

Diss. ETH No. 17318

**Vapor-phase infrared laser spectroscopy:
a complementary method for detecting
doping agents in urine**

A dissertation submitted to
ETH Zurich

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
Richard Bartlome
Dipl. Phys. ETH
born on December 18, 1977
citizen of Münchenbuchsee, Bern

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. M. W. Sigrist, examiner
Prof. Dr. J. Faist, co-examiner

2007

Summary

Doping controls are conducted in accredited laboratories worldwide. They present considerable analytical challenges, not only because sensitive and selective instrumentation is required, but also because results must be available quickly. Prohibited substances are typically detected by a mass spectrometer after painstakingly long sample preparations and chromatographic separation. Complementary methods would be welcome, e.g., to deliver results more quickly and to differentiate isomers or isotopes more accurately. To illustrate, ephedrine is prohibited for its stimulatory effects when its concentration in urine is greater than 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, whereas pseudoephedrine, its rather inactive diastereoisomer, is legal.

This thesis focuses on the development of novel infrared laser-based instruments designed to detect organic molecules, such as doping agents, in the vapor phase. The in-house-built instruments consist of an OPG-based photoacoustic spectrometer and a DFG-based multipass transmission spectrometer. The completion of these spectrometers relies on two critical developments: the construction of a widely and continuously tunable laser source in the 3 to 4 μm fingerprint region and the adaptation of sensitive trace-gas sensing devices for measurements in vapors.

The optical parametric generator (OPG) produces several mW of mid-IR radiation. Over 300 cm^{-1} can be scanned continuously by tuning the temperature of a periodically poled lithium niobate crystal (PPLN). Vapor-phase infrared spectra of pure low-melting point ($< 160\text{ }^\circ\text{C}$) solid organic compounds are recorded in a heated photoacoustic cell, stabilized at $60\text{ }^\circ\text{C}$. Represen-

tative samples of various doping substance classes are examined, including metoprolol tartrate (beta-blocker), methandienone (anabolic), etacrynic acid (diuretic), nikethamide and mephentermine sulfate (stimulants). They show specific absorption bands between 2800 and 3100 cm^{-1} , where molecular C-H stretching vibrations are excited. Further measurements are taken on Ephedra alkaloids. On the one hand, the optical resolution of 8 cm^{-1} is good enough to discriminate ephedrine from methylephedrine. On the other hand, it is inadequate at distinguishing ephedrine from pseudoephedrine. The OPG-based photoacoustic spectrometer is a simple and cost-effective instrument to record vapor-phase spectra. However, the risk of contamination due to condensation inside the photoacoustic cell is high, because the cell cannot be heated above 60 °C, the maximum permissible temperature of high-responsivity miniature microphones.

The PPLN-based difference frequency generator (DFG) has an improved linewidth of only 150 MHz ($5 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$). In gas sensing applications, such devices are usually tuned over 1-2 cm^{-1} as a result of a simple piezo scan. To meet our requirements, the continuous tuning range of the DFG was extended to 329 cm^{-1} by simultaneously tuning the PPLN temperature and the step motor of an external cavity. The tuning mechanism is fully automated. Vapor-phase infrared spectra are recorded in a in-house-built high-temperature multipass cell (HTMC).

The HTMC is a novel type of compact long-path absorption cell that can withstand temperatures up to 723 K. The mirrors are heated separately and may be kept at a higher temperature than the rest of the cell in order to prevent condensation. Therefore, measurements on condensable vapors are feasible, in addition to measurements on heated gases. The HTMC has a compensation mechanism for thermal expansion that prevents fatal optical misalignments. The HTMC is successfully tested by acquiring methane and water vapor absorption lines at different temperatures. The wide tuning capabilities of the DFG are demonstrated by recording the whole C-H stretching absorption band of acetone vapor at 296, 400 and 500 K.

The HTMC combined with the widely and continuously tunable DFG offers a unique analytical tool for probing liquid and solid organic samples in the vapor phase. In order to display the large selective potential of the spectrometer, quantitative measurements, reported for the first time, are taken on ephedrine and pseudoephedrine. Despite featuring similarities, the vapor-phase infrared spectra of these diastereoisomers are clearly distinguishable with respect to a vibrational band centered at 2970.5 and 2980.1 cm^{-1} , respectively. The detection limits (SNR=3) of pure ephedrine and pure pseudoephedrine are 12 and 6 μg , respectively. Their effective absorption cross sections are as strong as the main C-H stretching vibrational peak of acetone ($\tilde{\sigma} = 1.5 \cdot 10^{-19} \text{ cm}^2$).

Direct examination of urine with the DFG-based multipass transmission spectrometer is hindered by the strong water content of urine and the thermal degradation of urea. For this reason, urine samples are first prepared by means of liquid-liquid extraction, then evaporated in the HTMC. Ephedrine-positive and pseudoephedrine-positive human urine samples have distinguishable vapor-phase infrared spectra. The detection limit of ephedrine in human urine is 50 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, when 10 mL and 20 mL urine are prepared, respectively. In principle, it can be improved to approximately 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with an appropriate sample preparation procedure.

The analytical method developed in this thesis could readily serve as a complementary tool to confirm certain positive findings, using the “B” probe of an athlete. The majority of doping agents, however, must be traceable in urine at ng/mL concentrations, requiring 3 orders of magnitude lower detection limits. Temperature deviations of the PPLN currently limit the instrumental noise to 0.3–0.5 % and the minimum detectable absorption coefficient to $2.6 \times 10^{-6} \text{ cm}^{-1}$ (SNR=3). The laser spectrometer has room for much improvement. Its potential is discussed with respect to doping agents detection and further applications.

Résumé

Les contrôles anti-dopage sont effectués dans des laboratoires accrédités à travers le monde. Ils posent un défi considérable de par la sensibilité et la sélectivité requises des instruments de mesure, mais aussi du fait que les résultats doivent être prêts rapidement. Les substances interdites sont en général détectées par un spectromètre de masse après de longues et pénibles préparations et une séparation chromatographique. Des méthodes complémentaires seraient la bienvenue, par exemple, afin de différencier des isomères ou des isotopes plus précisément, ou bien encore pour fournir des résultats plus rapidement. Pour citer un exemple, l'éphédrine est interdite pour ses effets stimulants lorsque sa concentration dans l'urine est supérieure à $10 \mu\text{g/mL}$, tandis que la pseudoéphédrine, sa diastéréoisomère plutôt inactive, est légale.

Le sujet de cette thèse est le développement de nouveaux spectromètres à laser infrarouge qui permettent de détecter des molécules organiques, telles que les produits dopants, en phase vapeur. Ces spectromètres consistent en un générateur optique paramétrique (OPG) couplé à un système de détection photoacoustique, ainsi qu'un générateur de différence de fréquence (DFG) couplé à une cellule de détection à passages multiples. La réalisation de ces instruments repose sur deux développements critiques : la construction d'un laser continûment accordable dans l'infrarouge moyen entre 3 et $4 \mu\text{m}$ et l'adaptation pour des mesures en phase vapeur d'appareils utilisés en principe pour la détection de traces de gaz.

L'OPG délivre plusieurs mW de radiation dans l'infrarouge moyen. Une

plage de plus de 300 cm^{-1} est continûment accordable par le biais du réglage de la température d'un cristal de niobate de lithium à polarisation périodiquement inversée (PPLN). Les spectres infrarouges en phase vapeur de substances organiques à point de fusion relativement bas ($< 160\text{ °C}$) sont enregistrés dans une cellule photoacoustique dont la température est stabilisée à 60 °C . Des échantillons représentatifs de différentes classes de substances dopantes sont examinés. Ils révèlent des bandes d'absorption spécifiques entre 2800 et 3100 cm^{-1} . Des mesures supplémentaires sont effectuées sur des alcaloïdes de plantes du genre *Ephedra*. La résolution optique de 8 cm^{-1} est suffisante pour distinguer l'éphédrine de la méthyléphédrine, mais elle demeure insuffisante pour distinguer l'éphédrine de la pseudoéphédrine. L'OPG couplé au système photoacoustique est un outil analytique simple et peu coûteux qui permette d'enregistrer des spectres infrarouges de vapeurs. Toutefois, le risque de condensation à l'intérieur de la cellule photoacoustique est élevé, parce que la cellule ne peut pas être chauffée au-delà de la température de bon fonctionnement des microphones miniatures ultrasensibles.

Le DFG, également basé sur un PPLN, a une résolution de 150 MHz seulement ($5 \cdot 10^{-3}\text{ cm}^{-1}$). Dans l'optique de détecter des traces de gaz, de tels lasers sont généralement accordables sur une plage de 1 à 2 cm^{-1} à l'aide d'un transducteur piézoélectrique. Pour le besoin de notre application, cette plage d'accord est étendue à 329 cm^{-1} grâce au réglage continu et simultané de la température du PPLN et du moteur pas à pas d'une cavité externe. Ce réglage est complètement automatisé. Les spectres infrarouges en milieu vapeur sont enregistrés dans une cellule à haute température et à passages multiples (HTMC).

La HTMC est un nouveau type de cellule compacte à long chemin d'absorption optique qui peut supporter des températures allant jusqu'à 723 K . Les miroirs sont chauffés séparément et peuvent être réglés à une température plus élevée que le reste de la cellule afin d'empêcher la condensation de vapeurs. Ainsi, en sus des traditionnelles mesures sur des gaz, des mesures sur des vapeurs sont possibles. La HTMC incorpore un système mécanique

de compensation thermique permettant d'éviter des dérèglements optiques. La HTMC a été testée avec succès en enregistrant des lignes d'absorption de méthane et de vapeur d'eau à différentes températures. La large plage d'accord du laser a été mise à l'épreuve en enregistrant toute une bande d'absorption de vapeur d'acétone à 296, 400 et 500 K.

La HTMC combinée au DFG offre un outil unique d'analyse d'échantillons liquides ou solides en milieu vapeur. Afin de démontrer le caractère très sélectif de la méthode, des mesures infrarouges quantitatives sont entreprises pour la première fois sur des échantillons d'éphédrine et de pseudoéphédrine. Malgré des similitudes, les spectres infrarouges de ces diastéréoisomères sont clairement distinguables, particulièrement par rapport à une bande de vibration centrée respectivement à 2970.5 et 2980.1 cm^{-1} . La limite de détection (SNR=3) de l'éphédrine pure et de la pseudoéphédrine pure sont respectivement 12 et 6 μg . Leur section efficace d'absorption effective est aussi élevée que la bande de vibration C-H de l'acétone ($\tilde{\sigma} = 1.5 \cdot 10^{-19} \text{ cm}^2$).

La forte teneur en eau de l'urine et la dégradation de l'urée ne permettent pas l'examen direct d'un échantillon d'urine avec le DFG couplé à la HTMC. Les échantillons sont de ce fait préparés au préalable à l'aide d'une extraction liquide-liquide avant d'être évaporés dans la HTMC. Les échantillons d'urine humaine positive à l'éphédrine et à la pseudoéphédrine ont des spectres bien distincts. La limite de détection de l'éphédrine dans l'urine humaine est de 50 et 25 $\mu\text{g/mL}$, lorsque respectivement 10 mL et 20 mL d'urine sont préparés. En principe, la limite de détection peut être améliorée à environ 1 $\mu\text{g/mL}$ à l'aide d'une méthode de préparation appropriée.

La méthode analytique développée dans le cadre de cette thèse pourrait déjà servir de méthode complémentaire pour confirmer certains tests positifs. Néanmoins, la majorité des produits dopants doivent être décelables dans l'urine à des concentrations de l'ordre du ng/mL nécessitant une limite de détection 3 ordres de grandeur inférieure. Le spectromètre est perfectible par bien des aspects. Son potentiel pour la lutte anti-dopage est discuté. D'autres applications sont également suggérées.