

METHODE DE DETERMINATION QUANTITATIVE DU DELTA-9-TETRAHYDROCANNABINOL (9-THC) ET DE CANNABIDIOL (CBD) DES VARIETES DE FLEURS DE *Cannabis sativa L.*

CHAPITRE I - Objet et champ d'application

Cette méthode est fondée sur la détermination quantitative par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC-DAD).

CHAPITRE II - Echantillonnage et prélèvement

Cette procédure détaille les étapes d'échantillonnage et de prélèvements de fleurs de plantes entières de *Cannabis sativa L.* en culture ou en séchage.

L'échantillonnage est l'étape qui consiste à sélectionner une quantité homogène et représentative d'une population à analyser.

Le prélèvement est l'action qui consiste à prélever la quantité nécessaire afin que l'échantillonnage soit représentatif de la population.

SECTION I - Plan d'échantillonnage

Le plan d'échantillonnage est basé sur la procédure de la Pharmacopée Européenne -2.8.20 – Echantillonnage des drogues végétales, il tient compte du nombre de plants présents dans une population d'une variété de *Cannabis sativa L.* et procède à un tirage aléatoire sur les plants qui seront sélectionnés pour être représentatifs de la parcelle. La taille de l'échantillon est déterminée en fonction du nombre total de plantes dans la population à échantillonner (N). Le nombre de plantes à prélever, noté n, est calculé de la manière suivante :

- Si $N \leq 3$: $n = N$ (effectuer les prélèvements sur l'ensemble des plantes)
- Si $N > 3$: $n = \sqrt{N} + 1$, arrondi à l'unité supérieur

Exemple : Soit un champ homogène de 500 plantes d'une seule et unique variété de cannabis.

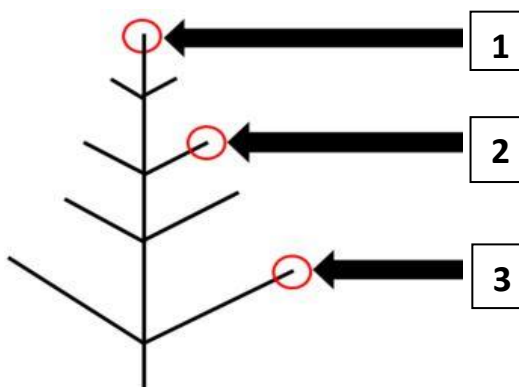
$N = 500$

$n = \sqrt{500} + 1 = 22,4 + 1 = 23,4$ donc arrondis à 24 plantes à prélever.

SECTION II - Méthode de prélèvements

Le prélèvement est réalisé pendant la journée, en suivant un parcours systématique qui garantit une collecte représentative de la parcelle, tout en excluant les bordures. Sur chaque plante sélectionnée, trois fleurs sont prélevées :

- une dans la partie apicale (1),
- une dans la partie médiane (2),
- et une dans la partie basse (3).



Dans le cas d'une variété dioïque, seules les fleurs des plantes femelles seront prélevées.

Toutes les fleurs prélevées doivent être mises à sécher dès que possible, et au plus tard dans les 48 heures suivant leur prélèvement. Le séchage est réalisé dans des conditions optimales, c'est-à-dire dans un environnement bien ventilé et à l'abri de la lumière directe du soleil, afin d'éviter un dessèchement trop rapide ou la formation de moisissures. Les échantillons sont séchés jusqu'à ce que leur poids reste constant, avec une humidité résiduelle inférieure à 15 %. Une fois secs, les échantillons sont placés dans un contenant unique fourni par le laboratoire. Si nécessaire, un second contenant peut être utilisé. Les échantillons secs sont ensuite envoyés, dans les plus brefs délais au laboratoire pour déterminer leur teneur en Δ^9 -THC.

S'il y a stockage des échantillons avant acheminement au laboratoire, ils doivent être stockés, dans la mesure du possible, dans un endroit frais, sec, ventilé et à l'abri du soleil.

CHAPITRE III - Séchage et stockage de l'échantillon

Les échantillons secs reçus au laboratoire sont broyés au mortier/pilon puis tamisés au tamis de 1mm. Une procédure en interne est appliquée pour l'homogénéité de l'échantillon.

L'échantillon pulvérisé et tamisé est conservé, au sec et à l'abri de la lumière jusqu'à la réalisation de l'analyse.

CHAPITRE IV - Droite d'étalonnage

La quantification en delta-9 tétrahydrocannabinol (9-THC) et en cannabidiol (CBD) se fait par étalonnage. Cette technique nécessite au préalable la réalisation de solutions étalons de concentrations molaires connues.

Les solutions étalons de concentrations molaires connues sont obtenues à partir de matériaux de référence certifiés à des concentrations connues. On réalise les différentes dilutions (concentrations connues) à partir de ces matériaux de référence certifiés.

Les solutions aux différentes concentrations sont analysées par HPLC-DAD et les résultats obtenus permettent la construction de la droite d'étalonnage. Cette droite d'étalonnage se fait sur 6 points allant de 0.5ppm à 100ppm.

CHAPITRE V - Extraction au solvant

Au 100mg de notre prise d'essai sont rajouté 10ml de méthanol. Le temps d'extraction est de 15 minutes avec des séquences d'agitation du mélange, couplé à des temps de décantation.

Au bout de ce temps la solution est prélevée et filtrée sur filtre PTFE de 0.45 μ m. Les dilutions nécessaires sont réalisées sur cette solution filtrée avec du méthanol. L'échantillon ainsi préparé est prêt pour l'analyse.

CHAPITRE VI - Chromatographie Liquide à Haute Performance couplé au DAD

SECTION I - Appareillage

- Chromatographie en phase liquide à haute performance couplé à un détecteur à barrette de diodes.
- Colonne de silice greffée en phase inverse.

SECTION II - Conditions d'élution

- Solution A : Eau (0.085% acide phosphorique).
- Solution B : Acétonitrile (0.085% acide phosphorique).
- Elution en gradient d'élution.
- Température du four de la colonne : 35°C.
- Volume d'injection : 5µl.

SECTION III - Expression des résultats

Les concentrations de 9-THC et de CBD sont exprimées en pourcentage rendu par rapport à la masse de l'échantillon analysé. L'analyse par cette technique HPLC permet de connaître les teneurs d'autres composés tels que les formes acides du 9-THC (THCA) et du CBD (CBDA).

Le rapport émis devra exprimer les résultats comme suit :

Concentration de THC= pourcentage ramené à la masse de l'échantillon,

Concentration de CBD= pourcentage ramené à la masse de l'échantillon,

Concentration de THCA= pourcentage ramené à la masse de l'échantillon,

Concentration de CBDA= pourcentage ramené à la masse de l'échantillon.

Et enfin, on exprime le pourcentage du potentiel de 9-THC et de CBD de l'échantillon par les formules suivantes :

$$[\text{THC}_{\text{potentiel}}] = [\text{THC}] + 0.877x [\text{THCA}]$$

$$[\text{CBD}_{\text{potentiel}}] = [\text{CBD}] + 0.877x [\text{CBDA}]$$