

Chimia 48 (1994) 413–416
 © Neue Schweizerische Chemische Gesellschaft
 ISSN 0009-4293

Analyse des β -agonistes à l'aide de colonnes d'immuno-affinité par CPG/SM

Cyril Jeannot^{a1)} et Claude Rohrbasser*

Abstract. β -Agonists are used in human and veterinary medicine. These chemicals are active at very low concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$ meat), causing analytical problems of quantification. The purpose of this work was to develop and test a new analytical method using the principle of immunoselectivity.

1. Introduction

Les β -agonistes sont des médicaments brevetés comme bronchodilatateurs pour l'utilisation en médecine humaine et vétérinaire. D'autre part, d'après des études faites sur la consommation de β -agonistes par le bétail, on a remarqué que ces composés provoquaient chez l'animal un accroissement de la masse musculaire au détriment des tissus graisseux.

Le problème est que ces composés produisent leurs effets à des concentrations déjà très faibles (quelques $\mu\text{g}/\text{kg}$ de viande). La détermination en est donc rendue très difficile.

Des méthodes biochimiques ont été mises au point pour des analyses semi-quantitatives. La plus actuelle de celles-ci est la méthode ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Elle utilise des enzymes marqués afin d'amplifier et de visualiser la réaction anticorps antigène.

Le but de ce projet, est l'évaluation de colonnes immunosélectives et l'étude de leur application en vue d'établir une méthode d'analyse de ces composés par voie chimique.

2. Aspect chimique des β -agonistes

Les β -agonistes sont produits sous forme de sels (sulfates, chlorures). Ces sels sont inodores et incolores avec des points de fusion entre 150 et 300°. Les β -

agonistes utilisés contiennent tous au moins un centre chiral donnant deux isomères optiques. La plupart des préparations sont des mélanges de deux isomères. Depuis peu, des études de l'activité pharmacologique des différents isomères sont possibles.

La structure commune à tous les β -agonistes est le α -(*tert*-butylaminométhyl)benzyl alcool. Il existe plusieurs β -

agonistes, mais, pour ces essais, seuls le clenbuterol et le salbutamol ont été retenus (tab. 1).

Dose légale dans les viandes. Selon l'office fédéral de la santé publique, le salbutamol ne doit pas être présent dans les viandes ni dans le lait. Pour le clenbuterol, la valeur limite est de 0.2 mg/kg dans le lait et de 1 mg/kg dans la viande.

3. Méthode de séparation

3.1. Immunochimie

L'immunologie est une science fondamentale, une science médicale mais aussi une technologie. Dans cette dernière acception, elle a développé tout un ensemble de techniques basées sur la réaction antigène-anticorps (Ag-Ac) et regroupées sous le terme d'immunochimie.

Antigène. On appelle antigène toute substance susceptible d'induire, lorsqu'elle est introduite dans un organisme, la production d'anticorps capables de le reconnaître. Toute molécule d'antigène est en fait constituée d'un assortiment de déterminants ou sites antigènes appelés épitopes, chacun constituant un motif moléculaire reconnu par un anticorps (fig. 1).

Tab. 1. β -Agonistes étudiés

Noms	formules brutes	formules développées
Clenbuterol	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$	
Salbutamol	$\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{NO}_3$	

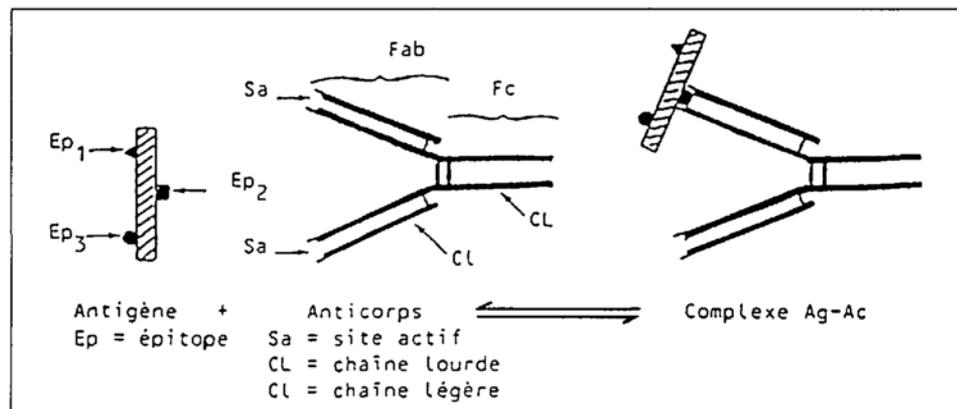


Fig. 1. Antigène, anticorps et réaction Ag-Ac

*Correspondance: Prof. C. Rohrbasser
 Ecole d'Ingénieurs de Fribourg
 Section de Chimie
 4 Rue du Musée
 CH-1700 Fribourg

^{a1)} Prix Max Lüthi 1994

Nouvelle Société Suisse de Chimie

Les molécules étudiées dans ce travail sont appelées des haptènes. Ces dernières peuvent réagir avec les anticorps, mais ne peuvent pas en produire. Pour la production d'anticorps les reconnaissant, les haptènes doivent être fixés à de plus grosses molécules.

Anticorps. Les anticorps sont les substances produites par un organisme animal en réponse à la présence d'une substance (antigène) qui lui est étrangère. Ils réagissent spécifiquement avec l'antigène qui les a induit.

La réaction antigène-anticorps. Lorsque antigène et anticorps correspondant sont mis en présence, ils réagissent spécifiquement entre eux pour former un complexe (fig. 1). La molécule d'antigène se fixe par son épitope dans un creux du site actif de l'anticorps. Les réactions Ag-Ac sont très spécifiques. Les anticorps peuvent reconnaître soit de petites différences dans la structure primaire d'un antigène, soit même des différences de charges, de

configuration optique ou de conformation stérique.

3.2. Séparation par immunoaffinité

En général les anticorps utilisés dans cette technique sont liés de façon covalente à un support activé. La solution d'échantillon est passée à travers la colonne. Les interactions immunochimiques immobilisent les molécules désirées qui restent fixées aux anticorps, alors que les composants de la matrice passent à travers la colonne. Les restes de composés non liés, peuvent être éliminés complètement par lavage de la colonne. Pour cela on utilise une solution qui n'influence pas l'interaction immunochimique. Après la procédure de lavage, les produits liés aux anticorps sont élués. La procédure d'élué est basée sur différents principes, tels que la compétition de ligands, les changements de forces ioniques, le changement de solvant et le changement de pH. Les conditions optimales d'élué peuvent changer

avec l'anticorps. Pour les substances étudiées, l'élué choisi est: éthanol-eau-tampon acétate pH 4 dans un rapport v/v de 80:15:5.

La quantité maximum de molécules qui peuvent être fixées sur une colonne immunosélective dépend de la quantité et de l'orientation des molécules d'anticorps dans la colonne. L'efficacité de la capture immunochimique dépend du débit, du volume dans lequel une certaine quantité d'échantillon est dissous et de la nature de la solution échantillon. Un flux lent combiné à une faible concentration d'haptène conduit à une haute rétention.

4. Analyse par CPG/SM

L'analyse des extraits récupérés après élué sur la colonne se fait par spectrométrie de masse. Il est nécessaire de pouvoir identifier les produits afin de différencier les différents β -agonistes. Pour cela il est indispensable d'avoir une fragmentation où le pic moléculaire M^+ est visible (ionisation chimique).

Optimisation des conditions de l'analyse chromatographique (tab. 2). Chromatographe en phase gazeuse HP 5890 couplé à un spectromètre de masse HP 5989 MS Engine (quadripôle).

Mode de ionisation. Dans ce genre d'analyse, il est de règle que la détection se fasse au moyen de trois masses spécifiques situées au-dessus de 100 uma (par ionisation chimique). L'utilisation de l'ammoniac dilué à 10% dans le méthane présente les mêmes avantages que l'utilisation de l'ammoniac pur en minimisant fortement les inconvénients (pollution du système, attaque des joints, etc. ...). Les trois masses choisies pour la détection sont les 3 plus abondantes.

Dérivatisation par silylation. Le clenbuterol et le salbutamol ne peuvent pas être analysés dans leur forme normale, car leur stabilité et leur volatilité ne permet pas une bonne séparation chromatographique. On forme des dérivés avec le MSTFA (*N*-méthyl-*N*-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide). La réaction est celle du schéma.

Chromatogrammes et spectres: voir fig.3a.

5. Essais de colonnes immunosélectives

Les essais préliminaires se font avec une colonne de marque Radox. Celle-ci est normalement utilisée pour des analyses enzymatiques, elle contient des anti-

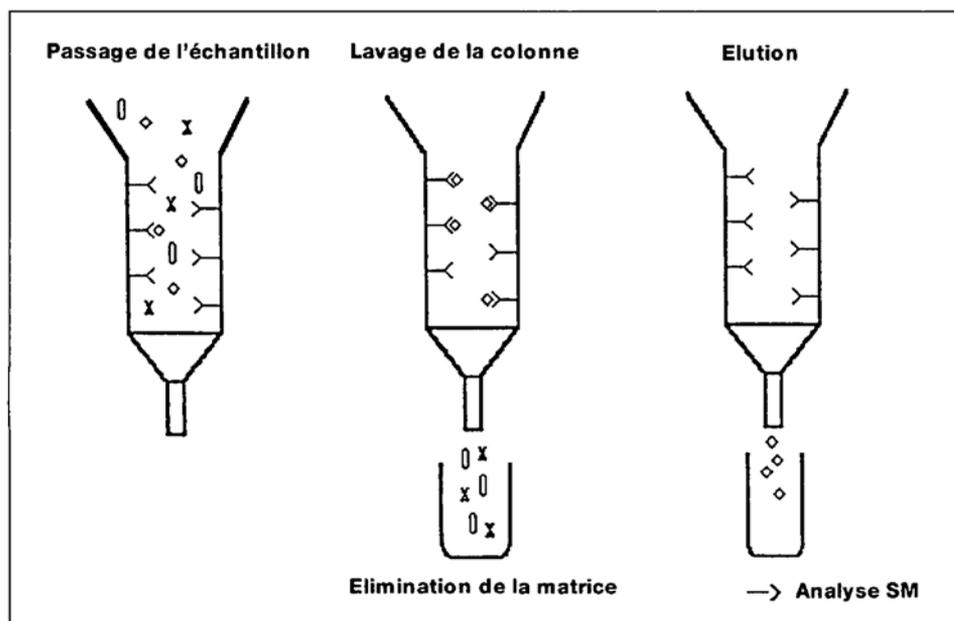


Fig. 2. Représentation schématique d'une séparation immunochimique

Tab. 2. Conditions chromatographiques

Type d'injecteur	Split/splitless
Vol. d'injection	2 μ l
Temp. de l'injecteur	150°
Mode d'injection	splitless 1 min
Gaz vecteur	He 15 psi
Type de colonne	HP-5 25 m x 0,2 mm x 0,11 mm
Temp. de départ	80° 1 min
Gradient de temp.	25°/min 150° 1 min 10°/min 250° 2 min

corps capables de fixer le clenbuterol. Il a été possible de détecter le clenbuterol dans de l'urine de porc jusqu'à une concentration d'environ 1 µg/l.

Les essais sont poursuivis sur des colonnes préparées avec deux gels du laboratoire d'hormonologie de Maloie (Belgique), l'un spécifique au clenbuterol et l'autre utilisable pour plusieurs β-agonistes (spécialement le salbutamol et le clenbuterol).

Mode opératoire. Le mode de préparation de la colonne est fourni par le fabricant. L'échantillon est introduit dans la colonne à l'aide d'une seringue et son passage dans la colonne est facilité en appliquant un léger vide dans le récipient de récupération. Le réglage du débit doit se faire de façon à ce que le processus dure environ 20 min. La colonne est ensuite lavée, puis le résidu est récupéré avec 5 ml de solution d'éluion. Ce dernier est évaporé à sec puis traité avec 200 ml de MSTFA. L'échantillon est ainsi prêt pour l'analyse CPG/SM.

5.1. Essais avec le gel N° 1

Pour tester cette colonne, des solutions standards sont éluées sur la colonne. Les masses absolues de clenbuterol passé sont de 25, 35, 50 et 500 ng.

Discussion des résultats. L'analyse CPG/SM n'a donné que de très faibles pics insignifiants par rapport au bruit de fond. Ces résultats ne peuvent pas être pris en considération pour le dépistage du clenbuterol. Cette colonne est inutilisable pour l'analyse du clenbuterol par voie chimique. Sa capacité est trop faible pour que les extraits obtenus soient mesurables. Bien que des traces soient détectables, la limite de détection ne satisfait pas la norme officielle fixée pour la viande (1 mg/kg).

5.2. Essais avec le gel N° 2

Ce gel ayant théoriquement une plus grande spécificité pour le salbutamol, quatre solutions standards sont éluées. Les masses absolues sont de 25, 35, 50 et 500 ng et le volume des solutions est de 50 ml.

Discussion des résultats. Les résultats obtenus montrent que la colonne est sélective pour le salbutamol, et que la capacité donnée par le fabricant est correcte. Sur les chromatogrammes, on remarque que les deux pic (de 50 et 500 ng) ont la même hauteur, ce qui démontre que la capacité de la colonne est effectivement de 50 ng pour le salbutamol.

Chromatogrammes: voir fig. 3b.

5.3. Essais avec de l'urine

Pour cet essai, on utilise de l'urine d'un veau ayant subi un traitement au salbutamol.

Schéma

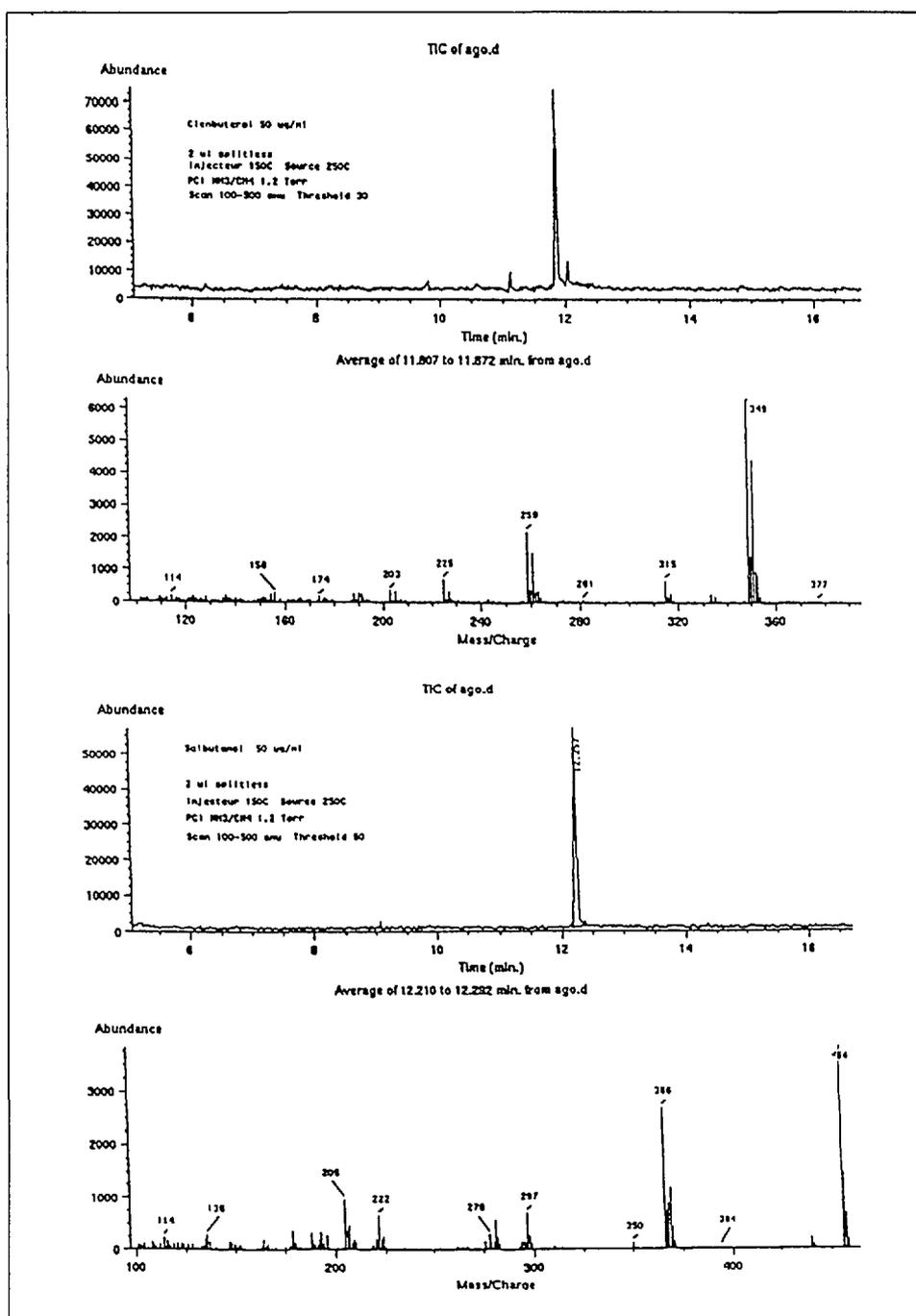
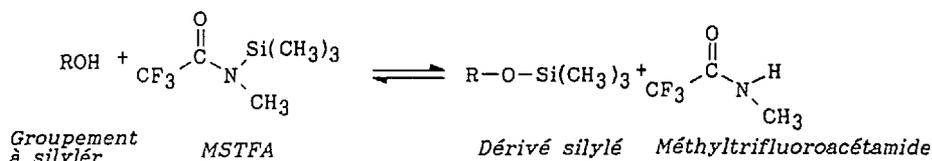


Fig. 3a. Spectres de masses

mol. Afin d'être sûr que la colonne ait toujours de l'affinité pour le salbutamol, on traitera une urine de veau négative avec ajout de salbutamol et une urine négative sans ajout.

Discussion des résultats. Le but fixé est atteint, le traitement au salbutamol d'un animal a pu être mis en évidence grâce à cette technique d'analyse.

5.4. Test croisé

La colonne étant également sélective au clenbuterol, son affinité a été comparée avec celle du salbutamol. Les masses absolues de chaque composé sont de 50 et 500 ng.

Discussion des résultats. Les résultats sont surprenants, mais très intéressants, car le pic du clenbuterol est nettement plus

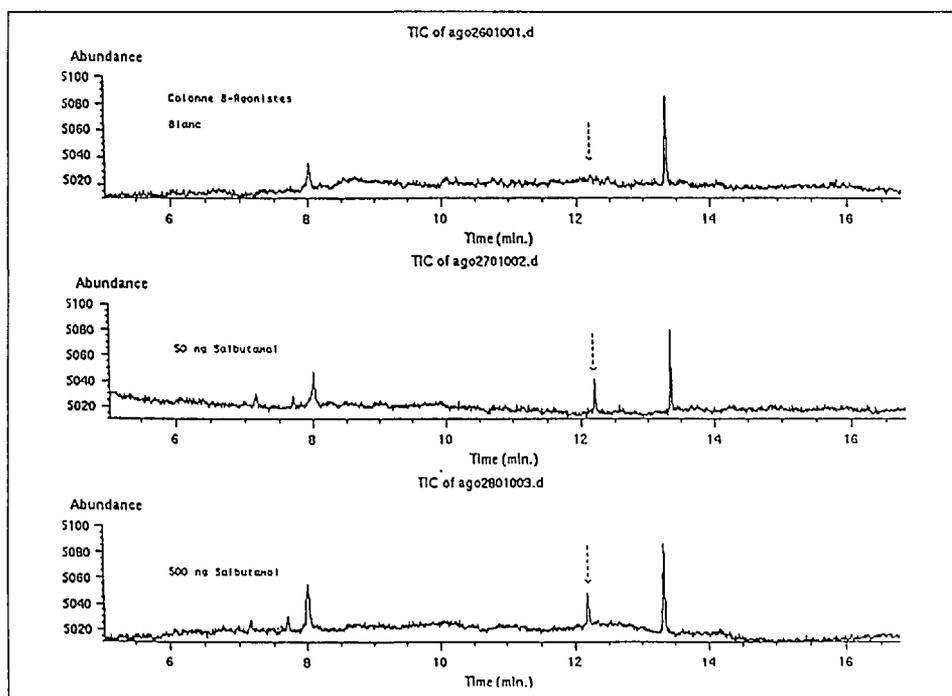


Fig. 3b. Spectres CPG

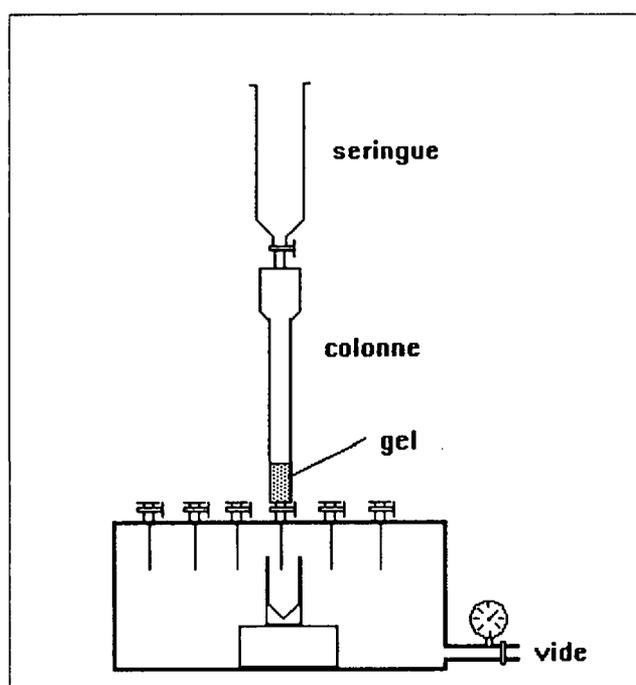


Fig. 4. Schéma du montage

visible que celui de salbutamol. De plus, la capacité pour le clenbuterol est plus grande que 50 ng.

Considérations sur le gel N° 2. Les résultats obtenus avec cette colonne ont été une révélation. En effet, il a été possible d'une part de mettre en évidence le traitement d'un veau au salbutamol par l'analyse de son urine, et d'autre part, chose très surprenante, il s'est avéré que cette colonne est encore meilleure pour le dépistage de clenbuterol. Elle peut donc être utilisée simultanément pour la confirmation de la présence de clenbuterol et de salbutamol.

6. Conclusion

Durant ce travail, deux gels contenant des anticorps sélectifs au clenbuterol et aux β -agonistes ont été testés.

Les résultats obtenus sont très intéressants, car ils permettent l'utilisation d'une seule colonne pour l'analyse de deux β -agonistes.

En effet, l'identification de clenbuterol et de salbutamol peut se faire avec une colonne contenant le gel d'immunoaffinité pour les β -agonistes, ce qui devrait confirmer, par CPG/SM, les résultats obtenus avec la méthode ELISA.

Pouvoir utiliser une seule colonne présente de nombreux avantages:

- Seule une faible quantité d'échantillon est nécessaire pour l'analyse des deux β -agonistes.
- Le passage de l'échantillon sur une seule colonne présente un gain de temps considérable.
- Le temps de l'analyse CPG/SM est plus court, car une seule injection fournit deux résultats.
- Le coût est réduit, car ces gels greffés sont très chers (entre 300 et 400 frs. le ml).
- La grande sélectivité de ces colonnes, associée à la sélectivité des masses en analyse SM et au temps de rétention sur la colonne chromatographique, font de cette technique une méthode d'identification très fiable.

Cette méthode présente quelques désavantages:

- La quantification est difficile, car le seuil de détection en SM est trop élevé. Il faudrait explorer d'autres conditions de mesure en CPG/SM.
- La réponse relativement faible obtenue sur le SM, liée à une capacité également faible de la colonne immunosélective sont les deux facteurs qui limitent la sensibilité. La sensibilité de cette méthode est évaluée à **2 mg/l d'urine**. Dans la situation actuelle, seule la méthode ELISA, moins sélective, permet de détecter des concentrations plus faibles.

Les résultats obtenus dans ce travail pourront être appliqués dans la mesure où la qualité de ces gels reste constante. Il est donc nécessaire de tester différents lots avant d'établir une méthode, alors la confirmation de la présence de clenbuterol et de salbutamol dans des concentrations ≥ 2 mg/l pourra se faire par analyse CPG/SM à l'aide d'une colonne d'immunoaffinité pour les β -agonistes.

Nos remerciements vont à Mess. Dr. R. Charrière et W. Leiser du laboratoire des viandes et produits carnés de la Fédération des Coopératives Migros, CH-1784 Courtepin, qui nous ont soutenus de leurs conseils tout au long de ce travail.

Reçu le 6 juillet 1994

- [1] J.F. Martinez Navarro, *Letters to the Editor* **1990**, 336, 1311.
- [2] 'Viande et produits carnés', INRA de Theix, 1990, vol. 2.
- [3] 'Principe de technique d'analyse', G. Linden, 1991, vol. 2.
- [4] 'Drugs Residues in Food Products of Animal Origin', Eds. V.K. Agarwal, Plenum Press, New York, 1992.
- [5] 'Food additives and contaminants', 1993, vol. 10.