

Filière Technologies du vivant

Orientation Chimie analytique

Travail de bachelor Diplôme 2017

Nicolas Wernli

*Dosage de cannabinoïdes dans les fluides
biologiques par GC-MS*

- *Professeur*
Jean-Manuel Segura
- *Expert*
Dr. Nicolas Donzé
- *Date de la remise du rapport*
18.08.2017

Dosage de cannabinoïdes dans les fluides biologiques par GC-MS

Diplômant Nicolas Wernli

Objectif du projet

Ce travail de bachelor avait deux objectifs :

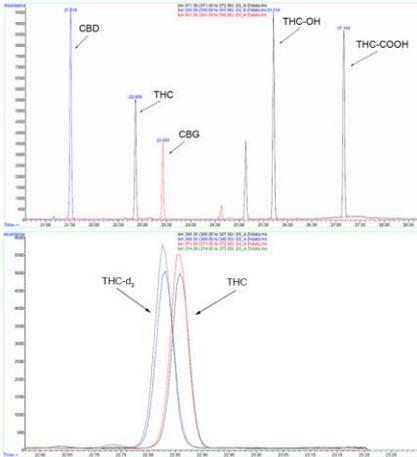
1. Développer, optimiser et valider une méthode de dosage par GC-MS dans le sang complet des composants et métabolites du cannabis incluant la quantification du cannabidiol et du cannabigerol.
2. Montrer la spécificité et la sensibilité des tests à écoulement latéral Nal von Minden pour le THC-COOH dans le cadre de l'étude FABER.

Méthodes | Expériences | Résultats

La méthode visait à quantifier cinq substances (THC, THC-OH, THC-COOH, CBD et CBG) présentes dans le sang après consommation de cannabis. Les échantillons sanguins ont d'abord été soumis à une extraction liquide-liquide puis à une séparation sur phase solide à l'aide d'un échangeur cationique. Les cinq composés présents dans l'extrait ont été dérivatisés avec du BSTFA, puis séparés par chromatographie en phase gazeuse et quantifiés par spectrométrie de masse à l'aide de standards internes deutérés pour chaque analyte.

La méthode a pu être partiellement validée et a pour l'instant rempli tous les critères de performance en termes de justesse, précision, linéarité, limite de quantification, spécificité et sélectivité. La méthode n'a cependant pas pu être validée pour le cannabigerol.

En ce qui concerne les tests à écoulement latéral Nal von Minden, 53 échantillons ont été analysés par GC-MS selon un protocole déjà établi et les résultats ont été comparés avec ceux obtenus à l'aide des tests à écoulement latéral. Ceux-ci se sont révélés très fiables en termes de justesse et spécificité, mais avec une sensibilité par contre limitée par le cut-off à 50 µg/L.



Travail de diplôme
 | édition 2017 |

Filière
 Technologies du vivant

Domaine d'application
 Chimie analytique

Professeur responsable
 Jean-Manuel Segura
 jmanuel.segura@hevs.ch

Partenaire
 Hôpital du Valais
 Institut Central
 Service de Chimie Clinique et
 Toxicologie

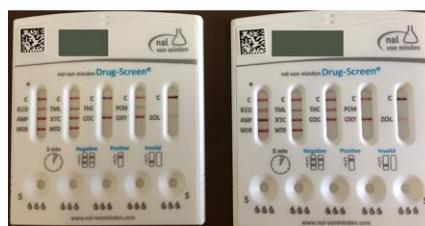


Figure 1
 Tests à écoulement latéral DrugScreen® de Nal von Minden : à gauche un test positif au THC-COOH, à droite un test négatif.

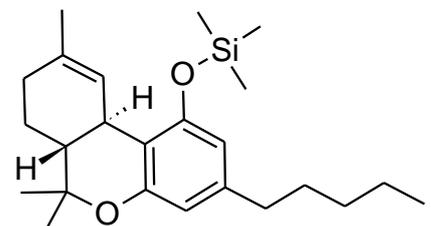


Figure 2
 Molécule de tétrahydrocannabinol (THC) dérivatisée avec du BSTFA

Table des matières

1	Introduction.....	3
1.1	Le cannabis et les cannabinoïdes.....	3
1.2	Le cannabigerol.....	3
1.3	Le cannabidiol.....	5
1.4	Stratégie de quantification.....	6
1.5	Le test à écoulement latéral Nal von Minden.....	7
2	Matériels et méthodes.....	8
2.1	Réactifs.....	8
2.2	Matériel et appareillage.....	8
2.3	Méthode.....	9
2.3.1	Préparation des solutions d'étalonnage.....	9
2.3.2	Procédure d'étalonnage.....	10
2.3.3	Contrôle de qualité interne.....	10
2.3.4	Préparation des échantillons.....	10
2.3.5	Extraction liquide-liquide.....	10
2.3.6	Extraction liquide-solide.....	11
2.3.7	Dérivatisation.....	11
2.3.8	Méthode GC-MS pour la quantification.....	11
2.3.9	Statistique.....	12
3	Résultats.....	13
3.1	Méthode initiale.....	13
3.2	Choix de l'agent de dérivatisation.....	14
3.3	Amélioration de la méthode GC.....	15
3.4	Choix des masses.....	16
3.5	Choix du volume d'injection.....	17
3.6	Amélioration de l'extraction en phase solide.....	18
3.7	Validation.....	21
3.7.1	Sélectivité.....	21
3.7.2	Spécificité.....	21
3.7.3	Linéarité.....	22
3.7.4	Justesse.....	23
3.7.5	Précision.....	25
3.7.6	Limite de quantification.....	25
3.7.7	Effet mémoire.....	25
3.7.8	Limite de détection est stabilité.....	26
3.8	Deuxième validation.....	26
3.8.1	Linéarité.....	27
3.8.2	Justesse.....	28
3.8.3	Précision.....	29
3.8.4	Limite de quantification.....	29
3.9	Nal von minden.....	30
4	Discussion.....	31
4.1	Validation.....	31
4.2	Tests à écoulement latéral Nal von Minden.....	31
5	Conclusions et perspectives.....	32
6	Remerciements.....	32
7	Bibliographies.....	33
8	Annexes.....	34

Abréviations utilisées :

MeOH	Méthanol
ACN	Acétonitrile
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse
THC	Tétrahydrocannabinol
THC-OH	11-hydroxy-tétrahydrocannabinol
THC-COOH	11-nor-9-carboxy-tétrahydrocannabinol
CBD	Cannabidiol
CBG	Cannabigerol
-d ₃	Molécule dont trois hydrogènes ont été remplacé par autant de deutériums
CV	Coefficient de variation
t _R	Temps de rétention
SPE	Extraction sur phase solide
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
SEP	Sclérose en plaques
MTBSTA	N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide (agent de dérivation)
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (agent de dérivation)
Mel	Iodométhane
NaOH	Hydroxyde de sodium
CQ	Contrôle Qualité
Mode SCAN	Balayage des rapport m/z allant de 50 à 550 (réglable)
Mode SIM	Uniquement les masses désirées sont quantifier avec un écart de ±0.5 m/z, le mode SIM augmente considérablement la sensibilité
EIC	Cromatogramme extracted ions
ppb	Partie par milliard, 1 ppb = 1 µg/L

1 Introduction

Ce travail, en collaboration avec le laboratoire de toxicologie de l'hôpital Cantonal de Sion, a deux objectifs.

1. Le développement et la validation d'une méthode de quantification du cannabidiol et du cannabigerol dans le sang complet par GC-MS.
2. Montrer la spécificité et la sensibilité des tests à écoulement latéral Nal von Minden concernant le cannabis pour l'étude Faber.

A l'heure actuelle l'hôpital de Sion dispose d'une méthode d'extraction et de quantification pour 3 analytes, le THC, le THC-OH et le THC-COOH. Avec une LOQ de 1 µg/L pour les deux premiers et de 4 µg/L pour le THC-COOH cette méthode est déjà validée et est utilisée dans la routine pour les analyses de police et médicale.

La nouvelle méthode devrait permettre la quantification de deux nouveaux analytes, le CBG et le CBD. Il s'agit d'améliorer et modifier la méthode existante pour pouvoir quantifier les 5 cannabinoïdes en même temps avec une sensibilité égale ou meilleure que celle de la méthode existante. L'intérêt de pouvoir quantifier la concentration de CBD et CBG dans le sang est purement médicale. Le CBD est actuellement utilisé en Suisse dans certains médicaments et une quantification permettrait d'avoir un suivi du patient tout au long de son traitement. De plus les deux analytes ont un temps de demi-vie beaucoup plus court que celui du THC (Preedy 2017) et une quantification permettrait de différencier une consommation récente de cannabis d'une consommation habituelle mais pas récente.

1.1 Le cannabis et les cannabinoïdes

Le cannabis est un genre botanique qui rassemble les plantes de la famille des *Cannabaceae*. De nombreux principes actifs sont présents comme des cannabinoïdes, terpénoïdes (Ross and ElSohly 1996), flavonoïdes (Vanhoenacker et al. 2002) et alcaloïdes (Turner et al. 1976). Les cannabinoïdes sont une classe de terpène phénolique unique de la plante de *Cannabis*, se trouvant principalement dans les trichomes (Kim and Mahlberg 1997) de la plante (fines excroissances ou appendices). Des 80 et plus cannabinoïdes isolés de la plante de *C. sativa* (Elsohly and Slade 2005) le Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC) est celui qui possède les propriétés psychoactives les plus importantes, en plus d'être le cannabinoïde le plus abondant dans la plante de *Cannabis*.

Le cannabis est de loin la substance la plus consommée parmi les substances illicites en Suisse, et ceci malgré le fait que la loi sur les stupéfiants en interdise la consommation. En 2012 29.5% de la population Suisse entre 15 et 49 ans déclarait avoir déjà essayé du cannabis au moins une fois dans leur vie. Ce pourcentage est en constante augmentation depuis 1997, passant de 18.9% en 1997, à 20.9% en 2002 et à 25.5% en 2007 (Office fédéral de la statistique 2014).

La consommation de cette drogue, outre les problèmes de santé, est problématique aussi pour la circulation routière. En effet, comme tant d'autres, elle altère le jugement et les réflexes du consommateur (Sewell, Poling, and Sofuoglu 2009) et le rendent inapte à la conduite. La loi suisse fixe à 1.5 µg/L la limite de THC admise dans le sang pour les conducteurs ("Legge federale sugli stupefacenti e sulle sostanze psicotrope" 1951).

1.2 Le cannabigerol

Le cannabigerol est un cannabinoïde non psychoactif présent en faible quantité dans la plante de cannabis. Le cannabigerol est un précurseur à court terme du THC et du CBD, ce qui explique sa basse concentration dans la plante qui est de l'ordre de 10% des cannabinoïdes totaux (Meijer and Hammond 2005). Le cannabigerol inhibe directement la production de PGE₂, l'enzyme PLA₂ et de manière non spécifique l'enzyme COX. Ceci

confère à ce cannabinoïde une propriété antiinflammatoire utilisé depuis des millénaires en médecine traditionnelle et récemment en médecine classique.

Comme d'autre pythocannabinoïdes le CBG s'est montré efficace dans la réduction de la prolifération de plusieurs ligné de cellules cancérogènes, comme celles du cancer du sein, de la prostate et du tract colon-rectal (Ligresti et al. 2006). La Figure 1 montre les possibles applications thérapeutiques du CBG. Malgré le fait que son efficacité ait été prouvée les mécanismes d'actions restent pour le moment inconnu.

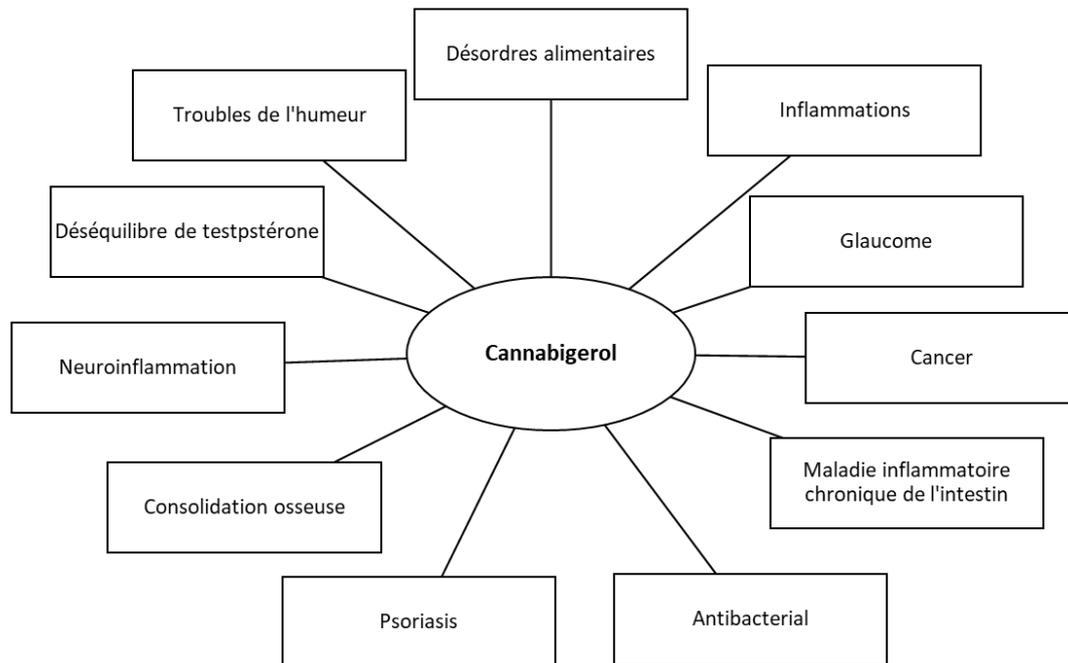


Figure 1:
Possibles applications thérapeutiques du cannabigerol (Preedy 2017)

Le CBG est aussi utilisé par le patient atteint de SEP car il possède un effet neuroprotecteur en empêchant le déclin de la viabilité cellulaire.

Sa quantification a un intérêt médical plutôt que légal, elle permettrait en effet un suivi des patient en consommant pour des raisons thérapeutiques.

1.3 Le cannabidiol

Le cannabidiol est un métabolite non psychoactif de la plante de cannabis. Il possède des propriétés sédative, hypnotiques, anticonvulsif et antioxydantes. Les effets bénéfiques du CBD pour le traitement de certaines maladies humaines sont énumérés dans le Tableau 1.

Tableau 1:

Maladies pour les quelles un traitement à base de CBD a apporté à une amélioration des symptômes (Preedy 2017)

Potentiels effets bénéfiques du CBD chez l'être humain

Ischémie	Diabète
Chorée de Huntington	Polyarthrite rhumatoïde
Maladie de parkinson	Sclérose latérale amyotrophique
Sclérose ne plaques	Comportement obsessionnel-compulsif
Maladie d'Alzheimer	Dépression
Maladie à prions	Anxiété
Epilepsie	Schizophrénie
Cancer	Psychose

Pour ce qui concerne la sclérose en plaques deux modèles animaux ont été étudiés ; EAE et TMEV. Il a été démontré que le cannabidiol améliore la symptomatologie des deux modèles animaux en diminuant l'inflammation et l'activité microgliale.

A l'heure actuelle, en Suisse il existe 3 médicaments sous prescription contenant du cannabidiol, le Sativex®, Cesamet® (Nabilone) et Marinol® (dronabinol).

Comme pour le CBG la quantification du cannabidiol à uniquement un intérêt médical.

1.4 Stratégie de quantification

La quantification de cannabinoïdes dans le sang complet est un grand défi dicté avant tout par la très basse limite de quantification imposée par la loi (1.5 µg/L) et surtout par la matrice complexe qui est le sang. Dans la littérature la quantification de cannabinoïdes est usuellement effectuée dans du plasma ou du sérum, des matrices beaucoup plus propres en termes d'impureté qui pourraient gêner la détection par spectre de masse. Les appareils usuellement utilisés sont le LC-MS ou le GC-MS, qui permettent d'atteindre une sensibilité très basse. Le choix du GC-MS a été imposé par l'hôpital, ayant uniquement cet appareil à disposition pour les analyses sur le sang.

Pour ce qui concerne la préparation de l'échantillon celle-ci se déroule en trois étapes :

1. **Séparation liquide-liquide** : pour précipiter les globules rouges et autres cellules présentes dans le sang
2. **Extraction en phase solide (SPE)** : pour séparer les cannabinoïdes des autres composés encore présents dans l'échantillon et pour finir une
3. **Dérivatisation** : indispensable pour rendre les cannabinoïdes volatiles et donc analysable par GC.

Pour améliorer la sensibilité de la méthode et éviter un biais induit par le rendement de l'extraction sur colonne (SPE) un standard interne deutéré est ajouté pour chacune des substances. Ce standard interne, dont la concentration est la même pour chaque échantillon, contrôle et étalon, sert aussi à identifier les pics lors de concentration très basse, car le temps de rétention est très proche et la concentration utilisée est assez haute pour être visible avec simplicité. Le standard interne peut aussi donner une indication sur la qualité et le fonctionnement de l'extraction ; un signal de substance deutéré très bas est signe d'une extraction ayant mal fonctionné. Pour la quantification c'est le rapport entre le signal de la substance (THC par exemple) et la substance deutéré (THC-d₃) qui est utilisé, la Figure 2 montre un exemple de droite de calibration utilisant uniquement le signal du THC en comparaison avec une droite de calibration utilisant le rapport entre les deux.

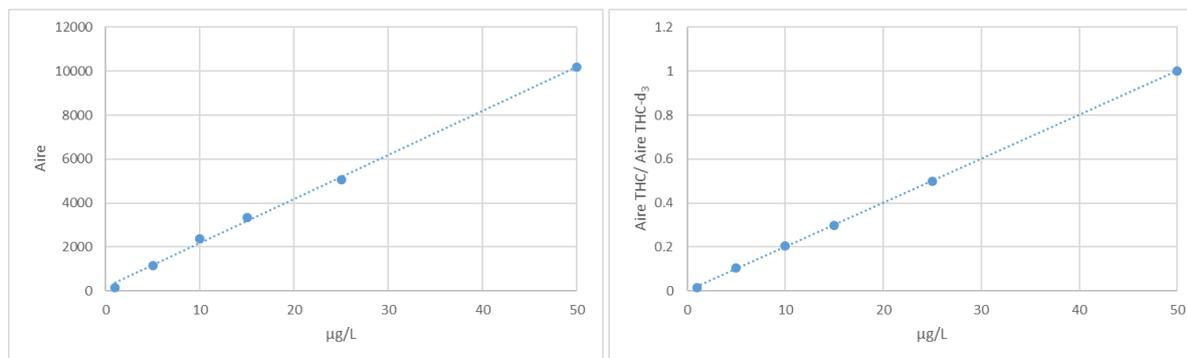


Figure 2:

Sur la gauche une droite de calibration pour le THC en utilisant uniquement l'aire de la substance sur l'axe des y et la concentration théorique sur l'axe des x. Sur la droite le rapport entre l'aire de substance deutéré et la substance et utilisé. Le coefficient de détermination est de 0.9981 pour la droite de gauche et de 0.9999 pour celle de droite.

Les standards internes deutérés sont facilement reconnaissable des substances car les pics en MS ont un rapport m/z à +3 des pics de la substance. Ceci est dû à la masse du deutérium qui est de 1 g/mol supérieur à celle de l'hydrogène.

1.5 Le test à écoulement latéral Nal von Minden

Le DrugScreen® rapid test de Nal von Minden GmbH est un test de dépistage rapide de drogues basé sur des échantillons d'urines. Le test nécessite 3 gouttes d'urines et est capable en 5 minutes de relever la présence de 11 drogues différentes ; amphétamines, benzodiazépines, cocaïne, ecstasy, opiacés, méthadone, oxycodone (analgésique), paracétamol, cannabinoïdes, tramadol (antalgique) et zolpidem (hypnotique). Ce test a une basse spécificité par rapport à d'autres tests rapides (DrugWipe®, RapidSTAT® ou DrugTest®) mais est l'un des meilleurs en termes de détection de THC-COOH (Musshoff et al. 2014). Le cut-off pour les cannabinoïdes est de 50 ng/mL.

Le but du travail sur le DrugScreen® est de montrer la spécificité et la sensibilité du test concernant le cannabis pour l'étude Faber.

L'étude Faber est une étude sur la fertilité masculine en Suisse qui, dans le cadre du Programme national de recherche « Perturbation endocriniens : importance pour les êtres humains, les animaux et les écosystèmes », se concentre sur l'impact de l'environnement sur la fertilité et le système reproducteur masculins en Suisse. Pour cette étude les données de 3'000 volontaires ont été récoltées par le biais du Service Médico-militaire lors du recrutement (Fondation Faber 2005).

Le test rapide DrugScreen® serait d'utilité pour tester rapidement les échantillons d'urines des 3000 volontaire et pouvoir ainsi sélectionner les consommateurs fréquents de cannabis pour pouvoir étudier l'impact d'une consommation régulière de cannabis sur la fécondité masculine.

Dans le cas de ce travail 50 échantillons d'urine provenant de l'étude Faber ont été analysés avec le test rapide DrugScreen® et avec la méthode de quantification de THC-COOH par GC-MS.

2 Matériels et méthodes

2.1 Réactifs

Les réactifs utilisés lors des différentes expériences sont listés dans le Tableau 2.

Tableau 2:
Réactifs utilisés

Nom	N. Référence	Fabbricant
Acétone	1.00020.1000	Merck
Acide ortho-Phosphorique 85%	1.00563.1000	Merck
NaOH	1.06498.1000	Merck
Méthanol	1.06007.2500	Merck
Ethyle acétate	1.00868.1000	Merck
n-Hexane	1.04391.1000	Merck
BSTFA + TMCS, 99:1	33154-U	Merck
Acide acétique (glacial) 100%	1.00063.1000	Merck
Hydroxyde de sodium	1.06498.1000	Merck
Hydroxyde de potassium	1.05033.1000	Merck
Dichlorométhane	1.06044.1000	Merck
(±)-11-Hydroxy- Δ^9 -THC	H-027	Cerilliant
(±)-11-Hydroxy- Δ^9 -THC-D3	H-041	Cerilliant
(-)-11-nor-9-Carboxy- Δ^9 -THC	T-019	Cerilliant
(±)-11-nor-9-Carboxy- Δ^9 -THC-D3	T-004	Cerilliant
(-)- Δ^9 -THC	T-005	Cerilliant
(-)- Δ^9 -THC-D3	T-003	Cerilliant
Cannabigerol (CBG)	C-141	Cerilliant
Cannabidiol	C-045	Cerilliant
Cannabidiol-D3	C-084	Cerilliant

2.2 Matériel et appareillage

Le matériel utilisé lors des différentes expériences est cité ci-dessous.

- Matériel usuel de laboratoire
- Chromatographes, GC 7890A, Agilent Technologies
- Spectromètre de masse, MS 5975C Triple-Axis Detector, Agilent Technologies
- Passeur automatique d'échantillon liquides, ALS Injector 7683, Hewlett Packard
- Colonne, Colonne HP-Ultra 2 ((5%-Phenyl)-methylpolysiloxane, 25 m x 0.2 mm x 0.33 μ m)
- Colonne SPE, Bond Elut Certify, 130 mg 3 mL, 12102051, Agilent Technologies
- Visiprep™ SPE Vacuum Manifold, 57265 SUPELCO, Merck
- Tubes en verre de 5, 10 et 15 mL
- Bond Elut Certify, 12102051, Agilent Technologies

2.3 Méthode

2.3.1 Préparation des solutions d'étalonnage

CBD, CBG, THC et THC-OH, 200 µg/L :

Une solution à 100 mg/L est préparée en additionnant 20 µL de la solution à 1 g/L à 980 µL de méthanol.

100 µL de la solution à 100 mg/L sont versés dans un ballon jaugé de 10 mL, le tout est ajusté au trait de jauge avec du méthanol et vortexé quelques secondes.

THC-d₃ et THC-OH-D3, 1000 µg/L :

100 µL de la solution à 100 mg/L sont versés dans un ballon jaugé de 10 mL, le tout est ajusté au trait de jauge avec du méthanol et vortexé quelques secondes.

CBD- d₃, 1000 µg/L :

10 µL de la solution à 1 g/L sont versés dans un ballon jaugé de 10 mL, le tout est ajusté au trait de jauge avec du méthanol et vortexé quelques secondes.

THC-COOH, 1000 µg/L :

Une solution à 100 mg/L est préparée en additionnant 100 µL de la solution à 1 g/L à 900 µL de méthanol.

100 µL de la solution à 100 mg/L sont versés dans un ballon jaugé de 10 mL, le tout est ajusté au trait de jauge avec du méthanol et vortexé quelques secondes.

THC-COOH- d₃, 2000 µg/L :

200 µL de la solution à 100 mg/L sont versés dans un ballon jaugé de 10 mL, le tout est ajusté au trait de jauge avec du méthanol et vortexé quelques secondes.

Les ampoules ouvertes et les préparations d'étalons se conservent au congélateur une année ou jusqu'à la date de péremption si celle-ci est plus courte qu'une année.

2.3.2 Procédure d'étalonnage

La droite d'étalonnage est réalisée à partir des étalons à différentes concentrations des substances recherchées. La préparation des étalons est effectuée selon le Tableau 3.

Tableau 3:

Préparation des étalons, des contrôles et des échantillons. Les solution standards et deutérées sont évaporées avant l'ajout du sang. Pour les étalons du sang humain ne contenant aucune drogue est utilisé

Substance	Etalon 1	Etalon 2	Etalon 3	Etalon 4	Etalon 5	Etalon 6	Echantillons ou Contrôles
CBD	1.0 µg/L	5.0 µg/L	10.0 µg/L	15.0 µg/L	20.0 µg/L	50.0 µg/L	
THC	1.0 µg/L	5.0 µg/L	10.0 µg/L	15.0 µg/L	20.0 µg/L	50.0 µg/L	
CBG	1.0 µg/L	5.0 µg/L	10.0 µg/L	15.0 µg/L	20.0 µg/L	50.0 µg/L	
THC-OH	1.0 µg/L	5.0 µg/L	10.0 µg/L	15.0 µg/L	20.0 µg/L	50.0 µg/L	
THC-COOH	4.0 µg/L	40.0 µg/L	80.0 µg/L	120.0 µg/L	160.0 µg/L	200.0 µg/L	
Sang	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL
CBD à 200 µg/L	10 µl	50 µl	100 µl	150 µl	200 µl	500 µl	-
THC à 200 µg/L	10 µl	50 µl	100 µl	150 µl	200 µl	500 µl	-
CBG à 200 µg/L	10 µl	50 µl	100 µl	150 µl	200 µl	500 µl	-
THC-OH à 200 µg/L	10 µl	50 µl	100 µl	150 µl	200 µl	500 µl	-
THC-COOH à 1000 µg/L	8 µl	80 µl	160 µl	240 µl	320 µl	400 µl	-
CBD-D3 à 1000 µg/L	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
THC-D3 à 1000 µg/L	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
THC-OH-D3 à 1000 µg/L	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
THC-COOH-D3 à 2000 µg/L	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

Avant l'ajout de l'échantillon ou du contrôle interne, les solutions d'étalonnage et de standards internes doivent être évaporées sous flux d'azote.

2.3.3 Contrôle de qualité interne

Les contrôles internes sont choisis en fonction de la matrice de l'échantillon. Le contrôle négatif est du sang humain.

Pour la validation des contrôles internes ont été fait en dopant du sang humain à différentes concentrations.

2.3.4 Préparation des échantillons

Les échantillons sont préparés selon le Tableau 3. Pour chaque échantillon ou contrôle les substances deutérées sont ajoutées dans un tube en verre de 15 mL et évaporées sous flux d'azote. Une fois évaporé, 2 mL du sang à analyser est ajouté et le tout est vortexé quelques secondes.

2.3.5 Extraction liquide-liquide

5 mL d'acétone sont ajoutés à chaque échantillon, contrôle et étalon et le tout est vortexé 60 secondes. Les échantillons sont centrifugés 8 minutes à 3000 t/min et la phase

organique (phase supérieur) est recueilli dans un tube à essai en verre de 10 mL. Chaque échantillon est évaporé sous flux d'azote à 35°C jusqu'à un volume d'environ 2 mL. A la phase 4 mL d'acide phosphorique sont ajoutés avec 600 µL de NaOH 0.25 M.

2.3.6 Extraction liquide-solide

Une colonne Bond Elut Certify par étalon, contrôle et échantillon est préparée sur le système d'extraction Visiprep. Chaque colonne est conditionnée avec 2 mL de méthanol puis 2 mL d'acide phosphorique 50 mM avec un léger vide. Sans laisser sécher les colonnes les échantillons sont déposés et laissés couler lentement avec un très léger vide. Une fois l'échantillon vidé dans la colonne les tubes à échantillons sont rincés avec 3 mL d'acide phosphorique 50 mM et le liquide est versé à nouveaux dans la colonne (sans laisser sécher la colonne). Les colonnes sont rincées avec 3 mL d'un mélange acide phosphorique 50 mM / méthanol (80:20) avec un léger vide.

Une fois l'élution complétée les colonnes sont séchées à l'aide d'un Q-Tips et les aiguilles sont essuyées.

Les colonnes sont séchées durant 30 minutes sur le système d'extraction en actionnant le vide maximal, après 15 minutes 200 µL d'hexane sont ajoutés dans chaque colonne.

Les dérivés de cannabis sont extraits avec 3 mL d'un mélange d'hexane / acétate d'éthyle (80 :20) et l'éluant est récolté dans un tube en verre de 5 mL.

L'éluant est évaporé sous un flux d'azote à température ambiante.

2.3.7 Dérivatisation

75 µL de BSTFA + 1% TMCS sont ajoutés dans chaque tube, les tubes sont fermés à l'aide d'un bouchon, vortexés brièvement et chauffés 30 min à 60 °C sur un bloc chauffant. Après deux minutes, les tubes sont vortexés à nouveaux brièvement pour solubiliser les éventuels débris présents sur les bords.

Les échantillons sont récupérés dans un micro-flacon, centrifugés 10 min à 2500 t/min et injectés au GC-MS.

2.3.8 Méthode GC-MS pour la quantification

L'analyse par GC-MS est faite le jour même de l'extraction. La méthode optimisée et utilisés pour la partie validation est la suivante ;

- Colonne : HP-Ultra 2 ((5%-Phenyl)-methylpolysiloxane, 25 m x 0.2 mm x 0.33 µm)
- Phase mobile : Helium
- Four :
 - Température initiale : 100 °C
 - Temps d'équilibrage : 2 minutes
 - Gradient : 7°C/min jusqu'à 280 °C, 1 minutes de hold time
 - Post run : 5 min à 320 °C
- Injecteur :
 - Volume d'injection : 2 µL
 - Mode : pulsed splitless
 - Température : 260 °C
 - Pression : 28.79 psi
 - Pression du pulse : 60 psi
 - Temps de pulse : 0.75 minutes
- Détecteur ;
 - Délai de solvant : 20.50 minutes
 - Groupe 1 : Cannabidiol

- Fenêtre : 20.50 – 22.50 minutes
- Masses [m/z]: 337.20, 340.20, 390.20, 393.20
- Groupe 2 : THC
 - Fenêtre : 22.50 – 23.20 minutes
 - Masses [m/z]: 371.3, 374.3, 386.3, 389.3
- Groupe 3 : Canabigerol
 - Fenêtre : 23.20 – 25.00 minutes
 - Masses [m/z]: 377.00, 391.30, 460.30
- Groupe 4 : THC-OH
 - Fenêtre : 25.00 – 26.50 minutes
 - Masses [m/z]: 371.3, 372.3, 374.3, 375.3
- Groupe 5 : THC-COOH
 - Fenêtre : 26.50 minutes
 - Masses [m/z]: 371.3, 372.3, 374.3, 375.3

La méthode est présentée en détail à l'Annexe 1.

2.3.9 Statistique

Recouvrement :

Le recouvrement sert à mesurer la justesse d'une valeur, il est normalement exprimé en pourcentage.

$$\text{Recouvrement [\%]} = \frac{\text{Valeur calculée}}{\text{Valeur théorique juste}} \cdot 100$$

Coefficient de variation :

Le coefficient de variation est une mesure relative de la dispersion des données autour de la moyenne, il permet de comparer le degré de variation d'un échantillon à un autre.

$$CV [\%] = \frac{s}{\bar{x}}$$

Où s représente l'écart type de l'échantillon et \bar{x} comme la moyenne de l'échantillon.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

Coefficient de détermination :

Le coefficient de détermination est une mesure de la qualité de la prédiction d'une régression linéaire, elle est définie comme le rapport entre la variance expliquée et la variance totale.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

Avec y_i les valeurs des mesures, \hat{y}_i les valeurs prédites et \bar{y} la moyenne des mesures.

3 Résultats

La grande difficulté de la quantification n'est pas dans la séparation des 5 composés mais plutôt dans l'extraction et la dérivation. Le sang est une matrice très complexe et contenant énormément de macro et micro molécules qui peuvent interférer lors de l'analyse MS. En plus de ceci la sensibilité demandée, 1 ppb, est très basse et demande donc une extraction qui comporte le moins de perte de cannabinoïdes possibles et une dérivation complète.

Les essais ont été conduits sur du sang humain dopé avec les 5 cannabinoïdes. Tout échantillon est préparé et analysé le jour même. Les substances sont conservées au congélateur dans du méthanol et la préparation des échantillons se fait comme décrit au chapitre « Préparation des échantillons »

3.1 Méthode initiale

Les premiers essais ont été faits en suivant le protocole d'extraction et de quantification de l'hôpital cantonal de Sion (Annexe 2). La méthode existante, déjà validée, permet de quantifier trois cannabinoïdes, THC, THC-OH et THC-COOH, dans le sang et dans le plasma. Cette méthode utilise comme agent de dérivation du iodométhane qui agit sur le groupe phénol du THC comme montré à la Figure 3.

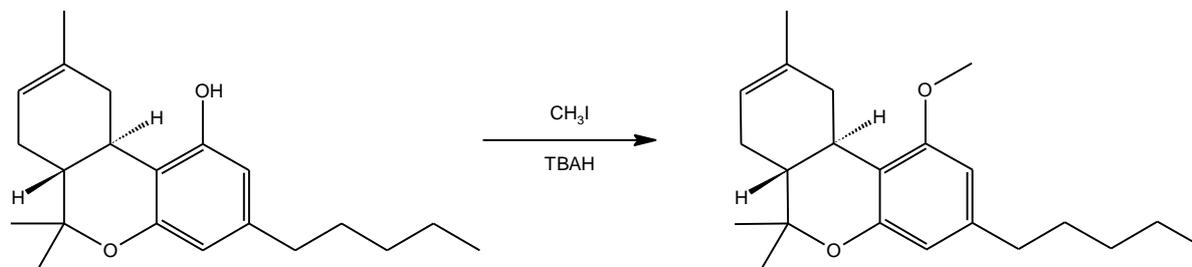


Figure 3:

Méthylation du THC avec iodométhane (TBAH comme base forte). Pour le THC-COOH la méthylation a lieu aussi sur l'acide carboxylique

Pour ces essais les 5 cannabinoïdes ont été dérivatisés sans passer par l'extraction liquide-liquide et la SPE à de grandes concentrations et injectés dans le GC-MS avec la méthode GC (Annexe 3) déjà existante en mode SCAN. La Figure 4 montre les résultats obtenus. Il est possible d'observer que les pics du CBD et du CBG ne sont pas visibles, ceci peut être dû à trois raisons différentes :

1. Les deux composées ne sont pas dérivatisables avec le iodométhane
2. La réaction de dérivation a un faible rendement et l'intensité des pics est trop faible
3. Les composées sortent avec un temps de rétention supérieur à 30 minutes.

Selon la littérature (Nadulski et al. 2005) le temps de rétention du cannabidiol est très proche de celui du THC, ce qui indique que la dérivation ne marche pas assez bien ou pas du tout pour le cannabidiol et le cannabigerol.

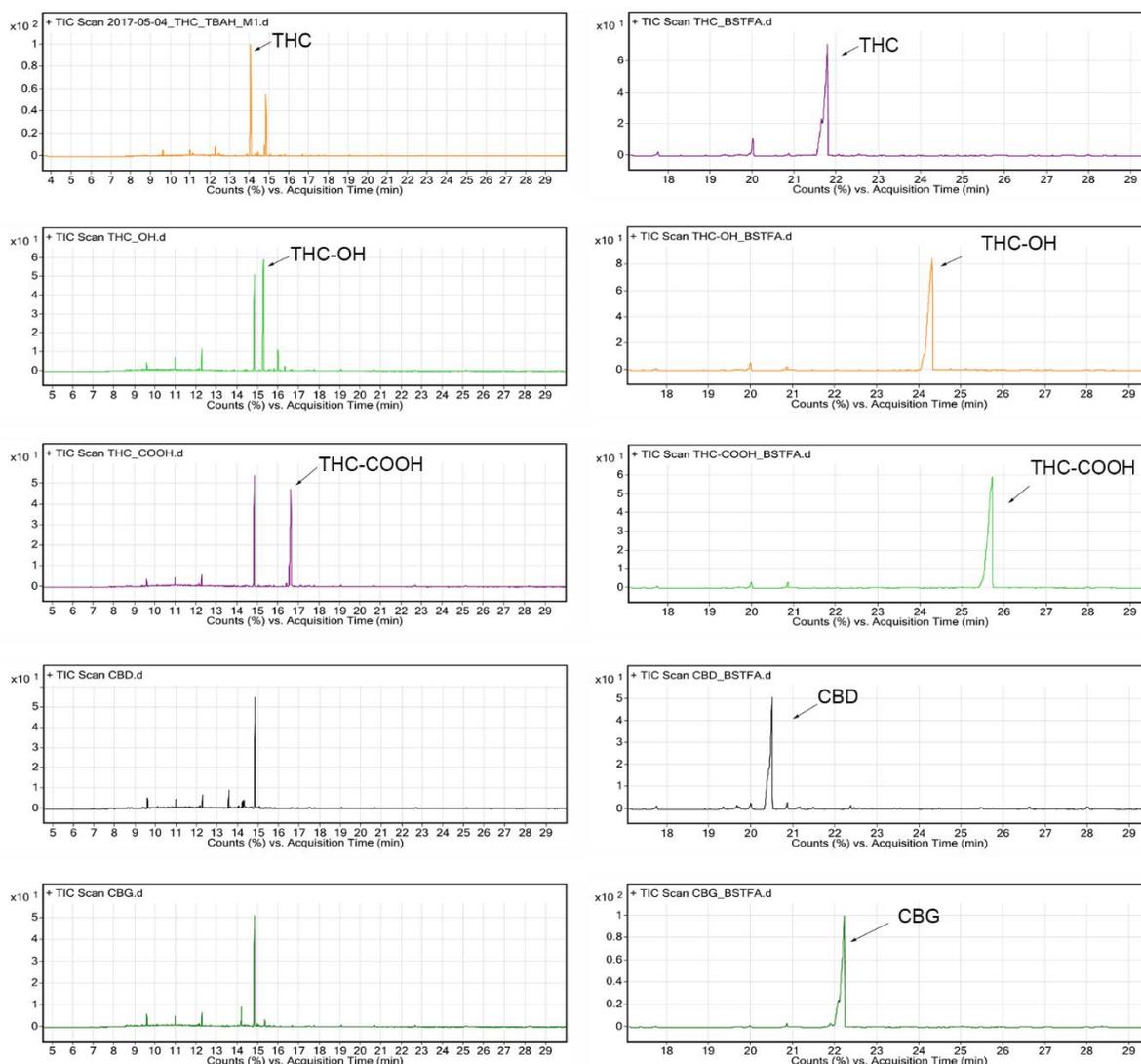


Figure 4: Sur la gauche : chromatogrammes des 5 composés dérivatisés avec du Mel/TBAH. Sur la droite : chromatogrammes des 5 composés dérivatisés avec du BSTFA avec un plus petit gradient de température

3.2 Choix de l'agent de dérivatisation

Pour les cannabinoïdes deux méthode de dérivatisation sont habituellement utilisées, la méthylation et la silylation. Les méthodes de méthylation incluent des réactifs comme Mel/TBAH, Mel/NaOH et Mel/LiAlH₄. Comme montré dans le paragraphe précédent, la méthylation avec Mel/TBAH ne marche pas pour le CBD et le CBG, la seule qui marche pour le 5 composées (Mel/NaOH) n'est pas assez efficace pour atteindre une limite de détection de 1 µg/L (Nadulski et al. 2005).

La silylation est effectué avec des réactifs comme le BSTFA et le MTBSTFA. L'avantage de ces agents de dérivatisation est que les réactions sont très rapides, possèdent un excellent rendement et les échantillons peuvent être injectés directement avec le réactif de dérivatisation. La Figure 5 montre la réaction de dérivatisation entre le BSTFA et le THC.

Les deux réactifs ont été testés et le BSTFA a été choisi pour sa disponibilité commerciale et son plus haut rendement. La Figure 4 montre les pics des 5 cannabinoïdes après dérivatisation avec du BSTFA aux mêmes concentrations que lors des essais avec le Mel/TBAH. La méthode a été changée en diminuant le gradient de température pour éviter

une superposition de pics. Tous les nouveaux essais ont été effectués en dérivatisant les cannabinoïdes avec du BSTFA.

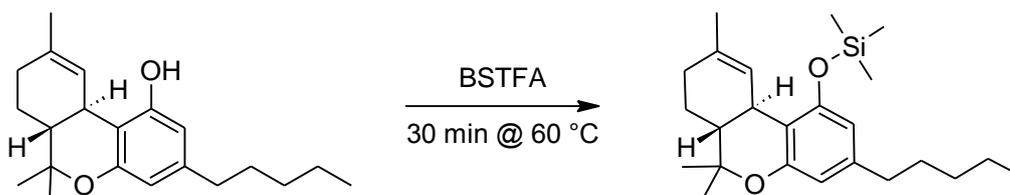


Figure 5: Silylation du THC avec du BSTFA, pour le THC-COOH la silylation a lieu aussi sur l'acide carboxylique

3.3 Amélioration de la méthode GC

La méthode de séparation par chromatographie gausseuse a été effectuée sur une colonne HP Ultra 2 ((5%-phenyl)-methylpolysiloxane). A basse concentration, la séparation des cannabinoïdes peut être effectuée avec un gradient de 20°C/min en partant de 130 °C jusqu'à 300 °C. Ceci permet une analyse rapide en 15 minutes, les pics sont montrés à la Figure 6.

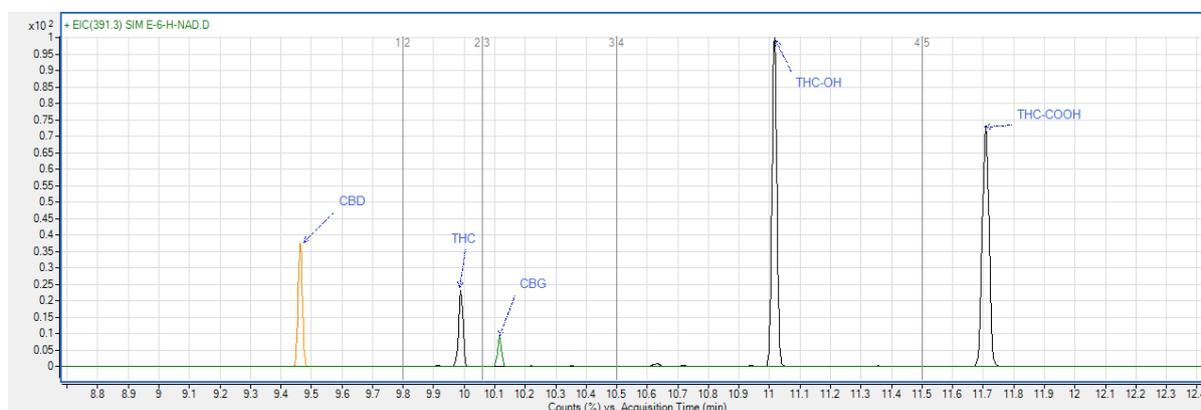


Figure 6: Superposition des 5 EIC de chaque cannabinoïdes pour une séparation avec un gradient de température de 20°C/min

Malgré la bonne séparation des pics de cannabinoïdes trop de pics parasite sont présents et couvrent les cinq pics d'intérêt à basse concentration. De plus, à haute concentration, la largeur des pics augmente et les pics du THC et CBG se chevauchent en empêchant une correcte quantification. Pour cette raison le gradient de température a été modifié à 7°C/min. Le Tableau 4 montre les réglages utilisés pour le four GC.

Tableau 4: Gradient de température de la méthode GC utilisée pour la séparation des cannabinoïdes

	Gradient	Température	Hold time
Initial		100 °C	2 min.
Rampe 1	7 °C/min	280 °C	1 min.
Post run		320 °C	5 min.

Cette méthode, d'une durée totale de 33 minutes permet une séparation optimale sans qu'aucune interférence due aux composés présents dans le sang ne couvre les pics des cannabinoïdes. La Figure 7 montre la séparation obtenue avec la méthode finale.

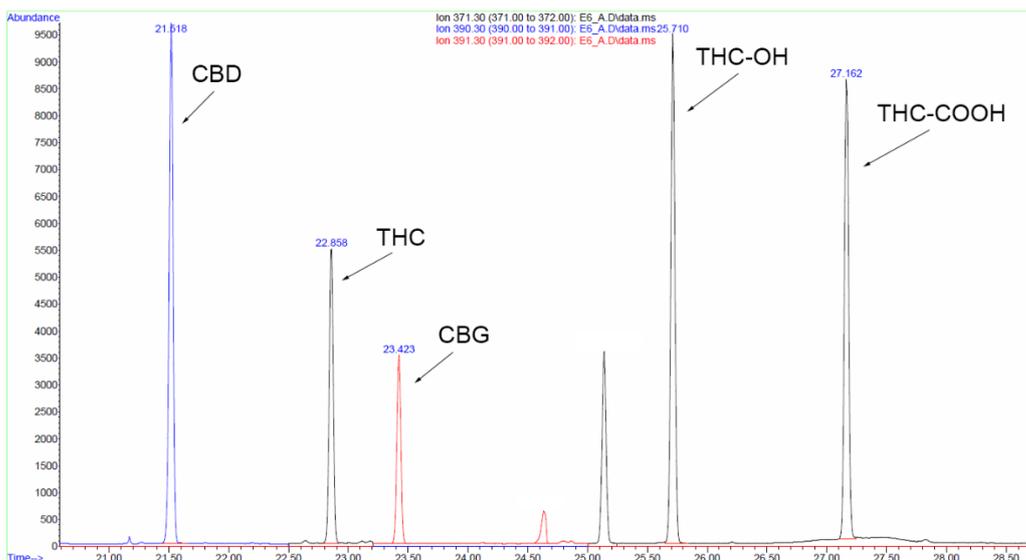


Figure 7: Temps de rétention et ordre d'élution des 5 cannabinoïdes avec la méthode décrite dans le Tableau 4

Cette méthode est utilisée pour les expériences suivantes, un petit changement des t_R peut être observé à cause du changement d'appareil et de colonne.

3.4 Choix des masses

Pour le choix des masses à utiliser en MS chaque cannabinoïde a été injecté en mode SCAN pour obtenir un spectre de masse, un exemple pour le cannabidiol est montré à la Figure 8. Deux facteurs ont été pris en compte : l'absence d'impureté ayant la même masse et un temps de rétention proche et l'abondance de la masse pour permettre une détection à basse concentration.

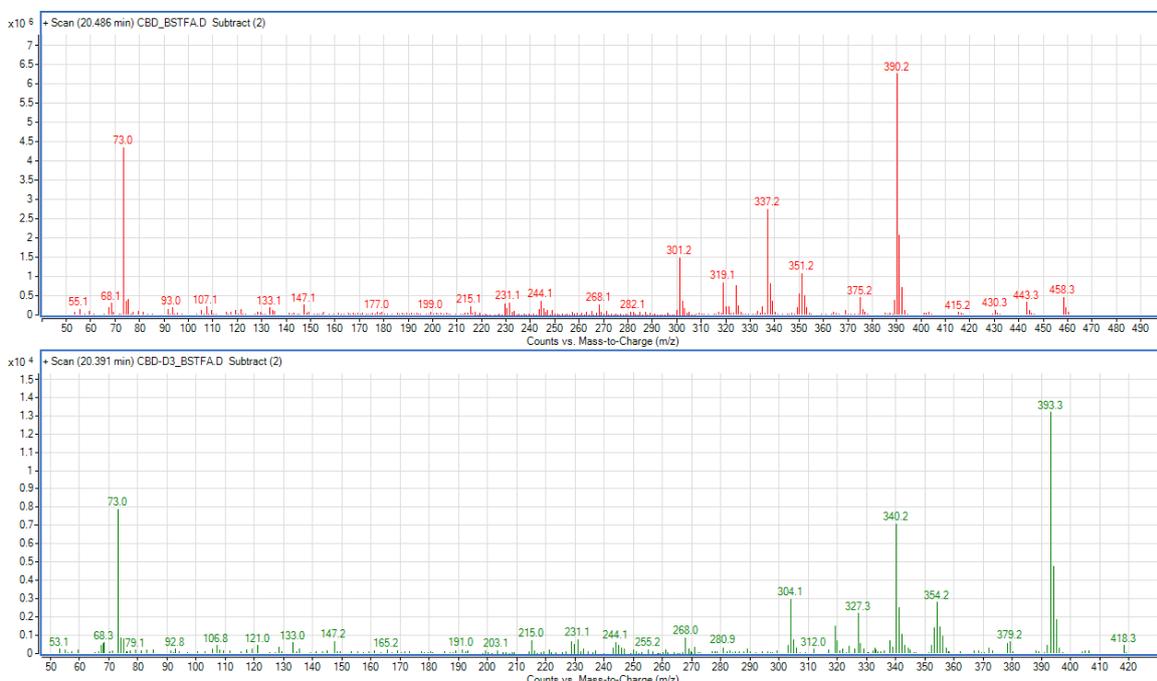


Figure 8: En haut : spectre de masse du cannabidiol dérivatisé avec du BSTFA. En bas : spectre de masse du cannabidiol-d₃ dérivatisé avec du BSTFA

Pour chaque analyte deux masses sont nécessaires au minimum, une pour la quantification « quantifier » et une pour s'assurer qu'il s'agit de la bonne substance et permettre au

logiciel de quantification de détecter automatiquement le pic, le « qualifier ». Une fois les masses choisies, celles-ci sont scannées uniquement dans une fenêtre de temps autour du temps de rétention de l'analyte pour ne pas saturer le détecteur et permettre une meilleure sensibilité. Le Tableau 5 résume les masses utilisées pour chaque cannabinoïdes, le temps de rétention et la fenêtre utilisée.

Tableau 5:
Temps de rétentions et masses utilisées en mode SIM

Analyte	m/z utilisé en mode SIM*	Temps de rétention (min) [‡]	Fenêtre de temps (min)
CBD-d ₃	393.3 , 340.3	21.49	20.50-22.50
CBD	390.3 , 337.3	21.53	
THC-d ₃	389.3 , 374.3	22.83	22.50-23.20
THC	386.3 , 371.3	22.87	
CBG	391.3 , 377, 460.3	23.43	23.20-25.00
THC-OH-d ₃	374.3 , 375.3	25.69	25.00-26.50
THC-OH	371.3 , 372.3	25.72	
THC-COOH-d ₃	374.3 , 375.3	27.14	26.50-28.00
THC-COOH	371.3 , 372.3	27.17	

* Quantifier en bold

‡ Varie en fonction de la longueur de la colonne

3.5 Choix du volume d'injection

Le mode d'injection pour les cannabinoïdes est en splitless, ce type d'injection est utilisé pour l'analyse de traces et permet l'introduction du volume entier d'injection dans la colonne. Le choix du volume influence deux facteurs ; d'un côté un grand volume d'injection (3µL) permet d'obtenir des pics avec une plus grande intensité et permet donc d'augmenter considérablement la sensibilité. En contrepartie un volume d'injection plus petit (1µL) évite une saturation du détecteur et un encrassement de la colonne à long terme. Lors de la mise au point de la méthode il s'est avéré qu'une injection de 1µL ne permettait pas d'obtenir une sensibilité suffisante pour détecter la concentration de 1.5µg/L. Deux autres volumes ont été testés, 2 et 3 µL, les chromatogrammes sont montrés à la Figure 9 pour la masse 374.3 et les pics du THC-OH et THC-COOH.

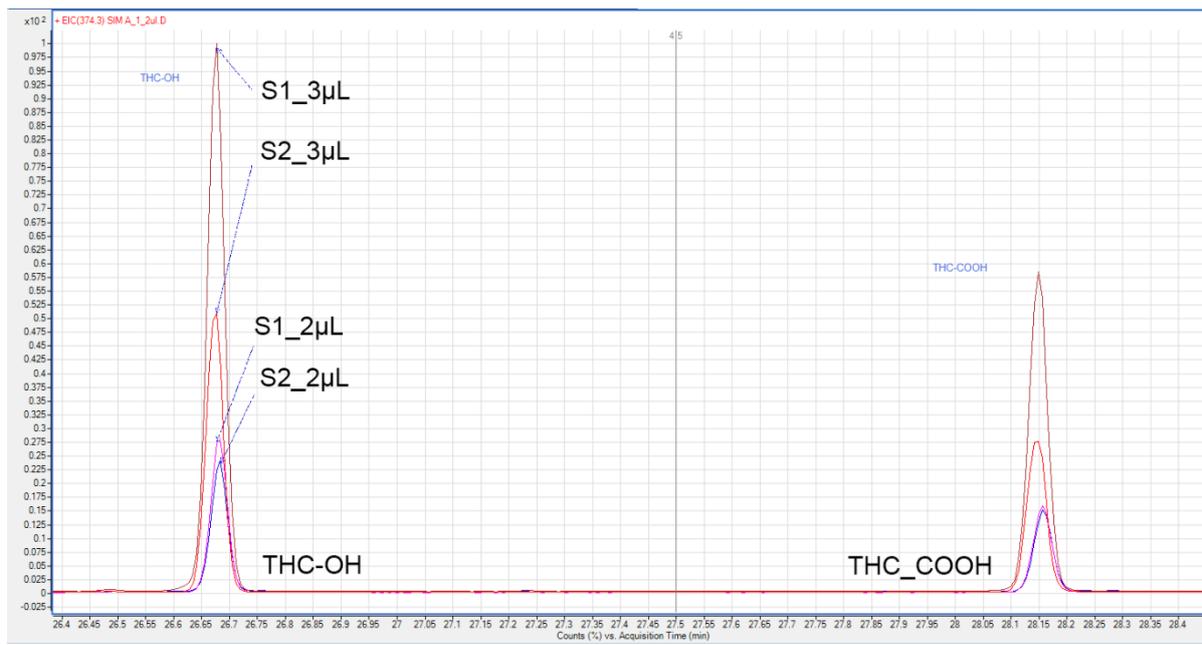


Figure 9:
Comparaison des volumes d'injection de 2 et 3 µL pour deux échantillon S1 et S2

Malgré le fait qu'un volume d'injection de 3 µL donne un signal plus grand ceci pose des problèmes à haute concentration. Pour les étalons à 160 et 200 µg/L un effet de fronting a été remarqué ainsi que des pic très larges et aplatis, ceci semble suggérer une saturation de la colonne et pour cette raison un volume d'injection de 2µL en mode splitless a été choisi.

3.6 Amélioration de l'extraction en phase solide

Il existe différentes méthodes d'extraction de cannabis dans le sang. Certaines utilisent uniquement une extraction liquide-liquide (Purschke et al. 2016) (Thomas et al. 2007), d'autres passent par une SPE après une première extraction liquide-liquide (Karschner et al. 2010) (Nadulski et al. 2005) (Agilent Technologies 2014). Peu de différences sont présentes entre un protocole et l'autre, il s'agit principalement du type de solvant utilisé des volumes utilisés et des temps de centrifugation. Le Tableau 8 résume les différentes méthodes d'extraction utilisées dans la littérature et trouvés dans le manuel d'instruction des colonnes Bond Elut Certify (utilisées pour la SPE).

En se basant sur ces différentes méthodes et sur la méthode déjà validée par l'Hôpital de Sion quatre différentes exactions ont été testées en changeant le solvant d'extraction, en ajoutant un lavage avant extraction et en changeant le solvant de l'extraction liquide-liquide. Les différents essais, nommés A, B, C et D sont résumés dans le Tableau 6 et les résultats sont montrés dans le Tableau 7.

Tableau 6:

Essais A, B, C et D pour l'amélioration de la méthode d'extraction. Solvant L-L correspond au solvant utilisé pour l'extraction liquide-liquide, Lavage correspond au solvant utilisé pour le dernier lavage avant l'élution, Solvant extraction correspond au solvant utilisé pour l'élution

Extraction	Solvant L-L	Lavage	Solvant extraction
A	acétone	-	hexane / acétate d'ethyle
B	acétonitrile	-	hexane / acétate d'ethyle
C	acétone	200 µL hexane	hexane / acétate d'ethyle
D	acétone	200 µL hexane	acétonitrile

Tableau 7:

Résultats des 4 essais, l'aire du THC a été utilisée pour décider la meilleure méthode d'extraction. n.d = non détectable

	Aire substance-d₃	Aire substance	Rapport x100
A	99389	2571	2.59
B	96136	1644	1.71
C	37435	1068	2.85
D	4096	n.d	-

Le but étant d'avoir une aire la plus grande possible pour la substance, la méthode C a été retenue. Cette méthode est décrite dans le chapitre « Méthode ».

Tableau 8:
Différentes méthodes trouvées dans la littérature utilisées pour l'extraction de cannabinoïdes dans le sang

Author	Purschke	Nadulski	Karschner	Thomas	Agilent Tech	Bond elut Certify Manual
Sample Amount	Serum 1 mL 5 mL n-hexane/ethyl acetate (9/1) Centrifugation @ 2500g organic phase	Plasma 1 mL 1 mL acetate buffer 0.1 M Centrifugation	Plasma 1 mL 3 mL ACN Centrifugation @ 1800g 10 min 2 °C Supernatant added to 5 mL H2O	Blood 500 uL 100 uL acetic acid 10% 2.5 mL hexane/ethyl acetate (9/1) Centrifugation @ 4350 rpm 10 min	Blood 2 L 4 mL cold ACN Centrifugation @ 2500 rpm 5 min evaporate to 3 mL 7 mL sodium acetate buffer 0.1 M pH 6	Blood 1 mL 1 mL ACN Centrifugation 5 mL acetic acid 100 mM
L/L	100 uL HCl 1M 5 mL n-hexane/ethyl acetate (9/1) Centrifugation @ 2500g organic phase	6 mL H2O 6 mL MeOH 2 mL acetate buffer pH 4 Sample wash 1 mL acetic acid 0.1 M 2 mL H2O/ACN (6/4)	1 mL hexane/ethyl acetate/acetic acid (49/49/2) 1 mL MeOH 1 mL H2O Sample wash 2 mL H2O/ACN/ammonium hydroxyde (84/15/1)	Conditioning 2 mL MeOH 2 mL sodium acetate buffer 0.1 M 5% MeOH pH 6	Conditioning 2 mL MeOH 2 mL phosphoric acid 50 mM	
SPE	1 mL acetic acid 0.1 M 2 mL H2O/ACN (6/4)	Sample wash 2 mL acetate buffer pH 4 1 mL acetic acid 0.1 M 2 mL H2O/ACN (6/4)	Sample wash 2 mL H2O/ACN/ammonium hydroxyde (84/15/1)	Sample wash 2 mL sodium acetate buffer pH 6 dry column for 5 minutes	Sample wash 2 mL MeOH 2 mL sodium acetate buffer 0.1 M 5% MeOH pH 6 Sample wash 2 mL MeOH 2 mL phosphoric acid 50 mM	Sample wash 9 mL phosphoric acid 50 mM 3 mL phosphoric acid 50 mM / MeOH (8/2) Dry column for 10 minutes
		Elution 1.8 mL ACN	Elution 3 mL hexane/ethyl acetate/glacial acetic acid (49/49/2)	Elution 1 mL hexane	Elution 1 mL hexane Derivatisation 50 uL BSTFA 1% TMCS 20 minutes @ 70°C	

3.7 Validation

Pour la validation la méthode décrite au chapitre « Méthode » a été utilisée. La validation a été effectuée sur 3 jours. Chaque jour 2 courbes de calibration et 3 niveaux de contrôles qualité préparés 5 fois ont été injectés. Les contrôles qualité, dopés à partir de sang humain, ont été calculés selon la première courbe de calibration. La deuxième, injectée en fin de séquence, a été utilisée uniquement pour la linéarité.

Pour rappel la quantification est effectuée sur les quantifier montrés dans le Tableau 5.

3.7.1 Sélectivité

Trois échantillons ont été préparés, un blanc qui contient les standards internes deutérés, un négatif qui ne contient aucune substance rajoutée et un contrôle positif dopé à 100 µg/L avec les cinq substances et les standard internes deutérés.

Aucun pic n'est présent aux temps de rétention des cannabinoïdes sur le contrôle négatif, ni pour les 5 substances ni pour les standard internes. Pour le blanc aucun pic n'est présent aux temps de rétention et aux masses de 5 cannabinoïdes.

La méthode est considérée comme sélective.

3.7.2 Spécificité

Six échantillons ont été préparés avec différentes concentration de drogues typiquement présentes dans le sang des patients analysé. Le Tableau 9 résume les drogues et la concertation de ces dernières dans l'échantillon.

Tableau 9:

Six échantillons utilisés pour la spécificité avec les concentrations de drogues utilisées

Echantillon	Substance	Concentration [ug/L]
1	Cocaïne	500
	Diazépam	5
2	Lorazépam	5000
	Zolpidem	5000
3	Méthadone	500
	Tramadol	500
4	Amphétamine	50
	Méthamphétamine	50
	MDMA	50
5	CBD	10
	THC	10
	CBG	10
	THC-OH	10
	THC-COOH	50
6	Morphine	500
	Codéine	500

L'absence de pics pour les échantillons 1, 2, 3, 4 et 6 démontre que les 5 cannabinoïdes sont les seuls responsables des pics à leur temps de rétention et masses respectives.

La méthode est considérée comme spécifique.

3.7.3 Linéarité

La linéarité est obtenue à partir de 6 point d'étalonnages. Les solutions sont préparées en dopant du sang humain selon la méthode décrite au chapitre « Préparation des solutions d'étalonnage ». Durant les trois jours de validation deux droites de calibration ont été faites chaque jour, une injectée avant la série de contrôle qualité et une à la fin de la séquence. La droite de calibration est obtenue avec le rapport entre l'aire de la substance et l'aire de la substance deutérée.

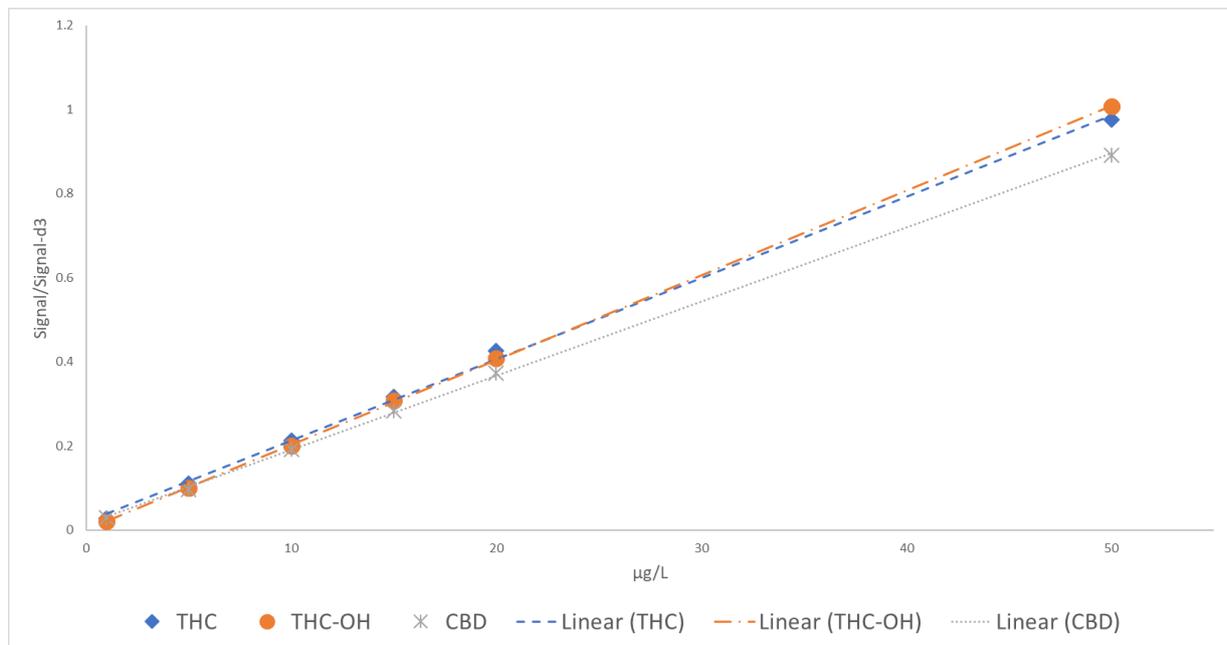


Figure 10:
Droite de calibration pour le THC, THC-OH et CBD

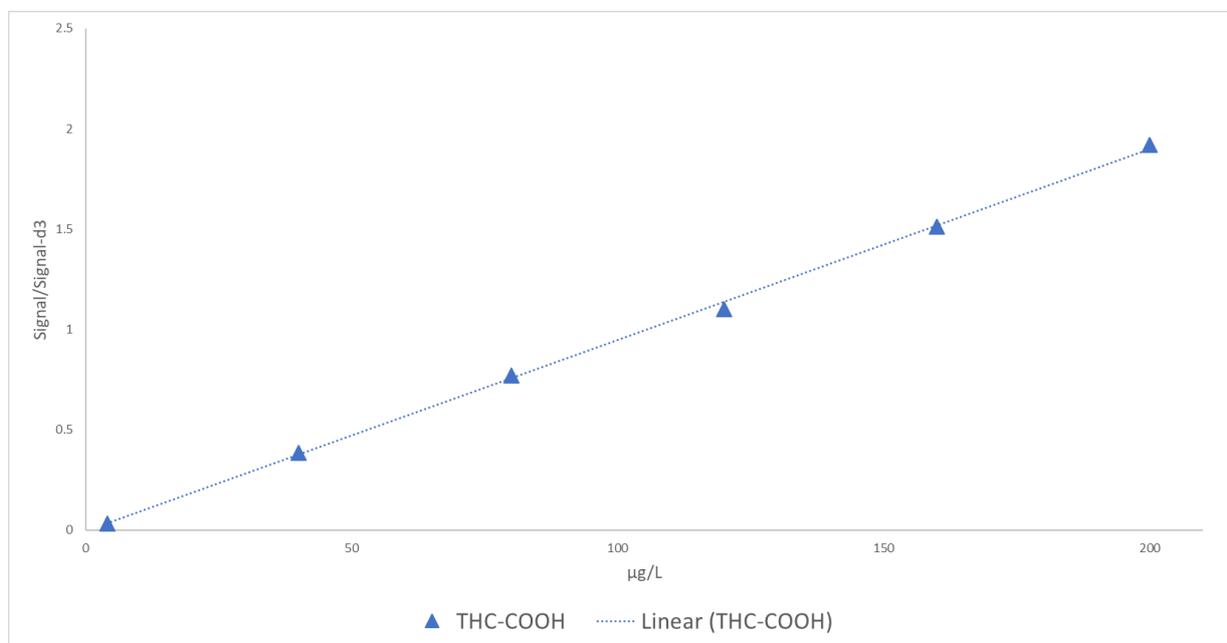


Figure 11:
Droite de calibration pour le THC-COOH

La quantification du cannabigerol n'a pas pu être réalisée ; en effet sans standard interne deutérés il n'est pas possible d'obtenir une droite de calibration qui satisfait les conditions de validation ($R^2 \geq 0.95$).

Pour ce qui concerne les quatre autres substances les valeurs du coefficient de détermination sont montrées dans le Tableau 10 et les droites de calibration à la Figure 10 et Figure 11.

Tableau 10:

Coefficient de détermination pour les quatre cannabinoïde durant les 3 jours de validation

	Coefficient de détermination (R ²)					
	Droite 1	Droite 2	Droite 3	Droite 4	Droite 5	Droite 6
THC	0.999	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000
THC-OH	1.000	1.000	0.999	0.988	0.999	1.000
THC-COOH	0.999	0.997	1.000	0.984	0.999	0.984
CBD	0.995	1.000	1.000	0.997	1.000	1.000

La méthode est considérée comme linéaire pour un domaine de concentration allant de 1 à 50 µg/L pour THC, THC-OH et CBD et de 4 à 200 µg/L pour le THC-COOH. La méthode ne permet pas la quantification du CBG.

3.7.4 Justesse

La justesse est obtenue en calculant la concentration des contrôles qualités avec la première courbe de calibration, les valeurs calculés sont comparées avec la valeur vraies considérées comme exacte. 3 niveaux de CQ sont utilisés, un niveau bas à 1.5 µg/L et deux niveaux moyens à 4 et 12 µg/L. Les recouvrements sont montrés à la Figure 13 pour le THC, THC-OH et CBD et à la Figure 12 pour le THC-COOH. Les lignes traitillées en rouge montrent les critères d'acceptation.

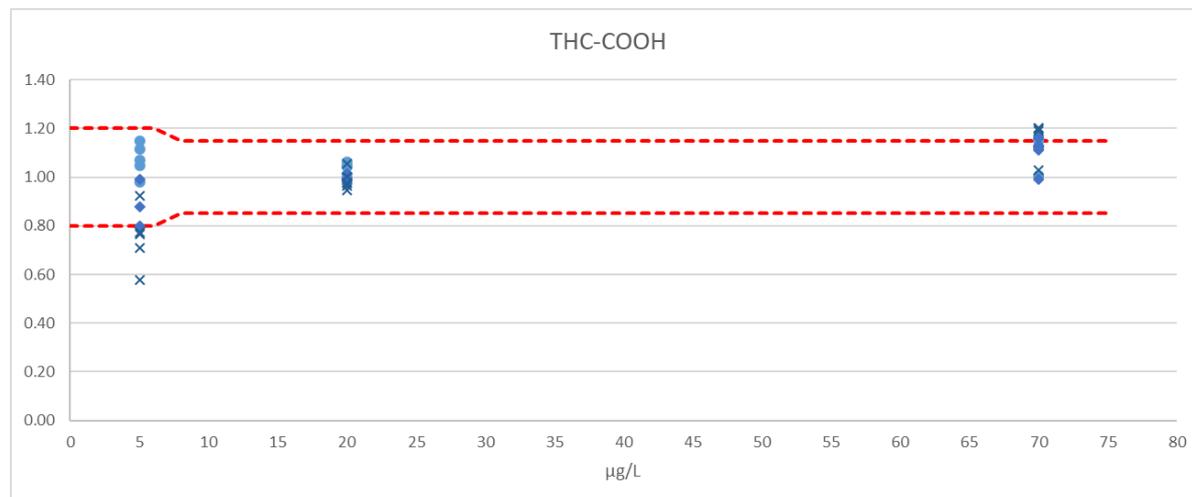


Figure 12:

Justesse de la méthode pour les 3 CQ de THC COOH. L'axe des y représente le taux de recouvrement (1=100%)

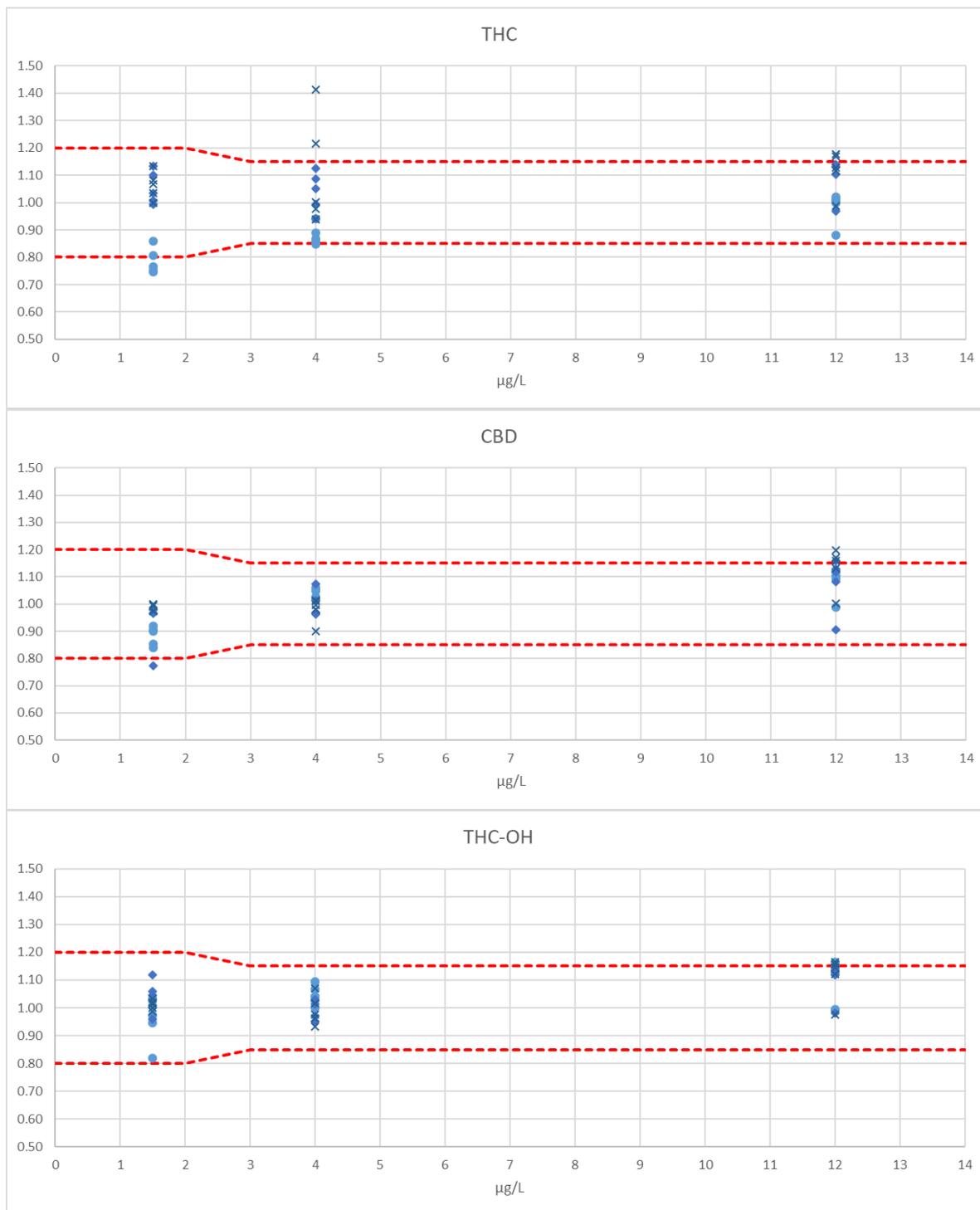


Figure 13:

Justesse de la méthode pour les 3 CQ de THC, CBD et THC-OH. L'axe des y représente le taux de recouvrement (1=100%)

La justesse requise est de 100% \pm 20% pour le niveau de contrôle le plus bas et de 100% \pm 15% pour les autres niveaux de contrôles. Aucune des 4 substances ne satisfait la justesse requise.

3.7.5 Précision

La précision est obtenue en calculant la concentration des contrôles qualités avec la première courbe de calibration, pour chaque jour de validation et pour chaque CQ le coefficient de variation est calculé. Le Tableau 11 montre les différents résultats pour les 4 substances.

Tableau 11:
Coefficients de variations des 4 cannabinoïdes pour les 3 jours de validations

	THC	THC-OH	THC-COOH	CBD	
CQ 1	4.7%	8.1%	7.9%	3.3%	
CQ 2	4.8%	3.3%	3.4%	1.8%	Jour 1
CQ 3	5.8%	6.1%	6.9%	5.0%	
CQ 1	4.6%	5.1%	8.7%	7.4%	
CQ 2	6.5%	3.4%	1.7%	4.3%	Jour 2
CQ 3	6.3%	6.1%	5.8%	9.0%	
CQ 1	4.3%	1.9%	14.6%	1.4%	
CQ 2	17.5%	5.3%	4.2%	4.6%	Jour 3
CQ 3	6.8%	7.0%	6.5%	6.7%	

La répétabilité Inter-Day doit être de $\leq 15\%$ pour les différents niveaux de contrôles. A part pour les contrôles qualités de niveau 2 du 3^{ème} jour, dont le résultat a été biaisé par 2 échantillons qui n'ont pas sédimentés correctement lors de l'extraction liquide-liquide, la méthode est précise pour l'ensemble des substances testées. Ceci semble aussi suggérer que les problèmes de justesse soient dus à une erreur systématique, ceci sera approfondi dans la partie des discussions.

3.7.6 Limite de quantification

La LOQ est déterminée à partir des trois jours de validation, elle équivaut au niveau le plus bas qui peut être mesuré de façon fiable avec une justesse $\pm 20\%$ et une précision $\leq 20\%$.

Tableau 12:
Précision et justesse de la LOQ pour les 4 substances, en rouge les valeurs qui ne satisfont pas les conditions. Pour la justesse la valeur la plus éloigné du 100% a été choisie pour les 5 CQ.

Substance	Concentration [µg/L]	Justesse			Précision		
		J1	J2	J3	J1	J2	J3
THC	1.5	75%	113%	113%	5%	5%	4%
THC-OH	1.5	82%	112%	103%	8%	5%	2%
THC-COOH	5	115%	79%	59%	8%	9%	15%
CBD	1.5	85%	77%	97%	3%	7%	1%

Les LOQ montrées dans le Tableau 12 correspondent à l'objectif indispensable à atteindre par la méthode. Une LOQ plus haute n'est envisageable car elle ne respecterait pas la limite imposée par la loi Suisse. Comme déjà mentionné au paragraphe sur la justesse les critères d'acceptation pour la LOQ sont respectés uniquement pour le THC-OH. Pour ce qui concerne la précision, la limite de 20% est respectée par les 4 analytes.

3.7.7 Effet mémoire

L'effet mémoire sert à contrôler l'absence de pic sur une deuxième injection, dû à l'injection précédente. Vu les hautes concentrations des substances et la présence sporadique d'impureté dans les blancs injectés après un échantillon sanguin, un blanc est injecté entre

chaque échantillon. L'absence de pic interférant sur le deuxième échantillon blanc est confirmée.

3.7.8 Limite de détection est stabilité

Suite à la non validation de la méthode les tests de stabilité et de limite de détection n'ont pas été effectués. Il a été néanmoins remarqué que le sang utilisé tout au long de ces expériences est très instable au fil du temps. Après un mois de conservation au frigo il est déjà possible de remarquer des impuretés ayant un signal toujours plus intense et des pics qui masquent partiellement les cannabinoïdes dans les niveaux les plus bas comme montré à la Figure 14.

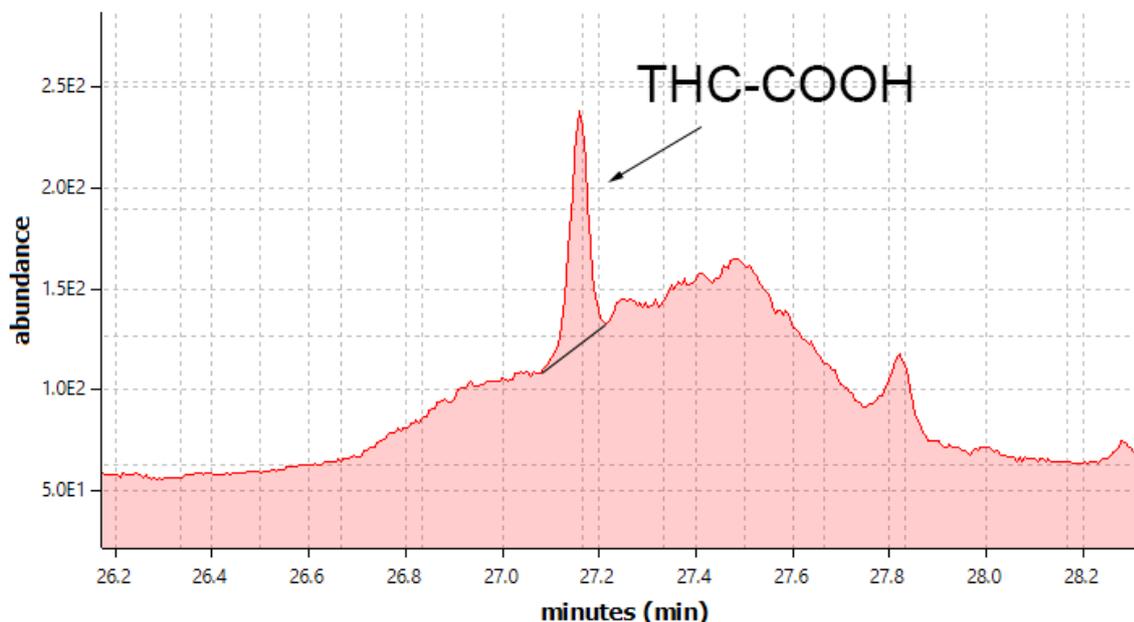


Figure 14: Contrôle Qualité à 1.5 µg/L avec impureté sur le t_R du THC-COOH après conservation du sang à 8°C pendant un mois.

3.8 Deuxième validation

Après l'échec de la première validation une deuxième a été faite en suivant cette fois le modèle de validation de l'hôpital de Sion. La méthode d'extraction et la méthode GC-MS restent les mêmes mais les étalons, contrôles qualités et l'opérateur diffèrent de la première validation. Au cours de cette validation 5 niveaux de contrôles qualités (Tableau 13) ont été utilisés, pour chaque niveau 5 échantillons ont été préparés et pour les calculs de validation les 4 meilleurs résultats ont été pris en considération.

Tableau 13: Concentration en analytes des 5 niveaux de CQ

Substance	CQ1	CQ2	CQ3	CQ4	CQ5
CBD	1.0 µg/L	5.0 µg/L	15.0 µg/L	25.0 µg/L	50.0 µg/L
THC	1.0 µg/L	5.0 µg/L	15.0 µg/L	25.0 µg/L	50.0 µg/L
THC-OH	1.0 µg/L	5.0 µg/L	15.0 µg/L	25.0 µg/L	50.0 µg/L
THC-COOH	4.0 µg/L	40.0 µg/L	80 µg/L	160.0 µg/L	200.0 µg/L

Tableau 14:
Concentrations et mode de préparation des étalons

Substance	Etalon 1	Etalon 2	Etalon 3	Etalon 4	Etalon 5	Etalon 6	Echantillons ou Contrôles
CBD	1.0 µg/L	5.0 µg/L	10.0 µg/L	15.0 µg/L	25.0 µg/L	50.0 µg/L	
THC	1.0 µg/L	5.0 µg/L	10.0 µg/L	15.0 µg/L	25.0 µg/L	50.0 µg/L	
THC-OH	1.0 µg/L	5.0 µg/L	10.0 µg/L	15.0 µg/L	25.0 µg/L	50.0 µg/L	
THC-COOH	4.0 µg/L	40.0 µg/L	80.0 µg/L	120.0 µg/L	160.0 µg/L	200.0 µg/L	
Sang	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL
CBD à 200 µg/L	10 µl	50 µl	100 µl	150 µl	250 µl	500 µl	-
THC à 200 µg/L	10 µl	50 µl	100 µl	150 µl	250 µl	500 µl	-
THC-OH à 200 µg/L	10 µl	50 µl	100 µl	150 µl	250 µl	500 µl	-
THC-COOH à 1000 µg/L	8 µl	80 µl	160 µl	240 µl	320 µl	400 µl	-
CBD-D3 à 1000 µg/L	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
THC-D3 à 1000 µg/L	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
THC-OH-D3 à 1000 µg/L	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
THC-COOH-D3 à 2000 µg/L	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

Toute la manipulation concernant la préparation des contrôles qualités et des étalons a été effectuée par une tierce personne. Les tests de sélectivité, spécificité, effet mémoire n'ont pas été refaits. La limite de détection et la stabilité n'ont pas encore été effectués lors de l'écriture de ce rapport. Cette validation doit s'effectuer sur 3 jours, chaque jour 2 courbe de calibration à 6 points et 5 CQ pour chacun des 5 niveaux sont préparés et analysés. Les jours de validation ne doivent pas forcément être faits à la suite. Ce rapport prend en compte uniquement le premier jour de validation, car les 2 autres n'ont pas encore été effectués lors de l'écriture de ce rapport.

3.8.1 Linéarité

La linéarité est déterminée avec les CQ, ces derniers sont recalculés sur les droites d'étalonnage pour chacun des analytes et les valeurs recalculées sont alignées par rapport aux valeurs théoriques exactes. Un exemple est montré à la Figure 15.

La pente doit idéalement être égale à 1, le critère d'acceptance est entre 0.9 et 1.1. Le coefficient de détermination (R^2) doit être supérieur à 0.95.

Tableau 15:
Pente et coefficient de détermination des CQ recalculée alignées aux valeurs théoriques

	Linéarité des CQ	
	Pente	R^2
THC	1.014	1.000
CBD	1.018	0.999
THC-OH	0.985	0.999
THC-COOH	0.998	1.000

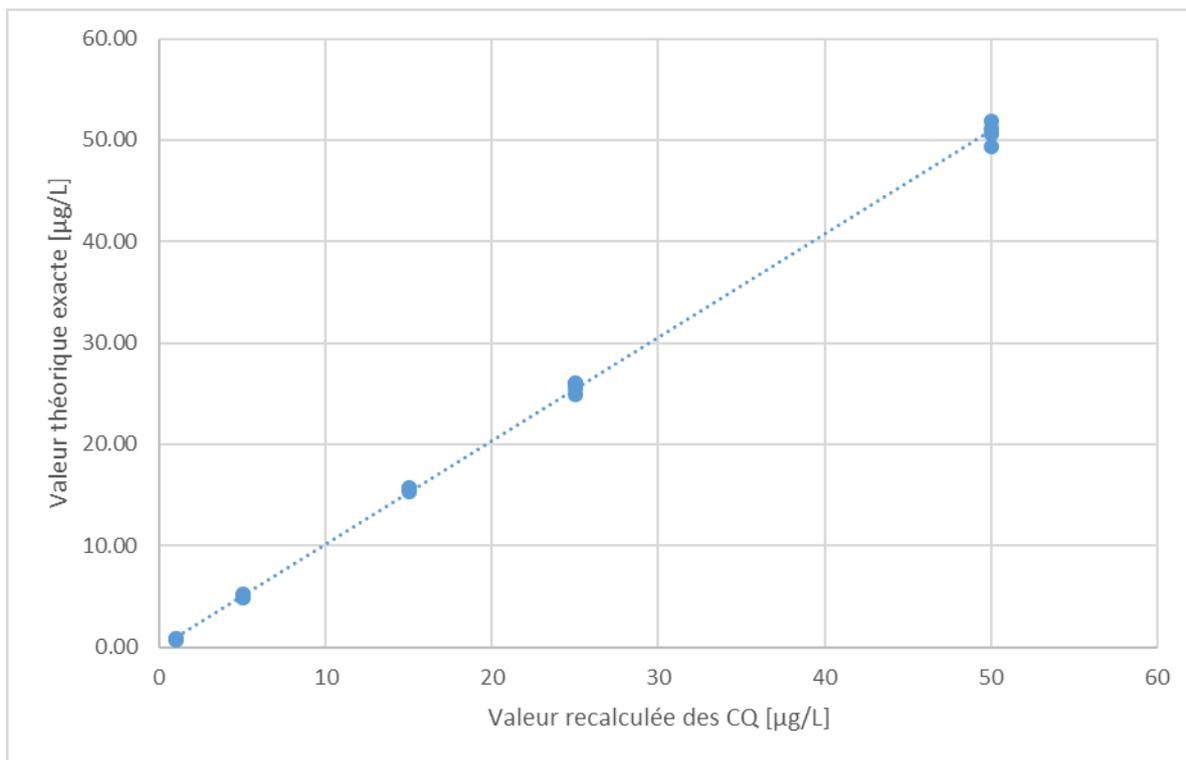


Figure 15: Exemple de droite pour le CBD, sur l'axe de y les valeurs théoriques vraie, sur l'axe des x les 4 valeurs recalculées des CQ

La méthode est considérée comme linéaire pour l'ensemble des substances testées et remplit les exigences de validation.

3.8.2 Justesse

La justesse est obtenue en calculant la concentration des contrôles qualités avec la première courbe de calibration, les valeurs calculés sont comparées avec la valeur vraies considérées comme exactes. 5 niveaux de CQ sont utilisés, les 4 meilleurs résultats de chaque niveau sont utilisés. Les lignes traitillées en rouge montrent les critères d'acceptation de $\pm 20\%$ pour la valeur plus basse et $\pm 15\%$ pour les autres.

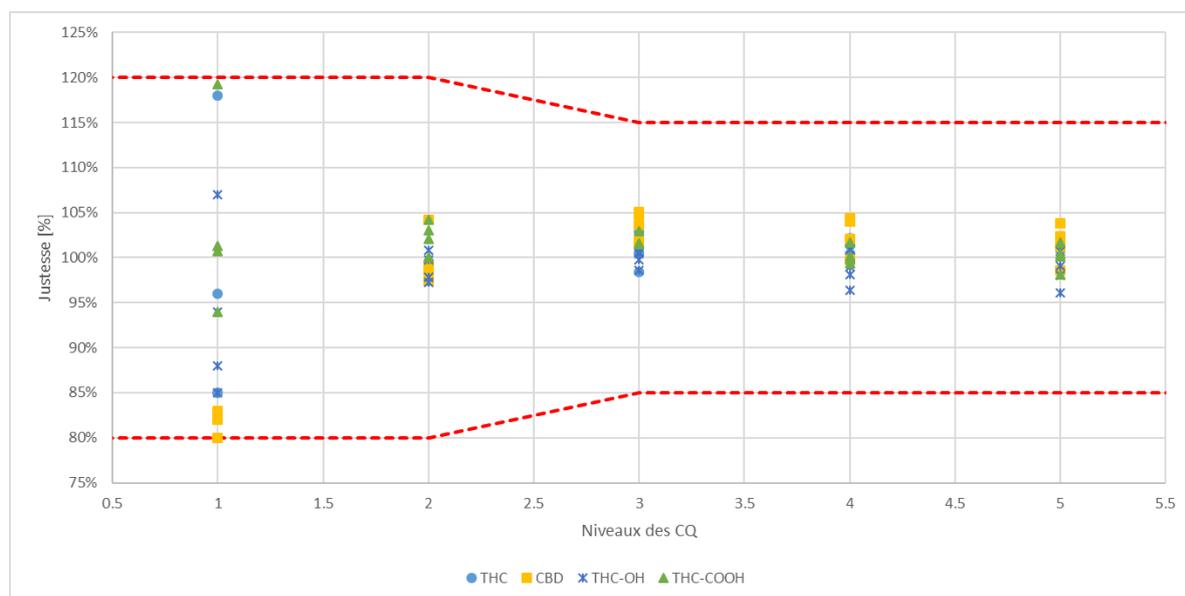


Figure 16:

Justesse des CQ en % pour les 4 analytes, la concentration des CQ est montrée dans le Tableau 13

La Figure 16 montre la justesse en pourcentage des 4 échantillons pour chaque niveau et chaque analyte. La justesse est de 100% ±20% pour le niveau de contrôle le plus bas (1µg/L) et de 100% ±15% pour les autres niveaux de contrôles. La méthode de dosage est juste pour l'ensemble des substances testées.

3.8.3 Précision

La précision est obtenue en calculant la concentration des contrôles qualités avec la première courbe de calibration, pour chaque jour de validation et pour chaque CQ le coefficient de variation est calculé. Le Tableau 16 montre les différents résultats pour les 4 substances.

Tableau 16:

Coefficients de variations des 4 cannabinoïdes pour les 5 niveaux de contrôle

	THC	CBD	THC-OH	THC-COOH
CQ 1	16.2%	1.8%	10.4%	10.4%
CQ 2	0.9%	3.0%	1.7%	1.7%
CQ 3	1.8%	1.4%	0.9%	0.7%
CQ 4	0.7%	2.1%	1.9%	1.0%
CQ 5	0.3%	2.2%	2.0%	1.5%

La répétabilité inter-day doit être ≤20% pour le niveau le plus bas et ≤15% pour les autres niveaux de contrôles. Toutes les substances remplissent les conditions de validation, la méthode est considérée précise pour l'ensemble des analytes dans un range allant de 1 à 50 µg/L pour THC, THC-OH et CBD et 4 à 200 µg/L pour THC-COOH.

3.8.4 Limite de quantification

La LOQ équivaut au niveau le plus bas qui peut être mesuré de façon fiable avec une justesse ±20% et une précision ≤ 20%. Pour cette validation la LOQ a été définie sur le contrôle qualité de niveau plus bas, à 1 µg/L pour THC, THC-OH et CBD et à 4 µg/L pour le THC-COOH.

Tableau 17:

Justesse et précision pour la limite de quantification

Substance	Concentration [µg/L]	Justesse J1	Précision J1
THC	1	118%	16%
THC-OH	1	85%	10%
THC-COOH	4	119%	10%
CBD	1	80%	2%

Le Tableau 17 montre la justesse et la précision du CQ plus bas, les 4 substances sont conformes aux normes imposées par la validation. La méthode garantit une quantification avec une justesse et une précision de ≤20% jusqu'à une concentration de 1 µg/L pour le THC, THC-OH et CBD et jusqu'à 4 µg/L pour le THC-COOH.

3.9 Nal von minden

Les échantillons d'urines ont été extraits selon le protocole de l'hôpital présent à l'Annexe 4 et analysés par GC-MS avec la méthode de l'Annexe 5. Les tests par écoulement latéral sur plaquette Nal von Minden ont été effectués au préalable par l'hôpital, un exemple de plaquette positive au THC-COOH est montré à la Figure 17.

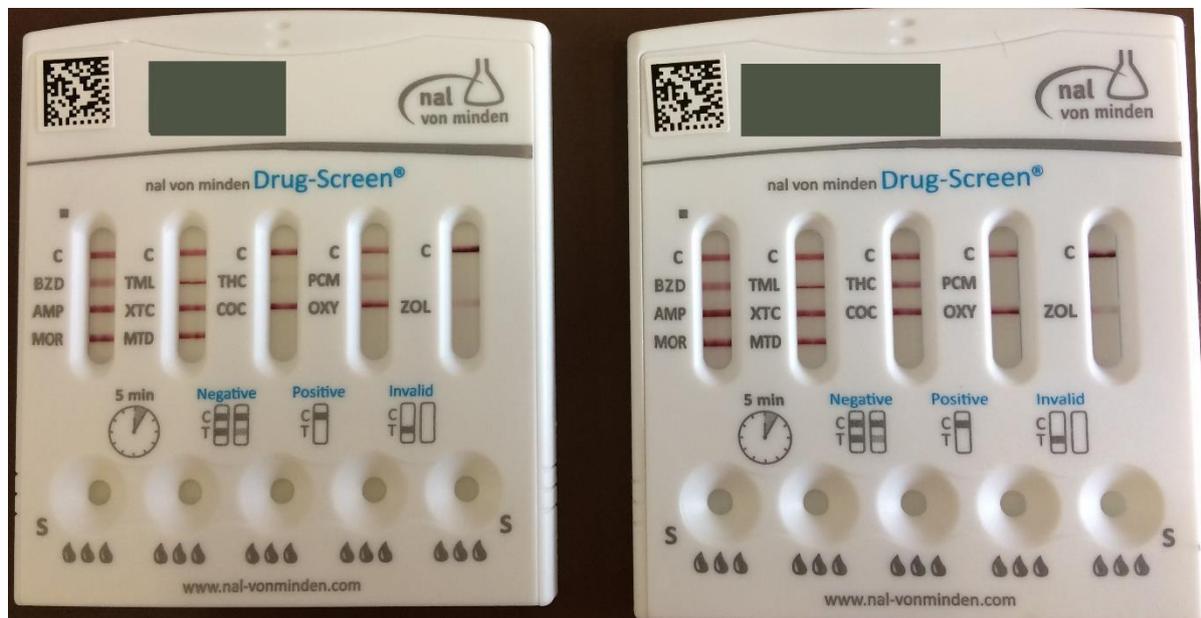


Figure 17:

Deux tests à écoulement latéral Nal von Minden. A gauche un test positif pour le THC-COOH (noté THC sur la plaquette) et à droite un test négatif pour le THC-COOH (positif pour le paracétamol)

Les valeurs obtenues par le Drug test ont été comparées aux valeurs obtenues par quantification GC-MS.

La sensibilité ($VP/(VP+FN)$), spécificité ($VN/(VN+FP)$), la justesse ($(VP+VN)/(FP+FN+VN+VP)$) ainsi que la valeur prédictive positive ($PPV=VP/(VP+FP)$) et négative ($NPV=VN/(VN+FN)$) ont été calculées et sont montrées dans le Tableau 18.

Tableau 18:

Résultats pour la sensibilité, la justesse et la spécificité des 53 échantillons testés. FP = faux positif, FN = faux négatif, VN = vrai négatif, VP = vraie positif, PPV = valeur prédictive positive, NPV = valeur prédictive négative

DrugScreen	
FP	0
FN	3
VN	48
VP	2
Justesse	94%
Sensibilité	40%
Spécificité	100%
PPV	100%
NPV	94%

A noter que les 3 résultats faux négatifs avait une valeur de THC-COOH inférieur au cut-off de 50 µg/L indiqué par le fabricant. Deux de ces échantillons, avec une valeur mesurée par GC-MS de 18 µg/L, avait été indiqués comme « douteux » par la personne en charge des test Nal von Minden ; par convention, tout test « douteux » est considéré comme négatif.

4 Discussion

4.1 Validation

La première validation, sur 3 jours, a échoué par manque de justesse. La limite de $\pm 20\%$ pour le contrôle le plus bas ($1.5\mu\text{g/L}$) n'a pas été atteinte par tous les échantillons. La bonne fidélité atteinte par les 3 niveaux de contrôle qualité semble suggérer que l'erreur soit imputable à une erreur systématique. En préparant chaque échantillon manuellement et en dopant le sang avec des très petits volumes ($8\mu\text{L}$) l'erreur humaine peut jouer un rôle majeur dans la somme des erreurs. Pour cette raison une deuxième validation a été faite, cette fois-ci toute manipulation ayant été effectuée par le personnel de l'hôpital de Sion, avec comme but aussi de leur apprendre la nouvelle méthode.

La méthode d'extraction et d'analyse GC-MS restent identiques à la première validation, uniquement les concentrations des étalons et des contrôles qualités changent. Cette deuxième validation a été validée et tous les échantillons respectent les conditions imposées par le laboratoire (soumis aux normes ISO 17025). Pour que la méthode soit définitivement validée, 2 jours de validation doivent encore être faits, il n'est donc pour l'instant pas sûr que la méthode puisse être utilisée dans les analyses de routine. La deuxième validation, tout comme la première, se montre très robuste pour les contrôles qualités les plus hauts mais perd en fidélité pour le niveau le plus bas. Ceci est dû principalement à la basse intensité des pics qui rendent difficile une intégration correcte.

Pour ce qui concerne la méthode d'extraction et de séparation GC-MS il est difficile d'envisager d'ultérieures améliorations. Plus de lavage lors de l'extraction signifierait un signal encore moins intense tandis que moins de lavage augmente la problématique des impuretés qui viennent masquer les pics d'intérêt. L'agent de dérivation est, selon la littérature, le plus efficace et le plus utilisé, il permet une dérivation rapide, facile et permet d'injecter l'échantillon directement sans avoir à évaporer l'agent de dérivation et resolubiliser l'échantillon.

Une grande amélioration pourrait être l'utilisation du plasma au lieu du sang complet. La plupart des articles de littérature travaillent sur du plasma, un fluide biologique beaucoup plus propre et facile à extraire que le sang complet. Malheureusement la limite imposée par la loi de $1.5\mu\text{g/L}$ est calculée sur le sang complet, un changement de matrice n'est donc pas envisageable. Récupérer du plasma des échantillons s'avère compliqué car le plasma doit être extrait sur du sang frais, or les échantillons reçus par la toxicologie peuvent dater de quelques jours, ce qui rend une extraction de plasma difficile.

Pour ce qui concerne la méthode GC-MS la seule amélioration possible serait d'augmenter le volume d'injection, ce qui en contrepartie induit des phénomènes de fronting et des pics larges et peu intenses pour les étalons les plus concentrés.

4.2 Tests à écoulement latéral Nal von Minden

Des 53 échantillons analysés 5 sont résulté positifs au THC-COOH par GC-MS, deux ont pu être identifiés aussi avec le test à écoulement latéral, deux autres avec une valeur au-dessous du cut-off de $50\mu\text{g/L}$ ont été identifiés comme « douteux » lors du test sur plaquette. Le dernier, avec une concentration de $5\mu\text{g/L}$ (proche de la limite de quantification de la méthode GC) est résulté négatif aux tests Nal von Minden. Aucun faux positif n'a été détecté. Le test peut être considéré comme très fiable en termes de justesse et spécificité, pour ce qui en est de la sensibilité la valeur cut-off reste toutefois très haute.

Ce type de test, pas cher et rapide (résultat en 5 minutes), est une bonne alternative à la quantification GC-MS pour détecter les fumeurs de cannabis chroniques. Elle n'est par contre d'aucune utilité pour la détection de faible dose de THC-COOH. En guise de

comparaison, un fumeur est considéré comme chronique à partir d'une concentration de THC-COOH dans le sang de 25 µg/L.

5 Conclusions et perspectives

Lors de ce travail, une méthode pour la quantification du Δ -9-tétrahydrocannabinol, 11-Hydroxy- Δ 9-tétrahydrocannabinol, 11-nor-9-carboxy-delta-9-tétrahydrocannabinol et cannabigerol a été développée, optimisée et est en cours de validation.

Cette méthode a été validée avec des critères plus stricts par rapport à l'ancienne méthode encore utilisée actuellement. Elle permet entre autres de quantifier un cannabinoïde de plus, le CBD, qui permettrait de faire une distinction entre une consommation récente et une consommation régulière mais non récente. Le cannabigerol n'a lui pas pu être quantifié à cause de la non disponibilité sur le marché du standard deutéré.

La méthode nécessite encore 2 jours complets de validation, identiques au premier présenté dans ce rapport, et certains tests comme la stabilité, la répétabilité inter-day, l'effet matrice et le rendement d'extraction.

La méthode pourrait encore être améliorée pour le niveau le plus bas à 1 µg/L, en effet la précision et la justesse sont à la limite des critères d'acceptation de la validation.

Un autre point très important qui n'a pas pu être abordé dans ce travail est la stabilité du sang ; il serait très important de savoir à partir de quelle durée de conservation un échantillon se dégrade en sortant de l'écart de $\pm 15\%$ de justesse accordé par la validation.

La spécificité du test à écoulement latéral Nal von Minden a été calculée à 100% et la sensibilité à 40%. Le test est de grande utilité pour des concentrations de THC-COOH supérieure à 50 µg/L, au-dessous de cette valeur le test perd en sensibilité.

Il serait intéressant d'approfondir le sujet avec un plus grand nombre d'échantillons.

6 Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier M. Nicolas Donzé, biologiste-chef adjoint, et le Dr. Michel Rossier, chef de service, pour m'avoir proposé ce sujet de travail et pour leur disponibilité au cours de ces trois mois. Je remercie aussi le Dr. Jean-Manuel Segura pour m'avoir suivi tout au long de mon travail et d'avoir toujours été présent pour répondre à mes questions.

Je tiens aussi à remercier Vanessa Bisco pour m'avoir appris les méthodes d'extraction nécessaires pour ce travail, Sonia Zäch pour son introduction sur le programme de quantification MS, Nicole Beloeil et Raphaële Riand-Voide, pharmacienne-adjointe, pour avoir répondu à toutes mes questions et m'avoir aidé à appliquer leur méthode de validation sur ma méthode.

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe du laboratoire de Toxicologie pour la bonne ambiance et les beaux moments partagés au long de ces trois mois.

Enfin, un grand merci à ma famille leur commentaire et leur soutien tout au long de ce travail.

Sion, le 18 août 2017

Nicolas Wernli

7 Bibliographies

- Agilent Technologies. 2014. "Agilent Bond Elut Certify and Certify II Methods Manual." In.
- Elsohly, M. A., and D. Slade. 2005. 'Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids', *Life Sci*, 78: 539-48.
- Fondation Faber. 2005. 'Etude PNR50 sur la fertilité masculine en Suisse', Accessed 17.06.2017. <http://pnr50.fondation-faber.ch/>.
- Karschner, Erin L., Allan J. Barnes, Ross H. Lowe, Karl B. Scheidweiler, and Marilyn A. Huestis. 2010. 'Validation of a Two-Dimensional Gas Chromatography Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Quantification of Cannabidiol, $\Delta(9)$ -Tetrahydrocannabinol (THC), 11-Hydroxy-THC and 11-nor-9-Carboxy-THC in Plasma', *Anal Bioanal Chem*, 397: 603-11.
- Kim, E., and P. Mahlberg. 1997. 'Immunochemical localization of tetrahydrocannabinol (THC) in cryofixed glandular trichomes of Cannabis (Cannabaceae)', *Am J Bot*, 84: 336.
- "Legge federale sugli stupefacenti e sulle sostanze psicotrope." In. 1951. *Diritto interno*. Svizzera.
- Ligresti, A., A. S. Moriello, K. Starowicz, I. Matias, S. Pisanti, L. De Petrocellis, C. Laezza, G. Portella, M. Bifulco, and V. Di Marzo. 2006. 'Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma', *J Pharmacol Exp Ther*, 318: 1375-87.
- Meijer, E. P. M., and K. M. Hammond. 2005. 'The inheritance of chemical phenotype in Cannabis sativa L. (II): Cannabigerol predominant plants', *Euphytica*, 145: 189-98.
- Musshoff, F., E. G. Hokamp, U. Bott, and B. Madea. 2014. 'Performance evaluation of on-site oral fluid drug screening devices in normal police procedure in Germany', *Forensic Sci Int*, 238: 120-4.
- Nadulski, T., F. Sporkert, M. Schnelle, A. M. Stadelmann, P. Roser, T. Schefter, and F. Pragst. 2005. 'Simultaneous and sensitive analysis of THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD, and CBN by GC-MS in plasma after oral application of small doses of THC and cannabis extract', *J Anal Toxicol*, 29: 782-9.
- Office fédéral de la statistique. 2014. "Enquête suisse sur la santé (ESS)." In.: OFS.
- Preedy, V. R. 2017. 'Handbook of Cannabis and Related Pathologies.' in, *Handbook of Cannabis and Related Pathologies* (Academic Press: San Diego).
- Purschke, K., S. Heini, O. Lerch, F. Erdmann, and F. Veit. 2016. 'Development and validation of an automated liquid-liquid extraction GC/MS method for the determination of THC, 11-OH-THC, and free THC-carboxylic acid (THC-COOH) from blood serum', *Anal Bioanal Chem*, 408: 4379-88.
- Ross, S. A., and M. A. ElSohly. 1996. 'The volatile oil composition of fresh and air-dried buds of Cannabis sativa', *J Nat Prod*, 59: 49-51.
- Sewell, R. Andrew, James Poling, and Mehmet Sofuoglu. 2009. 'THE EFFECT OF CANNABIS COMPARED WITH ALCOHOL ON DRIVING', *The American journal on addictions / American Academy of Psychiatrists in Alcoholism and Addictions*, 18: 185-93.
- Thomas, Aurélien, Christèle Widmer, Gérard Hopfgartner, and Christian Staub. 2007. 'Fast gas chromatography and negative-ion chemical ionization tandem mass spectrometry for forensic analysis of cannabinoids in whole blood', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45: 495-503.
- Turner, Carlton E., Mei-Feng H. Hsu, Joseph E. Knapp, Paul L. Schiff, and David J. Slatkin. 1976. 'Isolation of cannabistatine, an alkaloid, from Cannabis sativa L. root', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65: 1084-85.
- Vanhoenacker, G., P. Van Rompaey, D. De Keukeleire, and P. Sandra. 2002. 'Chemotaxonomic features associated with flavonoids of cannabinoid-free cannabis (Cannabis sativa subsp. sativa L.) in relation to hops (Humulus lupulus L.)', *Nat Prod Lett*, 16: 57-63.

8 Annexes

1. Méthode GC-MS pour échantillons sanguins
2. SOP pour l'extraction de cannabinoïdes dans de le sang, Hôpital de Sion
3. Méthode GC-MS pour échantillons sanguins, Hôpital de Sion
4. SOP pour l'extraction de cannabinoïdes dans de les urines, Hôpital de Sion
5. Méthode GC-MS pour échantillons d'urines, Hôpital de Sion

Annexe 1 : Méthode GC-MS pour échantillons sanguins

INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS: GCMS B

C:\MSDCHEM\1\METHODS\WERNLI_THCSIMS.M
Fri Jul 28 16:51:20 2017

Control Information

Sample Inlet : GC
Injection Source : GC ALS
Mass Spectrometer : Enabled

No Sample Prep method has been assigned to this method.

=====

6890 GC METHOD

=====

OVEN

Initial temp: 100 'C (On) Maximum temp: 325 'C
Initial time: 2.00 min Equilibration time: 2.00 min
Ramps:
Rate Final temp Final time
1 7.00 280 1.00
2 0.0 (Off)
Post temp: 320 'C
Post time: 5.00 min
Run time: 28.71 min

FRONT INLET (SPLIT/SPLITLESS)

Mode: Pulsed Splitless
Initial temp: 260 'C (On)
Pressure: 28.79 psi (On)
Pulse pressure: 60.0 psi
Pulse time: 0.75 min
Purge flow: 50.0 mL/min
Purge time: 2.00 min
Total flow: 54.6 mL/min
Gas saver: On
Saver flow: 15.0 mL/min
Saver time: 2.00 min
Gas type: Helium

BACK INLET (UNKNOWN)

COLUMN 1

Capillary Column
Model Number: Agilent 19091B-102
Ultra 2 5% Phenyl Methyl Siloxane
Max temperature: 325 'C
Nominal length: 25.0 m
Nominal diameter: 200.00 um
Nominal film thickness: 0.33 um
Mode: constant flow
Initial flow: 1.5 mL/min
Nominal init pressure: 28.80 psi
Average velocity: 51 cm/sec
Inlet: Front Inlet
Outlet: MSD
Outlet pressure: vacuum

COLUMN 2

(not installed)

FRONT DETECTOR (NO DET)

SIGNAL 1

Data rate: 50 Hz
Type: test plot
Save Data: Off
Zero: 0.0 (Off)
Range: 0
Fast Peaks: Off
Attenuation: 0

BACK DETECTOR (NO DET)

SIGNAL 2

Data rate: 50 Hz
Type: test plot
Save Data: Off
Zero: 0.0 (Off)
Range: 0
Fast Peaks: Off
Attenuation: 0

COLUMN COMP 1

(No Detectors Installed)

COLUMN COMP 2

(No Detectors Installed)

THERMAL AUX 2

Use: MSD Transfer Line Heater
Description: GCMS interface
Initial temp: 280 'C (On)
Initial time: 0.00 min
Rate Final temp Final time

WERNLI_THCSIMS.M Fri Jul 28 16:51:20 2017

Page: 2

1 0.0(Off)

POST RUN

Post Time: 5.00 min
Oven Temperature: 320 'C
Column 1 Flow: 1.5 mL/min

TIME TABLE
Time Specifier Parameter & Setpoint

GC Injector

Front Injector:

Sample Washes 0
Sample Pumps 2
Injection Volume 2.00 microliters
Syringe Size 10.0 microliters
PreInj Solvent A Washes 2
PreInj Solvent B Washes 1
PostInj Solvent A Washes 2
PostInj Solvent B Washes 2
Viscosity Delay 2 seconds
Plunger Speed Fast
PreInjection Dwell 0.00 minutes
PostInjection Dwell 0.00 minutes
Sampling Depth 1.4 mm

Back Injector:

No parameters specified

Column 1 Inventory Number : AB001
Column 2 Inventory Number :

MS ACQUISITION PARAMETERS

General Information

Tune File : atune.u
Acquisition Mode : SIM

MS Information

Solvent Delay : 20.50 min
EMV Mode : Relative
Relative Voltage : 0
Resulting EM Voltage : 929

[Sim Parameters]

GROUP 1
Group ID : CBD
Resolution : High
Plot 1 Ion : 393.20
Ions/Dwell In Group (Mass, Dwell) (Mass, Dwell) (Mass, Dwell)
(337.20, 50) (340.20, 50) (390.20, 100)
(393.20, 100)

GROUP 2
Group ID : THC
Resolution : High
Group Start Time : 22.50
Plot 1 Ion : 389.30
Ions/Dwell In Group (Mass, Dwell) (Mass, Dwell) (Mass, Dwell)
(371.30, 50) (374.30, 50) (386.30, 100)
(389.30, 100)

GROUP 3
Group ID : CBG
Resolution : High
Group Start Time : 23.20
Plot 1 Ion : 391.30
Ions/Dwell In Group (Mass, Dwell) (Mass, Dwell) (Mass, Dwell)
(377.00, 50) (391.30, 100) (460.30, 50)

WERNLI_THCSIMS.M Fri Jul 28 16:51:20 2017

Page: 3

GROUP 4
Group ID : THC-OH
Resolution : High
Group Start Time : 25.00
Plot 1 Ion : 371.30
Ions/Dwell In Group (Mass, Dwell) (Mass, Dwell) (Mass, Dwell)
(371.30, 100) (372.30, 50) (374.30, 100)
(375.30, 50)

GROUP 5
Group ID : THC-COOH
Resolution : High
Group Start Time : 26.50
Plot 1 Ion : 371.30
Ions/Dwell In Group (Mass, Dwell) (Mass, Dwell) (Mass, Dwell)
(371.30, 100) (372.30, 50) (374.30, 100)
(375.30, 50)

[MSZones]

MS Source : 230 C maximum 250 C
MS Quad : 150 C maximum 200 C

END OF MS ACQUISITION PARAMETERS

TUNE PARAMETERS for SN: US61623048

Trace Ion Detection is OFF.

EMISSION : 34.610
ENERGY : 69.922
REPELLEL : 29.955
IONFOCUS : 77.820
ENTRANCE LE : 9.500
EMVOLTS : 929.412

Actual EMV : 929.412
GAIN FACTOR : 0.16

AMUGAIN : 1734.000
AMUOFFSET : 121.813
FILAMENT : 2.000
DCPOLARITY : 0.000
ENTLENSOFFS : 17.569
MASSGAIN : -508.000
MASSOFFSET : -38.000

END OF TUNE PARAMETERS

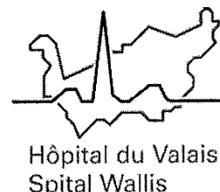
END OF INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS

Annexe 2 : SOP pour l'extraction de cannabinoïdes dans de le sang, Hôpital de Sion

ICH
Automates : Chimie
spécialités

Cannabis GC-MS sang

Réf. : SOP-1199
Version : 11
Processus : 3.4.16.5 GC-MS



7.2. Extraction liquide-liquide

- Ajouter 5.0 mL d'acétone et vortexer 60 secondes pour l'extraction en milieu organique. Avec le sang, il arrive parfois que le mélange se transforme en gel, mais en principe tout est séparé après centrifugation.
- Centrifuger 8 min à 3000 t/min.
- Prélever la phase organique (phase supérieure) et la recueillir dans un autre tube à essai en verre de 10 mL.
- Evaporer sous flux d'azote jusqu'à un volume d'environ 2 mL, à 35 °C.
- A la phase, ajouter 2.0 mL d'acide phosphorique 50 mmol/L et 4.0 mL d'eau purifiée; le pH doit être compris entre 4 et 5 (si nécessaire, ajuster le pH avec NaOH 0.25 mol/L (environ 320 µL de NaOH 0.25 mol/L ou HCl 0.1 mol/L)).

7.3. Extraction liquide-solide

- Sur le système d'extraction liquide-solide Visiprep, préparer une colonne Bond Elut Certify pour chaque étalon, contrôle et échantillon.
- Conditionner les colonnes d'extraction avec 2.0 mL de méthanol, puis avec 2.0 mL d'acide phosphorique 50 mmol/L (pression < 50 mmHg).
- Sans laisser sécher les colonnes, déposer à leur surface l'extrait de la première phase d'extraction et laisser couler lentement (sans vide).
- Rincer les colonnes avec 3.0 mL d'acide phosphorique 50 mmol/L (pression < 50 mmHg).
- Rincer encore les colonnes avec 3.0 mL du mélange acide phosphorique 50 mmol/L / Méthanol (80:20) (pression < 50 mmHg).
- Sécher l'intérieur des colonnes avec des Q-Tips et essuyer complètement les aiguilles et le couvercle du système d'extraction liquide-solide Visiprep.
- Sécher les colonnes durant au moins 30 min sur le système d'extraction.
- Extraire les dérivés du cannabis avec 3.0 mL d'hexane / acétate d'éthyle (80:20) et récolter les éluats dans des tubes à essais en verre de 10 mL (sans vide ou vide minimal).
- Evaporer à sec sous un flux d'azote, à température ambiante.

7.4. Dérivatisation

- Ajouter aux résidus d'extractions 200 µL de DMSO, vortexer brièvement, puis ajouter 10 µL de TBAH, vortexer brièvement et laisser reposer à température ambiante pendant 2 min.
- Ajouter 50 µL de iodométhane, vortexer brièvement et laisser reposer 15 min à température ambiante.
- Ajouter 350 µL de HCl 0.1 mol/L et vortexer brièvement.
- Ajouter 4.0 mL d'isooctane en deux fois (soit 2 x 2 mL) pour l'extraction liquide-liquide, vortexer jusqu'à l'apparition d'une couleur violette et centrifuger 10 min, à 2500 t/min. Prélever la phase organique (phase supérieure) et la récupérer dans un tube à essai de 5 mL.
- Evaporer à sec sous un flux d'azote, à température ambiante.
- Reprendre les résidus de l'extraction avec 60 µL d'isooctane.
- Vortexer brièvement, récupérer le tout dans un micro-flacon et centrifuger 10 min, à 2500 t/min.
- Injecter 1 µL au GC-MS.

Entre chaque échantillon de sang, injecter un solvant (dichlorométhane).

Rédigé par : Nicole Beloeil
Approuvé par : Nicolas Donzé (29/03/2017)
Document papier non géré - Imprimé le : 2017-03-29

Rédigé le : 28/03/2017
Diffusé le : 29/03/2017

4/8

www.hopitalvs.ch
www.spitalvs.ch

Annexe 3 : Méthode GC-MS pour échantillons sanguins, Hôpital de Sion

INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS: GCMS B

C:\MSDCHEM\1\METHODS\THCSCANS.M
Fri Mar 03 09:54:28 2017

Control Information

03 MAR 2017

Sample Inlet : GC
Injection Source : GC ALS
Mass Spectrometer : Enabled

No Sample Prep method has been assigned to this method.

6890 GC METHOD

OVEN

Initial temp: 100 'C (On) ? Maximum temp: 325 'C
Initial time: 2.00 min → Equilibration time: 2.00 min

Ramps:
Rate Final temp Final time
1 15.00 280 11.00
2 0.0 (Off)
Post temp: 0 'C
Post time: 0.00 min
Run time: 25.00 min

FRONT INLET (SPLIT/SPLITLESS)

Mode: Splitless
Initial temp: 260 'C (On)
Pressure: 20.00 psi (On)
Purge flow: 50.0 mL/min
Purge time: 2.00 min
Total flow: 54.1 mL/min
Gas saver: On
Saver flow: 15.0 mL/min
Saver time: 4.00 min
Gas type: Helium

BACK INLET (UNKNOWN)

COLUMN 1

Capillary Column
Model Number: Agilent 19091B-102
Ultra 2 5% Phenyl Methyl Siloxane
Max temperature: 325 'C
Nominal length: 25.0 m
Nominal diameter: 200.00 um
Nominal film thickness: 0.33 um
Mode: constant pressure
Pressure: 20.00 psi
Nominal initial flow: 1.0 mL/min
Average velocity: 41 cm/sec
Inlet: Front Inlet
Outlet: MSD
Outlet pressure: vacuum

COLUMN 2

(not installed)

FRONT DETECTOR (NO DET)

SIGNAL 1

Data rate: 20 Hz
Type: test plot
Save Data: Off
Zero: 0.0 (Off)
Range: 0
Fast Peaks: Off
Attenuation: 0

BACK DETECTOR (NO DET)

SIGNAL 2

Data rate: 20 Hz
Type: test plot
Save Data: Off
Zero: 0.0 (Off)
Range: 0
Fast Peaks: Off
Attenuation: 0

COLUMN COMP 1

(No Detectors Installed)

COLUMN COMP 2

(No Detectors Installed)

THERMAL AUX 2

Use: MSD Transfer Line Heater
Description: GCMS interface
Initial temp: 280 'C (On)

THCSCANS.M Fri Mar 03 09:54:27 2017

Page: 1

Initial time: 0.00 min
Rate Final temp Final time
1 0.0(Off)

POST RUN
Post Time: 0.00 min

TIME TABLE
Time Specifier Parameter & Setpoint

GC Injector

Front Injector:

~~Sample Washes 1~~
~~Sample Pumps 3~~
~~Injection Volume 3.00 microliters~~
~~Syringe Size 10.0 microliters~~
~~PreInj Solvent A Washes 2~~
~~PreInj Solvent B Washes 1~~
~~PostInj Solvent A Washes 2~~
~~PostInj Solvent B Washes 2~~
~~Viscosity Delay 2 seconds~~
~~Plunger Speed Fast~~
~~PreInjection Dwell 0.00 minutes~~
~~PostInjection Dwell 0.00 minutes~~
~~Sampling Depth 1.4 mm~~ → ?

● Back Injector:
No parameters specified

Column 1 Inventory Number : AB001
Column 2 Inventory Number :

MS ACQUISITION PARAMETERS

General Information

Tune File : atune.u
Acquisition Mode : Scan

MS Information

Solvent Delay : 12.00 min
EMV Mode : Relative
Resulting EM Voltage : 988

[Scan Parameters]

~~Low Mass : 50.0~~
~~High Mass : 550.0~~
~~Threshold : 30~~
Sample # : 3 A/D Samples 8

[MSZones]

~~MS Source : 230 C maximum 250 C~~
~~MS Quad : 150 C maximum 200 C~~

END OF MS ACQUISITION PARAMETERS

TUNE PARAMETERS for SN: US61623048

Trace Ion Detection is OFF.

EMISSION : 34.610
ENERGY : 69.922

HCSCANS.M Fri Mar 03 09:54:27 2017

Page: 2

REPELER : 28.112
IONFOCUS : 79.718
ENTRANCE_LE : 12.500
EMVOLTS : 988.235

Actual EMV : 1258.82
GAIN FACTOR : 1.03

AMUGAIN : 1733.000
AMUOFFSET : 122.563
FILAMENT : 2.000
DCPOLARITY : 0.000
ENTLENSOFFS : 18.322
MASSGAIN : -499.000
MASSOFFSET : -38.000

END OF TUNE PARAMETERS

END OF INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS

Annexe 4 : SOP pour l'extraction de cannabinoïdes dans de les urines, Hôpital de Sion

ICH
Automates : Chimie
spécialités

Cannabis GC-MS urine

Réf. : SOP-1192
Version : 12
Processus : 3.4.16.5 GC-MS



Hôpital du Valais
Spital Wallis

7.3. Extraction liquide-solide

- Sur le système d'extraction liquide-solide Visiprep, préparer une colonne Bond Elut Certify pour chaque étalon, contrôle ou échantillon.
- Conditionner les colonnes d'extraction avec 2.0 mL de méthanol, puis avec 2.0 mL d'acide phosphorique 50 mmol/L.
- Sans laisser sécher les colonnes, déposer à leur surface les étalons, contrôles et échantillons. Eluer au vide lentement, de manière à faire passer tout le liquide en 1 à 2 min au moins.
- Rincer chaque tube avec 3.0 mL d'acide phosphorique 50 mmol/L, puis déposer chaque solution à la surface des colonnes correspondantes.
- Rincer les colonnes avec 3.0 mL d'acide phosphorique 50 mmol/L.
- Rincer une dernière fois les colonnes avec 2.0 mL du mélange acide phosphorique 50 mmol/L / MeOH (80:20).
- Aspirer avec le vide au maximum pendant 3 min pour tout éluer.
- Sécher l'intérieur des colonnes avec des Q-Tips et essuyer complètement les aiguilles et le couvercle du système d'extraction liquide-solide Visiprep.
- Une fois le système remonté, sécher les colonnes en ajoutant 1.0 mL d'hexane. Aspirer avec le vide au maximum pendant 10 à 15 min pour bien sécher les colonnes et démonter le système d'aspiration au vide pour essuyer encore une fois les aiguilles et leur entourage.
- Extraire les dérivés du cannabis avec 2.0 mL d'hexane / acétate d'éthyle (80:20) et récolter les éluats dans des tubes à essai en verre de 5 mL.
- Evaporer à sec sous flux d'azote, à 37 °C.

7.4. Dérivatisation

- Reprendre les résidus de l'extraction avec 75 µL de BSTFA (ou sylon BFT).
- Mettre des bouchons, vortexer brièvement, et chauffer 30 min à 60 °C sur le bloc chauffant.
- Puis récupérer le tout dans un micro-flacon, centrifuger 10 min à 2500 t/min.
- Injecter 1 µL au GC-MS.

7.5. Analyse par GC-MS

L'injection se fait sur le GC-MS B.

L'injection par GC-MS se fait en mode "splitless" sur une colonne capillaire HP Ultra 2 "cross-linked" 5% phénylméthylsilicone (HP 19091B-102 ou similaire dans une autre marque), 25 m x 0.2 mm I.D., épaisseur du film 0.33 µm.

Les conditions de travail sont répertoriées dans le classeur « Liste des méthodes GC-MS ».

L'injection par GC-MS se fait en mode SIM avec la méthode THCSIMU.M pour la quantification et accessoirement en mode SCAN avec la méthode THCSCANU.M pour une éventuelle identification des substances et/ou la vérification des temps de rétention. L'acquisition définie sous THCSIMU.M contient un groupe de pics enregistrés à des temps de rétention et avec des m/z différents :

Premier groupe:

- THC-COOH : 371.4 - 488.4
- THC-COOH-D3 : 374.4 - 491.4

Pour plus d'informations concernant l'utilisation du GC-MS, consulter le guide d'utilisation de l'instrument.

Redigé par : Nicole Beloeil
Approuvé par : Nicolas Donzé (29/03/2017)
Document papier non géré - Imprimé le : 2017-03-29

Rédigé le : 28/03/2017
Diffusé le : 29/03/2017

4/7

www.hopitalvs.ch
www.spitalvs.ch

Annexe 5 : Méthode GC-MS pour échantillons d'urines, Hôpital de Sion

```
INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS:  GCMS B
-----
C:\MSDCHEM\1\METHODS\THCSIMU.M
  Fri Mar 03 09:56:56 2017

Control Information
-----
Sample Inlet      : GC
Injection Source  : GC ALS
Mass Spectrometer : Enabled

                                     6 3 MARS 2017

No Sample Prep method has been assigned to this method.

=====
6890 GC METHOD
=====

OVEN
Initial temp: 70 'C (On)           Maximum temp: 325 'C
Initial time: 0.00 min             Equilibration time: 0.50 min
Ramps:
# Rate Final temp Final time
1 30.00 320 5.00
2 0.0 (Off)
Post temp: 320 'C
Post time: 1.67 min
Run time: 13.33 min

FRONT INLET (SPLIT/SPLITLESS)     BACK INLET (UNKNOWN)
Mode: Splitless
Initial temp: 250 'C (On)
Pressure: 22.67 psi (On)
Purge flow: 50.0 mL/min
Purge time: 1.00 min
Total flow: 54.4 mL/min
Gas saver: On
Saver flow: 15.0 mL/min
Saver time: 2.00 min
Gas type: Helium

COLUMN 1                          COLUMN 2
Capillary Column                  (not installed)
Model Number: Agilent 19091B-102
Ultra 2 5% Phenyl Methyl Siloxane
Max temperature: 325 'C
Nominal length: 25.0 m
Nominal diameter: 200.00 um
Nominal film thickness: 0.33 um
Mode: constant flow
Initial flow: 1.3 mL/min
Nominal init pressure: 22.68 psi
Average velocity: 46 cm/sec
Inlet: Front Inlet
Outlet: MSD
Outlet pressure: vacuum

FRONT DETECTOR (NO DET)          BACK DETECTOR (NO DET)

SIGNAL 1                         SIGNAL 2
Data rate: 20 Hz                 Data rate: 20 Hz
Type: test plot                 Type: test plot
Save Data: Off                  Save Data: Off
Zero: 0.0 (Off)                 Zero: 0.0 (Off)
Range: 0                        Range: 0
Fast Peaks: Off                 Fast Peaks: Off
Attenuation: 0                  Attenuation: 0

COLUMN COMP 1                    COLUMN COMP 2
(No Detectors Installed)        (No Detectors Installed)

THERMAL AUX 2
Use: MSD Transfer Line Heater
Description: GCMS interface
Initial temp: 280 'C (On)

THCSIMU.M Fri Mar 03 09:56:55 2017                                     Page: 1
```

*Modifications avec
N. Johnsen (nov. 2016)*

Initial time: 0.00 min
Rate Final temp Final time
1 0.0(Off)

POST RUN
Post Time: 1.67 min
Oven Temperature: 320 °C
Column 1 Flow: 1.2 mL/min

TIME TABLE
Time Specifier Parameter & Setpoint

GC Injector

Front Injector:

Sample Washes	2
Sample Pumps	4
Injection Volume	1.00 microliters
Syringe Size	10.0 microliters
PreInj Solvent A Washes	2
PreInj Solvent B Washes	1
PostInj Solvent A Washes	2
PostInj Solvent B Washes	1
Viscosity Delay	2 seconds
Plunger Speed	Fast
PreInjection Dwell	0.00 minutes
PostInjection Dwell	0.00 minutes
Sampling Depth	1.4 mm

Back Injector:
No parameters specified

Column 1 Inventory Number : AB001
Column 2 Inventory Number :

MS ACQUISITION PARAMETERS

General Information

Tune File : atune.u
Acquisition Mode : SIM

MS Information

Solvent Delay : 8.00 min
EMV Mode : Relative
Relative Voltage : 0
Resulting EM Voltage : 988

[Sim Parameters]

GROUP 1
Group ID : 1
Resolution : Low
Plot 1 Ion : 371.40
Ions/Dwell In Group (Mass, Dwell) (Mass, Dwell) (Mass, Dwell)
(371.40, 100) (374.40, 100) (488.40, 100)
(491.40, 100)

[MSZones]

MS Source : 230 C maximum 250 C
MS Quad : 150 C maximum 200 C

END OF MS ACQUISITION PARAMETERS

TUNE PARAMETERS for SN: US61623048

THCSIMU.M Fri Mar 03 09:56:55 2017

Page: 2

Trace Ion Detection is OFF.

EMISSION : 34.610
ENERGY : 69.922
REPELLER : 28.112
IONFOCUS : 79.718
ENTRANCE_LE : 12.500
EMVOLTS : 988.235

Actual EMV : 1258.82
GAIN FACTOR : 1.03

AMUGAIN : 1733.000
AMUOFFSET : 122.563
FILAMENT : 2.000
DCPOLARITY : 0.000
ENTLENSOFFS : 18.322
MASSGAIN : -499.000
MASSOFFSET : -38.000

END OF TUNE PARAMETERS

END OF INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS
