure dans la liste des substances interdites par le Comité International Olympique (CIO) depuis 1988. Le Polythiazide est un diurétique utilisé par les athlètes pour réduire leur poids et masquer la présence d'autres agents dopants. Les méthodes d'analyses par GC/MS sous impact électronique rapportées dans la littérature montrent une dégradation du thiazidique affectant ainsi leur limite de détection. La Chromatographie Liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem avec ionisation electrospray en mode négatif LC-ESI-MS/MS montre une grande sensibilité de détection des composés thiazidiques dans les matrices biologiques complexes telle que l'urine. L'identification de la plupart des fragments spécifiques du polythiazide obtenus à la fois dans la source et dans la cellule de collision à basse pression « CID », a permis la recherche de cette substance dopante.

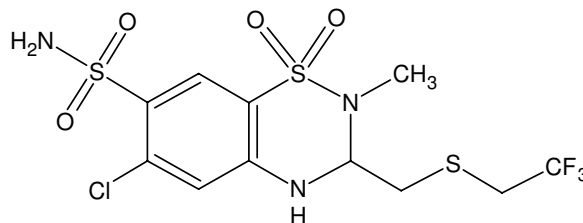
**Mots clés:** Polythiazide, diurétique, dopage, LC-MS/MS, ESI-, CID, CIO.

**ABSTRACT:** Polythiazide is a thiazidic present in the list of forbidden substances since 1988 by the CIO. This substance was used by athletes in order to reduce their weight and the concentration of other dopant agents. The identification of polythiazide based on GC/MS methods show the deterioration of the thiazidic. Tandem mass spectrometry with negative electrospray ionization LC-ESI-MS/MS shows a high sensitivity of detection of this substance in urine. Mass spectra of the polythiazide have been established "in source" and in the collision cell of "CID". The identification of the most specific fragments of the polythiazide permits the search of this doping substance.

**Key words:** Polythiazide, diuretics, doping, LC-MS/MS, ESI-, CID, IOC.

### INTRODUCTION

Le Polythiazide ou 6-Chloro-3,4-dihydro-2-méthyl-3-[[2,2,2-trifluoroéthyl)thio]méthyl]-2H-1,2,4-benzothiadiazine-7-sulfonamide-1,1-dioxide est un diurétique appartenant à la famille des composés thiazidiques. Cette substance de formule semi- développée ci- dessous (Figure 1), est connue pour son effet néphrologique dans le traitement de l'hypertension [1,2] et dont l'usage a été



**Figure 1:** Formule semi- développée du Polythiazide (M=439.88g)

contourné par les athlètes pour réduire leur poids et masquer la présence d'autres agents dopants. Cet abus a conduit en 1988 le Comité international olympique (CIO) à inclure le polythiazide dans la liste des substances interdites.

Durant les dernières décennies la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse sous impact électronique GC/MS a été proposée pour l'analyse et l'identification des composés thiazidiques dans les milieux biologiques en utilisant différents procédés de dérivation [3,4]. Cette technique a permis la caractérisation d'un grand nombre de

\* correspondant

composé thiazidiques, malgré leurs réactions d'oxydations conduisant aux sulfoxyde et sulfone et d'hydrolyses donnant le méthylchloroamidophénamide affectant ainsi la sensibilité de la méthode d'analyse [5-7].

En effet, les réactions d'oxydations observées font intervenir les impuretés du solvant d'extraction (l'acétate d'éthyle) et les entités de la matrice biologiques (inconnues jusqu'à présent). Par ailleurs, les réactions d'hydrolyses en milieu aqueux dépendent étroitement des propriétés physico-chimiques (pH, Densité), de durée et des conditions du stockage des échantillons urinaires.

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse avec une interface thermonébulisation a été également utilisée pour l'identification de ce diurétique. Cependant, il ressort de cette étude que seulement 30% des ions formés dans la source arrivent au détecteur et limitent ainsi l'utilisation de ce type de couplage [8].

Les essais préliminaires d'investigation montre que l'electrospray en mode négatif présente une plus grande sensibilité de détection, de l'ordre du nano- gramme permettant l'identification du polythiazide dans les matrices complexes et chargées telle que l'urine [9-12].

L'agence mondiale d'antidopage exige des laboratoires accrédités la recherche de toutes les informations nécessaires pour la caractérisation univoque des substances interdites. Ainsi, les spectres de masse obtenus à la fois en modes  $MS^1$  et  $MS^2$  à basse pression ont permis la recherche du polythiazide dans des échantillons urinaires d'athlètes prélevés lors de contrôles antidopage.

## REACTIFS

Les différents solvants utilisés dans cette étude sont de qualité HPLC: l'eau (Labscan), l'acétonitrile (Panreac) et le méthanol (Prolabo). L'acide formique et le formiate d'ammonium ayant servis lors des étapes de préparation des étalons sont de hautes puretés (Aldrich). Le Polythiazide de pureté supérieur à 98% a été fourni par Sigma.

## APPAREILLAGE ET CONDITIONS OPERATOIRES

L'appareillage utilisé comprend un analyseur triple quadripolaire Quattro micro (micromass, Manchester, UK) avec une interface electrospray (ESI-) utilisée en mode d'ionisation négative.

Les spectres de masse présentés ont été obtenus pour une solution standard du polythiazide à 5µg/mL dans un mélange tampon formiate d'ammonium (5 mM, pH = 3,5)/acétonitrile (20:80 v/v), injectée en introduction directe avec un débit de 10 µL/min. Le potentiel de capillaire a été fixé à 3,4 kV. Les températures de la source et de dessolvation ont été respectivement fixées à 120 et 400°C. Les débits du gaz de nébulisation et de dessolvation ( $N_2$ ) sont respectivement de 90 et 300 L/h. Les acquisitions ont été réalisées en mode accumulation pendant une minute.

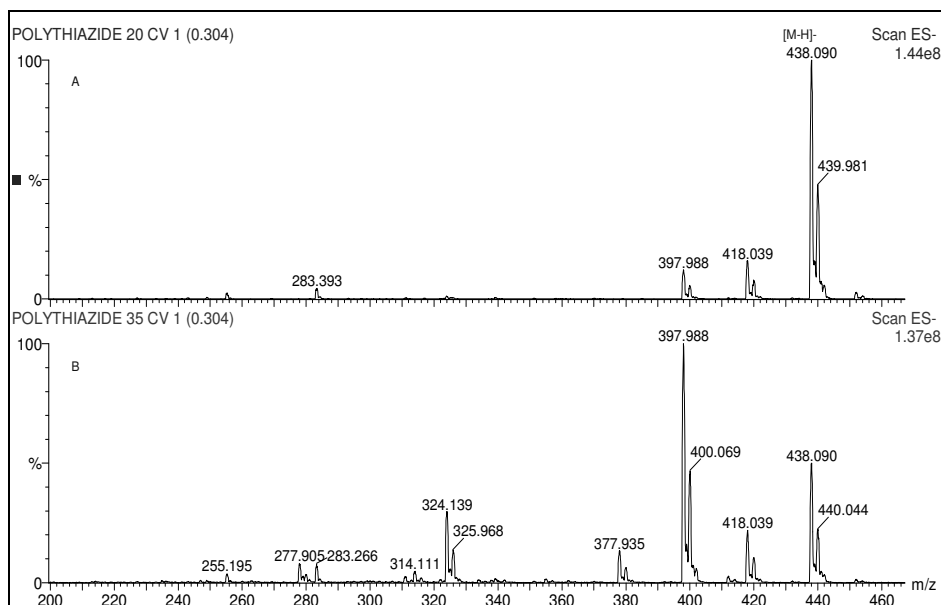
## PREPARATION DE LA SOLUTION ETALON

La solution mère du Polythiazide à 5µg/mL a été préparée par dissolution de 10 mg de l'étalon dans 10 mL de méthanol. 25 µL de cette solution est diluée dans 5 ml d'un mélange de composition acétonitrile – tampon formiate d'ammonium « 5mM, pH=3,5 » (80:20 v/v). Le tampon formiate d'ammonium de pH=3,5 a été sélectionné afin d'assurer une rétention acceptable du Polythiazide (composé à caractère acide) avec une phase stationnaire apolaire (C-8) lors de sa recherche dans une matrice urinaire.

## RESULTATS ET DISCUSSION

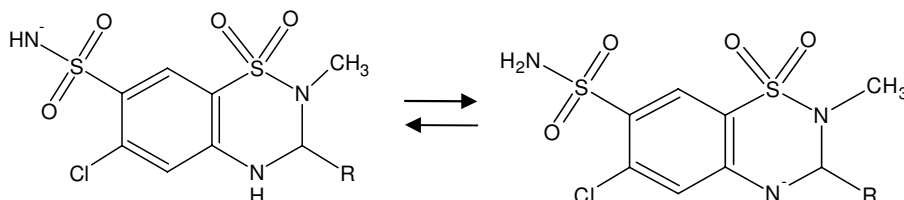
### I- Dissociation et fragmentation dans la source

Les spectres de masse du Polythiazide obtenu par infusion directe dans le spectromètre de masse, ont été enregistrés avec une source electrospray en mode négatif aux potentiels de cône de 20 et 35 V (Figures 2 A et 2B).



**Figure 2:** Spectre (ESI-, MS<sup>1</sup>) du Polythiazide aux potentiels de cône de 20 (A) et 35V (B)

L'ionisation par electrospray en mode négatif (ESI-) du polythiazide conduit à la formation d'ion pseudo-moléculaire  $[M-H]^-$  d'abondance élevée et de rapport  $m/z = 438$  (Figure 2-A). Cette déprotonation permet de mettre en évidence la présence de deux fonctions à caractère acide (fonctions amine et sulfonamide) susceptibles de s'ioniser en mode négatif (Figure 3). En outre, le spectre A de la figure 2, montre que l'ion pseudo-moléculaire se présente sous forme de deux pics isotopiques relatifs à l'atome de chlore.



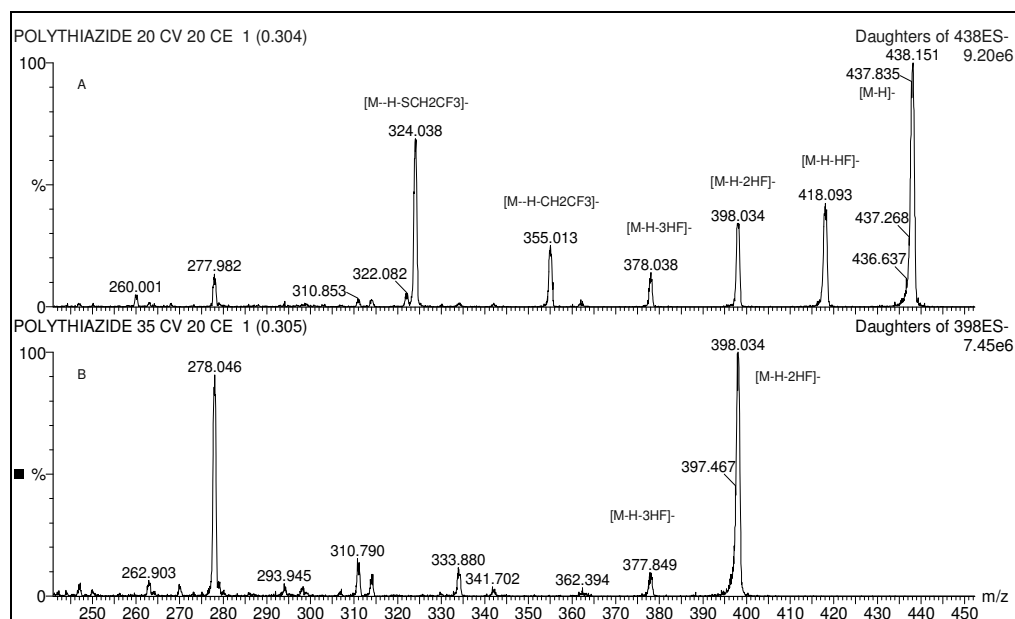
**Figure 3:** Différents sites du polythiazide susceptible de se déprotonnée en ESI-

Par ailleurs, une augmentation du potentiel du cône de 20 à 35V engendre la fragmentation de l'ion pseudo-moléculaire et la formation d'ions fragments d'intensité relativement élevée (Figure 2B). Un certains nombres d'ions supplémentaires de rapport  $m/z = 418$ , 398 et 378 correspondant à une élimination successive d'acide fluorhydrique (HF) apparaissent à côté de l'ion pseudo-moléculaire  $m/z = [M-H]^-$ .

On note également qu'une augmentation de l'énergie de collision dans la source n'affecte pas l'abondance des ions formés. Ce résultat pourrait être liée à l'existence de plusieurs mécanismes de dissociation entre les espèces chargées. Par ailleurs, la mise au point d'une méthode de détection basée sur les ions formés dans la source nécessite l'assurance d'une part, de leurs spécificité, du fait qu'aucun ions précurseur n'a été sélectionné conduisant à leurs formation et d'autre part, de leurs stabilité lors d'analyse sur des échantillons urinaires.

## II- Dissociation et fragmentation dans la cellule de collision

La figure 4 présente les spectres de masse MS<sup>2</sup> de l'ion pseudo-moléculaire  $[M-H]^-$  de rapport  $m/z = 438$  (Figure 4-A) et de l'ion  $[M-H-2HF]^-$  de rapport  $m/z = 398$  (Figure 4-B) obtenus en mode ES- pour une énergie de collision de 20eV.



**Figure 4:** Spectres (ESI-, MS<sup>2</sup>) du polythiazide obtenu par fragmentation des ions 438 (A) et 398 (B) à une énergie de collision de 20 eV.

Le spectre A montre une différence de 20 ua entre les fragments obtenus de rapport  $m/z = 418$ , 398 et 378, dues aux pertes successives de trois équivalents d'acide fluorhydrique (HF) et des ions aux rapport  $m/z = 355 = [M-H-CH_2CF_3]^-$  et  $m/z = 324 = [M-H-SCH_2CF_3]^-$ , provenant de coupures situés de part et d'autre de la fonction thio-éther. Le spectre B issue de la fragmentation de l'ion  $m/z = 398$  du polythiazide fait apparaître, en plus du fragment de rapport  $m/z = 278$  d'intensité élevée, un certain nombre d'ions aux rapports  $m/z = 378$ , 334 et 311 de faible intensité.

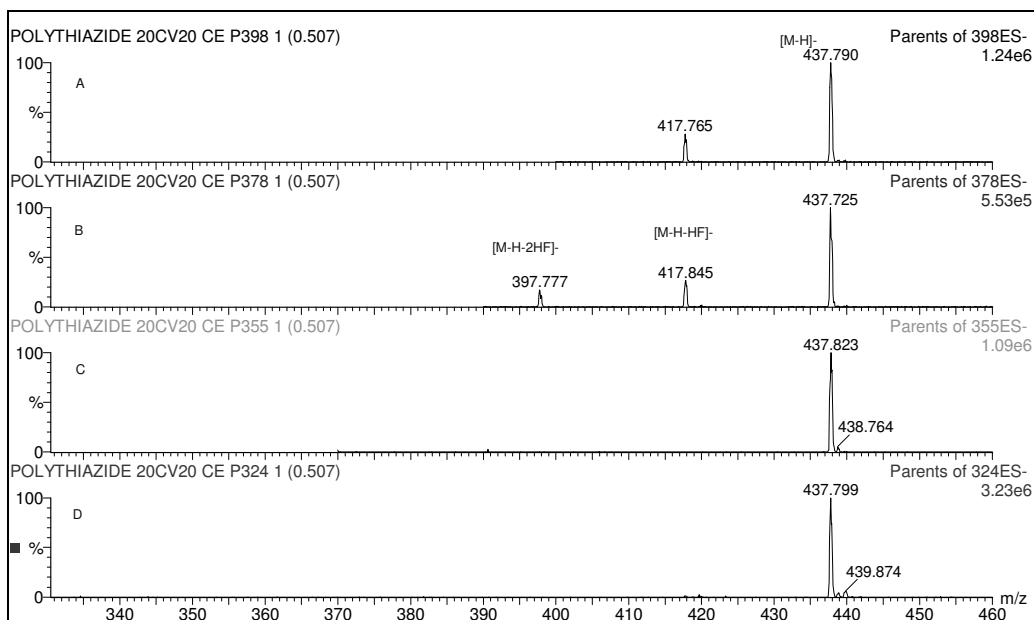
Il est important de noter que, lors du passage de MS simple à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) on assiste à la disparition à la fois des signaux correspondant aux bruits de fond et aux pics isotopiques.

Afin de développer le mécanisme de fragmentation obtenu par spectrométrie de masse en tandem avec ionisation electrospray en mode négative du polythiazide, différents modes d'acquisition ont été mis à profit, à savoir le balayage des ions parents et des pertes d'un neutre, afin de préciser l'enchaînement de dissociation observé avec ce composé thiazidique.

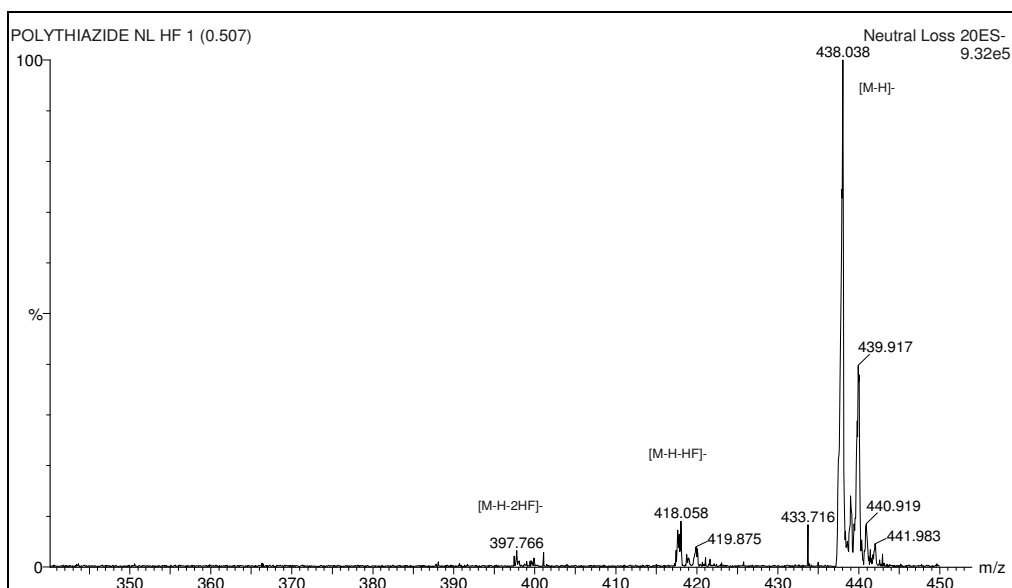
En effet, les spectres de masse MS/MS des ions précurseurs de rapport  $m/z = 398$  et 378 (Figures 5A et 5B) montrent que ces derniers sont issus des fragments  $[M-H-HF]^-$ ,  $[M-H-2HF]^-$  et  $[M-H]^-$ . Ainsi, nous pouvons conclure que l'ion  $m/z = 398$  est obtenu suite à la dissociation des fragments aux rapports  $m/z = [M-H]^-$  et  $[M-H-HF]^-$  alors que l'ion  $m/z = 378$  est obtenu par la dissociation des fragments  $[M-H]^-$ ,  $[M-H-HF]^-$  et  $[M-H-2HF]^-$ .

Par ailleurs, nous pouvons déduire des spectres C et D de la figure-5 que seul l'ion pseudo-moléculaire  $[M-H]^- = m/z = 438$  conduit à la formation des fragments  $m/z = 355$  et 324. Ceci est confirmé par l'absence des pics correspondant à ces ions dans le spectre MS/MS du polythiazide issue de la fragmentation de l'ion  $m/z = 398$ . Ces résultats semblent indiquer que ce type de fragmentation n'affecte que l'ion  $m/z = 438$  et que les coupures de part et d'autre de la fonction thio-éther se produisent d'une façon compétitive.

Le spectre de masse MS/MS des pertes d'un neutre de 20 ua, illustré par la figure-6, présente trois fragments, dont deux aux rapports  $m/z = 418$  et 398 de faible intensité et un au rapport  $m/z = 438$  d'abondance élevée. En effet, l'examen des intensités relatives par rapport au pic de base montre qu'à une énergie de collision constante, les pertes de deux et trois équivalents d'acide fluorhydrique ne présentent que 5 à 10% par rapport à celle de la perte d'un seul équivalent de HF.



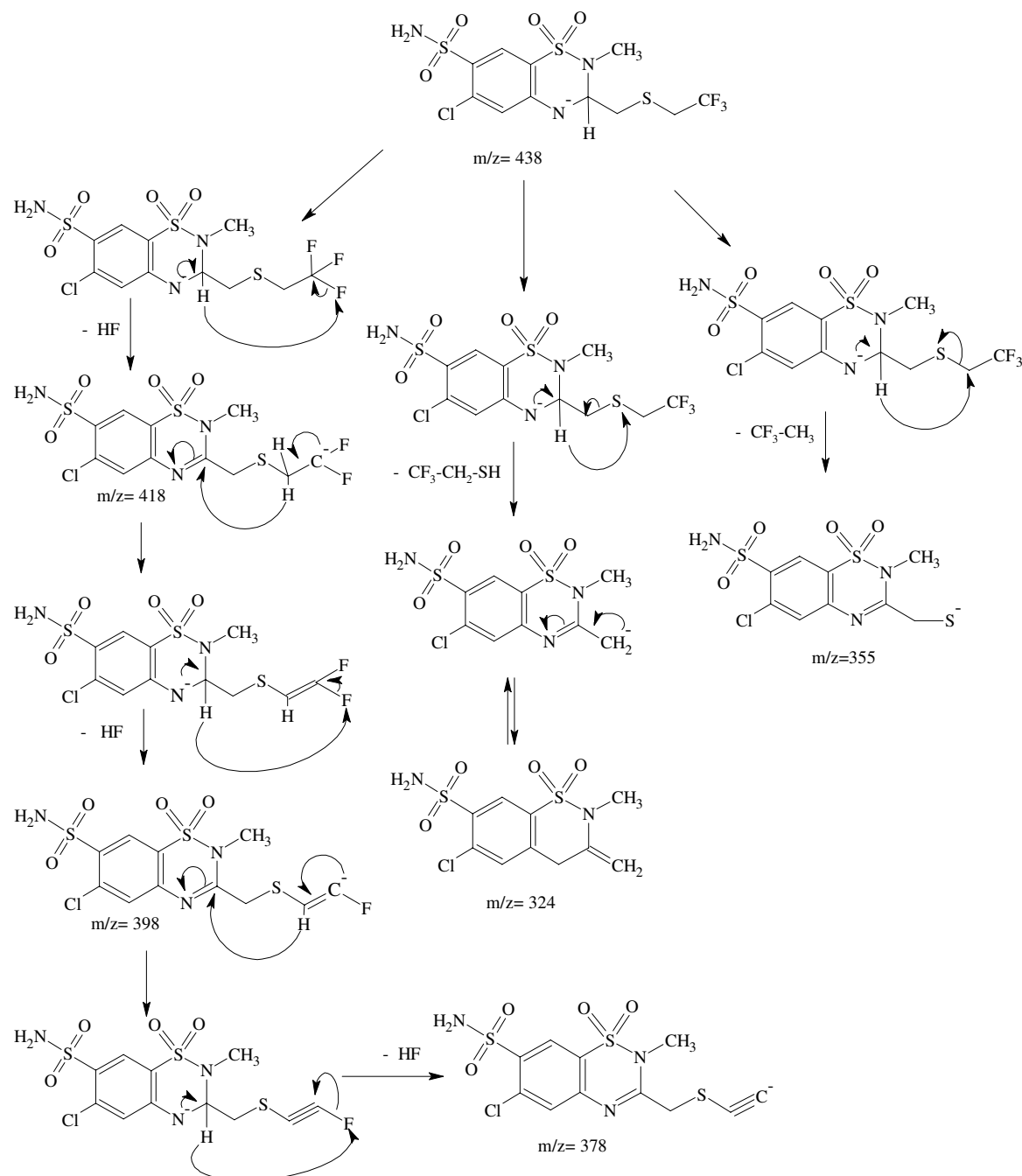
**Figure-5:** Spectres (ESI-, MS<sup>2</sup>) du polythiazide obtenu par balayage des ions parents de A: 398; B: 378; C:355 et D:324 à une énergie de 20eV.



**Figure 6:** Spectre (ESI-, MS<sup>2</sup>) du Polythiazide obtenu par balayage des ions qui ont perdu un neutre correspondant à HF.

Par ailleurs, l'examen du spectre de masse des pertes d'un neutre semble indiquer que l'élimination d'une façon spontanée de HF affecte majoritairement l'ion pseudo-moléculaire [M-H]<sup>-</sup> plus que les autres ions.

Ces résultats nous ont amenés à proposer le mécanisme de fragmentation illustré par le schéma de la figure 7.



**Figure-7:** Mécanisme de fragmentation de l'ion pseudo-moléculaire  $m/z = 438$  en  $\text{MS}^2$  par ESI-

## CONCLUSION

Nous avons développé au cours de ce travail une méthode d'identification du polythiazide par spectrométrie de masse avec ionisation electrospray en mode négatif LC-ESI-MS/MS. Il ressort de cette étude que, la fragmentation de l'ion pseudo- moléculaires  $m/z = [M-H]^-$  obtenu à la fois dans la source et dans la cellule de collision, conduit à un nombre relativement important d'ions diagnostiques spécifiques du diurétique, utilisés pour sa caractérisation éventuelle dans des matrices biologiques complexes comme l'urine.

## REFERENCES

- [1] J. G. Hardman, L.E. Limbird, P. B. Molinoff, R. W. Ruddon, A. G. Gilman, Les bases Pharmacologiques de l'Utilisation des Médicaments, pp 691-717, Diurétiques, 9<sup>ème</sup> Edition, Mc Graw-Hill, France, **1996**.
- [2] M. Schroderet, pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques, 2<sup>ème</sup> Edition, Frison-Roche et Slatkine, **1992**, p 151.
- [3] D. Carreras, C. Imaz, R. Navajas, M. A. Garcia, C. Rodriguez, A. F. Rodriguez, *J. Chromatogr. A.*, **1994**, *683*, 195.
- [4] V. Morra, P. Davit, P. Capra, M. Vincenti, A. Di Stilo, F. Botrè, *J. Chromatogr. A.*, **2006**, *1135*, 219.
- [5] D. Thieme, J. Grosse, R. Lang, R. K. Mueller, A. Wahl, Recent Advances in Doping Analysis, sport und Buch Strauss, Köln., **2000**, *8*, p 47.
- [6] C. Goebel, G. J. Trout, R. Kazlaukas; *Analytica Chimica. Acta.*, **2004**, *502*, 65
- [7] D. Thieme, J. Grosse, R. Lang, R. K. Mueller, A. Wahl, *J. Chromatogr. B.*, **2001**, *757*, 49.
- [8] R. Ventura, D. Fraisse, M. Becchi, O. Paise, J. Segura, *J. Chromatogr.*, **1991**, *562*, 723.
- [9] M. Thevis, G. Opfermann, W. Schanzer, Recent Advances in Doping Analysis, sport und Buch Strauss, Köln., **2002**, *10*, p 97.
- [10] K. Deventer, F.T. Delbeke, K. Roels, P. Van Eenoo, *Biomed. Chromatogr.*, **2002**, *16*, 529.
- [11] M. Thevis, H. Schmickler, W. Schanzer, *Anal. Chem.*, **2002**, *74*, 3802.
- [12] P. Garcia, M. A. Popot, F. Fournier, Y. Bonnaire, J. C. Tabet, *J. Mass Spectrom.*, **2002**, *37*, 940.