

Université de Montréal

**Développement de méthodes de dépistage des médicaments
de contrefaçon et des produits adultérés par LC-MS/MS**

par
Philippe Lebel

Département de chimie
Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en chimie

Décembre 2014

© Philippe Lebel, 2014

Résumé

Ce projet de maîtrise implique le développement et l'optimisation de deux méthodes utilisant la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS). L'objectif du premier projet était de séparer le plus rapidement possible, simultanément, 71 médicaments traitant la dysfonction érectile (ED) et 11 ingrédients naturels parfois retrouvés avec ces médicaments dans les échantillons suspectés d'être adultérés ou contrefaits. L'objectif du deuxième projet était de développer une méthode de dépistage permettant l'analyse rapide simultanée de 24 cannabinoïdes synthétiques et naturels pour une grande variété d'échantillons tels que les mélanges à base de plantes, des bâtons d'encens, de sérums et de cannabis. Dans les deux projets, la séparation a été réalisée en moins de 10 min et cela en utilisant une colonne C₁₈ à noyau solide 100 × 2,1 mm avec des particules de 2,6 µm de diamètre couplée à un système MS avec trappe ionique orbitale fonctionnant en électronébulisation positive. En raison du nombre élevé de composés dans les deux méthodes et de l'émergence de nouveaux analogues sur le marché qui pourraient être présents dans les échantillons futurs, une méthode de dépistage LC-MS/MS ciblée/non-ciblée a été développée. Pour les deux projets, les limites de détection étaient sous les ng/mL et la variation de la précision et de l'exactitude étaient inférieures de 10,5%. Le taux de recouvrement à partir des échantillons réels variait entre 92 à 111%. L'innovation des méthodes LC-MS/MS développées au cours des projets est que le spectre de masse obtenu en mode balayage lors de l'acquisition, fournit une masse exacte pour tous les composés détectés et permet l'identification des composés initialement non-ciblés, comme des nouveaux analogues. Cette innovation amène une dimension supplémentaire aux méthodes traditionnellement utilisées, en permettant une analyse à haute résolution sur la masse de composés non-ciblés.

Mots-clés : Médicaments traitant la dysfonction érectile; Flavonoids; Inhibiteurs de phosphodiesterase de type 5; Éjaculation prématurée; Échantillon contrefait; médicaments illégaux; Supplément alimentaire adultéré; échantillon adultéré; cannabinoïdes synthétiques et naturelles; LC-MS; Spice

Abstract

This master's project involved the development and optimization of two rapid liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) methods. The objective of the first project was to simultaneously separate, as rapidly as possible, 71 erectile dysfunction (ED) treatment drugs and 11 natural ingredients sometimes found alongside ED drugs present in suspected adulterated or counterfeit samples. The objective of the second project was to develop a screening method allowing rapid, simultaneous analysis of 24 synthetic and natural cannabinoids for a wide variety of samples such as herbal smoking mixtures, incense sticks, serums and Cannabis plant material. In both projects, the separations were achieved in ≤ 10 min using 2.6 μm fused-core C_{18} particles packed into a 100×2.1 mm column coupled to an LTQ Orbitrap XL mass spectrometer operated in positive electrospray mode. Because of the very high number of compounds in both methods and the knowledge that future analogues are always immersing on the market that could thus be present in samples, a targeted/untargeted LC-MS/MS screening method was developed. For both projects, detection limits were in the sub ng/mL range and intra- and inter-assay precisions were below 10.5%. Recovery from real samples ranged from 92 to 111%. The innovation of the developed LC-MS/MS methods is that the full scan event in the MS acquisition provides accurate masses for all detected species and thus allows post-analysis identification of initially untargeted compounds, i.e., the immersing analogues. This innovation adds an additional dimension to traditional MS/MS methods, allowing high mass resolution of untargeted compounds.

Keywords : Erectile dysfunction drugs; Flavonoids; Phosphodiesterase type 5 inhibitors; Premature ejaculation; Counterfeit samples; illicit drugs; Adulterated dietary supplements, Synthetic and natural cannabinoids; LC-MS; adulterated samples; Spice

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xi
1. Introduction.....	1
1.1 Les médicaments contrefaits pour traiter la dysfonction érectiles.....	2
1.2 Les cannabinoïdes.....	4
1.3 Objectifs des projets.....	7
2. Instrumentation.....	8
2.1 Chromatographie liquide à haute performance.....	9
2.2 Spectrométrie de masse.....	15
3. Partie expérimentale.....	21
3.1 Préparation des échantillons.....	22
3.2 Détermination des paramètres expérimentaux du spectromètre de masse.....	23
3.3 Optimisation de la méthode LC-MS.....	31
3.3.1 Phase stationnaire.....	31
3.3.2 Phase mobile.....	32
3.4 Performance de la méthode.....	32
3.4.1 Paramètres analytiques.....	32
3.4.2 Étude de stabilité.....	34
3.4.3 Validation croisées.....	34
4. Analyse des médicaments traitant la dysfonction érectile.....	36
4.1 Abstract.....	38

4.2 Introduction.....	39
4.3 Materials and methods	40
4.3.1 Reagents and standards	40
4.3.2 Samples and sample preparation.....	50
4.3.3 LC-MS/MS operating conditions.....	51
4.3.4 Method performance	52
4.4 Results and discussion	53
4.4.1 Selectivity	54
4.4.2 Solution stability	58
4.4.3 Matrix effects and carryover	58
4.4.4 Linearity, detection limit, quantification limit and recovery	59
4.4.5 Precision and accuracy.....	60
4.4.6 Analysis of samples	61
4.5 Conclusion	64
4.5.1 Acknowledgements.....	65
4.6 Supporting information.....	66
S4.6.1 Reagents and Standards	66
5. Analyse des cannabinoids.....	74
5.1 Abstract.....	76
5.2 Introduction.....	77
5.3 Experimental.....	78
5.3.1 Reagents and Standards	78
5.3.2 Sample preparation	80
5.3.3 LC-MS/MS operating conditions.....	80
5.4 Results and Discussion	84
5.4.1 Method development and validation.....	84
5.4.2 Application to the analysis of seized samples.....	90
5.5 Conclusion	93
5.6 Supporting information.....	93
6. Conclusions.....	97

6.1 Travaux futurs.....	100
7. Bibliographie.....	101

Liste des figures

Figure 2.1. Variation de l'efficacité de la séparation en fonction du débit (relation de Van Deemter) selon les différentes dimensions de particules. [30].....	12
Figure 2.2. Impact de la température de la colonne sur l'efficacité d'un system en fonction du débit. [30]	13
Figure 2.3. Impact de la résolution sur la séparation chromatographique entre deux composés à différentes concentrations relatives.	14
Figure 2.4. Schéma interne de LTQ Orbitrap XL. [33]	15
Figure 2.5. Application des différentes sources à pression atmosphérique (API). [34]	16
Figure 2.6. Schéma du processus d'ionisation par nébulisation électrostatique. [35]	17
Figure 2.7. Principe du piégeage des ions à l'intérieur de la trappe ionique. [33]	18
Figure 3.1. Schéma de l'interface ESI (vue rapprochée de la pointe de l'aiguille) où dans l'image du haut un capillaire en silice fondu est utilisé et dans celle du bas, un capillaire en acier inoxydable. [33]	24
Figure 3.2. Schéma de l'optimisation de l'énergie de collision de 0-100 eV du Tadalafil.	25
Figure 3.3. Impact de l'énergie de collision sur l'abondance relative des ions produits. Une énergie de collision de 10% a été appliquée dans l'image du haut, 20% dans celle du milieu et 30% dans l'image du bas.	27
Figure 3.4. Comparaison du pourcentage d'éluant B, typiquement fait du solvant organique, fourni entre deux systèmes HPLC. [37]	29
Figure 3.5.a	30
Figure 3.5.b Comparaison de la forme du pic entre deux injections ou en a) l'exemple d'un pic chromatographique avec un nombre suffisant de points et en b) l'exemple d'un pic chromatographique avec un nombre insuffisant de points.	30
Figure 3.6. Courbes d'étalonnage de cinq drogues contre la dysfonction érectile (sildenafil, tadalafil, 2-(2-Ethoxyphenyl)-5-methyl-7-propyl-3H-imidazo[5,1-f][1, 2, 4]triazin-4-one, norneovardenafil et sildenafil-8)	33
Figure 4.2. Typical chromatograms obtained by LC-MS/MS in positive electrospray mode. The extracted parent ion chromatograms (in alphabetical order) of all 82	

	compounds spread over 4 panels for ease of presentation are shown. Separation and detection were carried out as described in Section 4.2.3.	56
Figure 4.3.	Counterfeit sample of Cialis showing the presence of tadalafil and the adulterant sildenafil. The uppermost panel represents the total ion chromatogram [53] and the lower two panels show the extracted ion chromatograms of sildenafil (middle panel) and tadalafil (lower panel). Separation and detection were carried out as described in Section 4.2.3.	62
Figure 4.4.	Illegal product showing the presence of tadalafil and the adulterant N-octyl-nortadalafil. The uppermost panel represents the TIC and the lower two panels show the extracted ion chromatograms of tadalafil (middle panel) and N-octyl-nortadalafil (lower panel). Separation and detection were carried out as described in Section 4.3.	63
Figure 5.2.	Typical chromatograms obtained by LC-MS/MS in positive electrospray mode for a mixture containing all 24 analytes. The upper trace of the first panel represents the total ion chromatogram [53], followed by the extracted ion chromatograms of all the compounds spread over 3 panels for ease of presentation (parent ions shown).	86
Figure 5.3.	Fragmentation pattern of two isomers: AM-2201 (upper pane) and AM-2201 N-(4-fluoropentyl) isomer (lower pane).	87
Figure 5.4.	Fragmentation pattern of two isomers: JWH-019 (upper pane) and JWH-122 (lower pane).	88
Figure 5.5.	Illegal product (incense stick) showing the presence of controlled synthetic cannabinoids: JWH-018 and JWH-073. The uppermost panel represents the TIC and the lower two extracted chromatograms showing detection of JWH-018 (middle panel) and JWH-073 (lower panel).	91
Figure 5.6.	Cannabis sample showing the presence of THC, cannabidiol, cannabigerol and cannabino. The uppermost panel represents the TIC. Extracted ion chromatograms (lower three panels) show detection of the four cannabinoid compounds.	92

Liste des tableaux

Table 4.1. Quantitative method performance (LOQ, LOQ and recovery) of 21 erectile dysfunction (ED) drugs spiked into herbal or tablet-based matrix.....	60
Table 4.2. Intra-assay precision and accuracy and inter-assay precision for four erectile dysfunction (ED) drugs.	61
Table S4.3. Accurate mass, MS ² and MS ³ (arising from MS ² transitions shown in bold) of the 71 ED active ingredients and 11 natural ingredients, shown in alphabetical order.	67
Table 5.1: Accurate mass, MS ² and MS ³ (arising from MS ² in boldface type) of the 24 synthetic and natural cannabinoids.....	82
Table 5.2. Quantitative method performance values for 15 synthetic and natural cannabinoids in an incense stick.....	95
Table 5.3. Intra-assay (n=5) precision and accuracy and inter-assay (n=10) precision for ten synthetic cannabinoids.....	96

Liste des abréviations

α	Sélectivité « <i>Selectivity</i> »
AC	Courant Alternatif « <i>Alternating current</i> »
ACN	Acétonitrile
API	Ionisation à pression atmosphérique « <i>Atmospheric Pressure Ionization</i> »
C8	Octyle
C ₁₈	Octadécyle
CBD	Cannabidiol
CBG	Cannabigerol
CBN	Cannabinol
C _m	Concentration d'analyte dans la phase mobile
CP	Cyclohexylphenols
C _s	Concentration d'analyte dans la phase stationnaire
DC	<i>Courant direct</i> « <i>Direct current</i> »
ED	Dysfonction érectile « <i>Erectile Dysfunction</i> »
ESI	Électronébulisation « <i>Electrospray Ionization</i> »
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux « <i>Food and Drug Administration</i> »
FTMS	Spectrométrie de masse à transformée de Fourier « <i>Fourier Transform</i> »
GC-MS	Chromatographie gazeuse couplé à la spectrométrie de masse « <i>Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i> »
GLP	Bonne pratique de laboratoire « <i>Good Laboratory Practice</i> »
HCD	« <i>Higher energy Collisional Dissociation</i> »
HEPT	Hauteur équivalente à un plateau théorique « <i>Height Equivalent to a Theoretical Plate</i> »
HPLC-PDA	Chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrettes de photodiodes « <i>High Performance Liquid Chromatography coupled to a Photodiode Array Detector</i> »
ITMS	Spectrométrie de masse par piégeage d'ions « <i>Ion Trap Mass Spectrometry</i> »
k	Facteur de rétention « <i>Retention Factor</i> »

K	Coefficient de partage « <i>Partition Coefficient</i> »
HPLC-MS/MS	Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem « <i>High Performance Liquid Chromatography coupled-tandem mass spectrometry</i> »
LOD	Limite de détection « <i>Limit of Detection</i> »
LOQ	Limite de quantification « <i>Limit of Quantitation</i> »
m	Masse « <i>Mass</i> »
MeOH	Méthanol « <i>Methanol</i> »
MRFA	(met-arg-phe-ala) peptide
MRM	Suivi de Réactions Multiples « <i>Multiple Reaction Monitoring</i> »
MS	Spectrométrie de masse « <i>Mass Spectrometry</i> »
N	Nombre de plateau théorique « <i>Theoretical plates</i> »
PDE5-i	Inhibiteurs de phosphodiesterase de type 5 « <i>Type 5 Phosphodiesterase Inhibitors</i> »
QQQ	Triple quadripôle « <i>Triple Quadrupole</i> »
QTOF	Quadripôle complée à un temps de vol « <i>Quadrupole time of flight</i> »
R	Résolution « <i>Resolution</i> »
RF	Radio Fréquence « <i>Radio Frequency</i> »
SIM	Monitoring des ions sélectionnées « <i>Selected ion monitoring</i> »
S/N	Signal/Bruit « <i>Signal to Noise ratio</i> »
SOP	Procédure Operationnelle Normalisée « <i>Standard Operation Procedure</i> »
t ₀	Volume mort « <i>Dead volume</i> »
TCC	Compartiment à colonne thermostaté « <i>Thermostated column compartment</i> »
THC	Tetrahydrocannabinol
THF	Tétrahydrofurane
TOF	Temps de vol « <i>Time of Flight</i> »
WHO	Organisation mondiale de la santé « <i>World Health Organization</i> »
z	Charge « <i>Charge</i> »
Δm	Erreur sur la masse « <i>Mass variation</i> »

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier la Professeure Karen Waldron pour m'avoir offert l'opportunité de faire ma maîtrise sous sa direction et celle de Jacques Gagnon en collaboration avec Santé Canada.

Je voudrais particulièrement remercier la Dr. Alexandra Furtos qui m'a pris sous son aile et a été un réel mentor pour moi au cours des dernières années. Je lui suis reconnaissant de m'avoir permis de présenter mes projets à différentes conférences et d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions.

Je désire aussi remercier les autres membres du laboratoire de spectrométrie de masse de l'Université de Montréal, Karine Venne et Marie-Christine Tang de m'avoir donné un accès privilégié au laboratoire et pour tous leurs conseils et discussions très animées.

Je voudrais aussi remercier mes collègues chez Santé Canada avec qui j'ai passé une grande partie de ma maîtrise, nous avons eu beaucoup de plaisir, mais aussi beaucoup travaillé, mais aussi Jacques Gagnon qui m'a offert l'opportunité de faire ma maîtrise et qui a vu en moi le potentiel pour effectuer un tel projet dans son laboratoire en collaboration avec l'Université de Montréal.

Je voudrais aussi remercier ma mère pour m'avoir supporté à travers mes études et encourager à viser plus haut.

Finalement, je voudrais remercier ma femme Vanessa qui m'a supporté et encouragé à travailler sur mon mémoire, même quand j'avais moins de motivation. Elle a aussi été une grande aide au niveau des multiples corrections de mes textes avant de les soumettre à mes directeurs de recherches.

1. Introduction

1.1 Les médicaments contrefaits pour traiter la dysfonction érectiles

Les médicaments de contrefaçon sont en essor et sont présents dans divers domaines de notre quotidien. Les composés contrefaits peuvent présenter un réel danger pour le consommateur dans l'éventualité où les doses ne sont pas contrôlées ou que des agents actifs autre que ceux attendus soient présents. Le premier projet dans le cadre de ce mémoire de maîtrise, dont la publication est présentée dans la section 4, portera sur le développement d'une méthode permettant l'analyse rapide et efficace des inhibiteurs de phosphodiesterase de type 5 (PDE5-i), mieux connus sous le nom de médicaments pouvant traiter la dysfonction érectile (ED). Au moment de cette étude, seulement trois PDE5-i étaient commercialisés, soit le sildenafil citrate (Viagra®) développé par Pfizer, le tadalafil (Cialis®) développé par Eli Lilly et le vardenafil hydrochlorure (Levitra®) développé par Bayer. Des études cliniques ont été effectuées sur ces trois différents ingrédients actifs et leur toxicité et effets sur le corps sont connus par les agences gouvernementales (Santé Canada, FDA, etc.). [1-5]

Le sildenafil citrate a été découvert en 1989 et breveté par les laboratoires Pfizer en 1996. [6] Initialement, le sildenafil citrate était destiné pour le traitement de l'angine de poitrine qui est une forme de maladie cardiaque. Lors des essais cliniques, l'effet escompté de traitement de maladie cardiaque n'a pas été optimal. Un effet secondaire fut cependant observé, lié à la capacité du sildenafil citrate d'empêcher la destruction du monoxyde d'azote, qui est responsable de l'érection, Pfizer décida alors d'orienter leurs études sur un autre problème physique qui touche beaucoup d'hommes.[7-10] En 1998 aux États-Unis et en 1999 en Europe, le Viagra fut le premier médicament dans le traitement de l'impuissance érectile à être autorisé sur le marché et fut un immense succès commercial. La demande était tellement élevée que dans les pays où il n'était pas encore commercialisé, il s'est retrouvé en vente sur le marché noir à des prix beaucoup plus élevés que le prix des médicaments légaux ailleurs.[7-10] De nos jours, pour se procurer des médicaments pouvant traiter la ED, il est nécessaire d'avoir une discussion embarrassante avec son médecin pour être en mesure d'avoir une prescription. L'internet a permis une facilité d'accès et cela sans prescription. De plus, certains sites internet soutiennent ou disent vendre des génériques du Viagra® et cela à prix moindre,

mais il est important de comprendre que malgré le fait que le brevet de Pfizer est venu à terme au Canada en 2013, le brevet est encore actif aux Etats-Unis et ailleurs. [10]

Malgré les multiples avertissements publics du gouvernement et des médias, il en demeure que selon l'Organisation mondiale de la santé (WHO), les ventes de médicaments illégaux étaient proches de 75 milliards de dollars en 2010 et chacun de ces médicaments peuvent représenter un danger potentiel pour la santé du consommateur. [11] De plus, selon l'alliance européenne, 62 % des médicaments achetés sur internet en 2011 étaient faux. [12] Ces médicaments sont parfois conçus dans des milieux insalubres et peuvent contenir des ingrédients actifs ou autres agents pouvant avoir des effets néfastes, interagir et/ou diminuer l'effet de tout autre médicament consommé. La dose présente dans ces comprimés n'est pas toujours contrôlée et peut dépasser celle inscrite sur l'emballage pouvant engendrer une surdose. En raison de tous ces inconvénients qui peuvent causer un danger pour le consommateur, il est nécessaire d'effectuer un contrôle sur ces médicaments. Présentement, plusieurs analogues du sildenafil, tadalafil et vardenafil sont connus et employés dans la contrefaçon. En effet, lors de la synthèse du sildenafil citrate par Pfizer, plusieurs structures relativement similaires ont été synthétisées et expérimentées en tests cliniques sur des animaux pour être en mesure de déterminer l'efficacité et la toxicité de chacun des analogues.

Pour être en mesure de tromper les saisies des agences gouvernementales, les "chimistes" du marché noir créent des analogues en effectuant de légères modifications dans la structure chimique. Seulement le sildenafil citrate, tadalafil et vardenafil hydrochlorure ont été testés sur des humains et il n'est donc pas sécuritaire d'utiliser les autres analogues ne connaissant pas les risques. Santé Canada utilise déjà des méthodes instrumentales pour assurer l'authenticité des médicaments saisis dans les aéroports, douanes et dans certains cas, dans les pharmacies. Cependant, les méthodes utilisées sont souvent longues et un nombre élevé d'échantillons sont à analyser ce qui peut augmenter le délai de réponse indiquant si les médicaments saisis sont contrefaits ou non. Il est donc nécessaire de développer des méthodes plus rapides, mais tout aussi sensibles. De plus, comme mentionné plus haut, le brevet de Pfizer est venu à terme en 2013 au Canada. Un générique de Teva est déjà présent sur le marché et un nombre plus élevé de génériques sera présent sur le marché dans le futur ce qui augmentera, par le fait même le

nombre d'échantillons à analyser, mais aussi la difficulté pour les inspecteurs et analystes à discerner le vrai médicament du contrefait.

Présentement, les analystes utilisent des méthodes instrumentales telles la chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS), la chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrettes de diodes (HPLC-PDA) et la chromatographie liquide à haute performance couplée à un spectromètre de masse (LC-MS) pour analyser les médicaments traitant la ED.[1-4,13,14] Habituellement, ces types d'instruments utilisent des méthodes analytiques dites ciblées et ne sont pas en mesure de faire un dépistage des nouveaux composés qui peuvent être ajoutés de façon impromptue. Une technique ciblée, telle la «*Multiple Reaction Monitoring*» (MRM) qui est largement utilisée avec les analyseurs de masse de type triple quadripôle ou une technique qui contient une librairie de spectres (HPLC-UV et GC-MS) sont de mise lorsque les standards des composés ont déjà été ajoutés à la méthode. Par contre, en raison d'un grand nombre d'isomères et d'analogues qui sont présentement utilisés dans la contrefaçon, mais aussi qui seront synthétisés dans le futur, il sera nécessaire de développer une méthode permettant d'évaluer le ou les composés recherchés de façon non-ciblée et cela avec certitude. La séparation des différents composés et analogues des drogues traitant la ED est dans un premier temps un défi au niveau chromatographique considérant les ressemblances chimiques et structurales. La méthode utilisée au cours de ce projet combine la HPLC avec un spectromètre de masse de type trappe ionique orbitale et répond bien à ce besoin. Cette association offre une analyse non-ciblée, à haute résolution, qui permet une analyse de tous les composés présents dans un échantillon analysé et, simultanément, une analyse ciblée de 82 composés pouvant traiter la dysfonction érectile (figure 4.1) telle que présentée dans la publication du Chapitre 4. [5]

1.2 Les cannabinoïdes

Le deuxième projet décrit dans ce mémoire de maîtrise portera sur le développement d'une méthode permettant l'analyse rapide et efficace des cannabinoïdes naturels et synthétiques. Les cannabinoïdes naturels se retrouvent dans les feuilles et fleurs de la plante de cannabis, mieux connue sous le nom de Marijuana. L'ingrédient psychoactif principal du cannabis c'est

le tetrahydrocannabinol (THC). Le THC interagit avec les récepteurs CB1 et CB2 dans le cerveau pour exercer son activité psychotrope. Ces plantes contiennent aussi d'autres cannabinoïdes naturels tel le cannabidiol (CBD), cannabigerol (CBG) et le cannabinol (CBN).[15-28] Le deuxième groupe de cannabinoïdes analysés au cours de ce projet sont d'origine synthétique. Les cannabinoïdes synthétiques ont été synthétisés dans des laboratoires et sont souvent des métabolites et analogues du THC. Ces composés, lorsque fumés ou ingérés, vont avoir des effets similaires au THC dans le corps. Différents types de cannabinoïdes synthétiques sont présentement retrouvés sur le marché, soit les JWH, AM, AKB, CP qui peuvent tous être retrouvés dans la figure 5.1. Ces composés sont aussi connus sous le nom de *designer drugs* qui est un terme utilisé pour désigner les composés qui ont été découverts à travers la recherche effectuée dans les universités, compagnies ou par des laboratoires illégaux en essayant d'imiter les effets de l'ingrédients actifs déjà connus. Comme mentionné dans la deuxième publication, les JWH ont été synthétisés en 1970 par John W. Huffman à l'université de Clemson. Le JWH-18 a aussi des interactions pour les récepteurs CB1 et CB2 du cerveau, tout comme le THC. [23] Par contre, le JWH-18 a cinq fois plus d'affinité pour les récepteurs CB1 que le THC. La série AM a été développée à l'université Northeastern par Alexandros Makriyannis et les cyclohexylphenols (CP) ont été développés par Pfizer en 1970 [18].

La popularité des cannabinoïdes synthétiques a grandement augmenté et cette popularité a intéressé les agences gouvernementales. [18] Il est aussi important de comprendre que seulement certains cannabinoïdes synthétiques, mentionnés dans les listes des agences gouvernementales, sont contrôlés. De légères modifications dans la structure du cannabinoïde d'origine, créeraient un nouvel analogue, et il est donc plus difficile pour les agences d'entreprendre des actions de conformité.

Les laboratoires illégaux sont en mesure de synthétiser des composés dont la structure chimique est similaire à un autre composé, dont nous connaissons déjà les effets sur le corps, mais il peut différer par un ou plusieurs groupements fonctionnels et/ou atomes. Ces composés sont connus sous le nom d'analogues ou analogues chimiques. Ces analogues, malgré leur ressemblance structurelle, peuvent avoir des propriétés chimiques, biochimiques,

pharmacologiques ou physiques différentes que le composé d'intérêt. [18] En raison de l'augmentation continue du nombre de ces analogues pour but de tromper la loi, il est nécessaire de développer une méthode permettant de détecter les composés présents dans les échantillons avec certitude et cela de façon non-ciblée. Présentement, les analystes utilisent des méthodes instrumentales telles le GC-MS, HPLC-PDA et principalement le LC-MS pour analyser les cannabinoïdes. [15-28] Une technique traditionnelle ciblée, telle la MRM qui est largement utilisé avec les triples quadripôles, ne serait pas en mesure de faire un dépistage des nouveaux composés et serait en permanence un pas derrière sur le marché si dynamique des cannabinoïdes de contrefaçon. Les techniques qui contiennent une librairie, telles les GC-MS et les HPLC-UV auront le même problème, car tant que le nouvel analogue n'a pas été ajouté aux bibliothèques, il ne sera pas possible de détecter sa présence. La méthode utilisée au cours de ce projet comprend une séparation HPLC couplée à un MS de type trappe ionique orbitale, permettant une analyse non-ciblée à haute résolution de tous les composés présents dans un échantillon tout en ciblant 20 cannabinoïdes synthétiques et 4 naturels (figure 5.1).

Le centre Européen d'analyse des drogues a rapporté qu'en 2009 les échantillons *Spice* étaient généralement consommés par des adolescents et des jeunes adultes et cela en raison de la couverture médiatique de ces échantillons herbacés et du fait que ce type d'échantillon peut passer les tests de dépistage. Les "chimistes" du marché noir rendent le travail des agences gouvernementales encore plus difficile en effectuant la distribution de ces échantillons par la poste et en utilisant des contenants imaginatifs (jouets, peluches, etc). Ces drogues sont parfois conçues dans des milieux insalubres et peuvent contenir des ingrédients actifs ou autres agents pouvant avoir des effets néfastes sur le corps. De plus, très souvent, la dose présente n'est pas contrôlée pouvant être soit trop petite, soit trop élevée et engendrer une surdose. En raison de ces potentiels dangers pour le consommateur, il est nécessaire d'effectuer un contrôle soutenu sur ces drogues. [18]

Une méthode polyvalente et sensible est nécessaire, car les échantillons peuvent contenir plus d'un ingrédient actif et ils peuvent se présenter sous plusieurs formes avec différentes matrices, soit de type naturel, des tablettes ou des gélules. La publication présentée dans le journal LC/GC peut être retrouvée dans la section 5.[28]

1.3 Objectifs des projets

Deux différents types de familles ont été analysés au cours de ce mémoire, soit les médicaments traitant la dysfonction érectile et les cannabinoïdes. L'objectif des deux projets était de développer une nouvelle méthode plus rapide, fiable, efficace et spécifique pour l'identification et possiblement la quantification de 82 composés pouvant traiter la dysfonction érectile et 24 cannabinoïdes naturels et synthétiques. Les objectifs des deux projets ont dû être modifiés au cours de la maîtrise, car un nombre croissant de composés ont été ajoutés au fur et à mesure pour permettre un dépistage plus complet. En effet, initialement seulement 35 composés pouvant traiter la dysfonction érectile et 12 cannabinoïdes synthétiques étaient ciblés. Tel que mentionné dans la section 1.1 et 1.2, les laboratoires illégaux sont en mesure de synthétiser continuellement des analogues pour tromper les agences gouvernementales. Notre méthode incluant un grand nombre de composés et une analyse de type non-ciblée a permis de répondre aux nouvelles exigences et d'assurer sa validité, au moins pour un certain temps, pour le dépistage de nouveaux analogues. Le prochain chapitre donne les détails sur l'instrumentation utilisée. Le chapitre 3 présente la partie expérimentale des deux projets. Finalement, dans les chapitres 4 et 5, les deux études publiées sont présentées.

2. Instrumentation

Pour répondre aux objectifs précédemment définis, la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS) a été utilisée dans le cadre de ces projets.

2.1 Chromatographie liquide à haute performance

En raison du large domaine d'application de la chromatographie liquide à haute performance et de sa facilité d'utilisation, de nombreuses avancées sont survenues au cours des dix dernières années. En effet, les variétés des phases stationnaires dans les colonnes ont beaucoup augmenté, ce qui permet l'utilisation de différents types de chromatographie (phase inverse, phase normale, à échange d'ions, chirale et par exclusion). La tailles des particules s'est aussi diversifiée (soit des 4.6 μm , 2.7 μm , 2.1 μm et même 1.7 μm) ainsi que les diamètres internes de colonnes. De plus, dans certaines colonnes pour la chromatographie sur phase inversée, la chimie de la phase stationnaire a été modifiée pour augmenter la sélectivité envers certains types de composés et cela pour améliorer la séparation. L'Accucore aQ, qui contient une nouvelle technologie de particules, soit des particules à noyau solide (« *fused-core* »), permet d'analyser des composés à une gamme de pH entre deux à neuf, mais aussi à des températures élevées, soit jusqu'à 70°C. La possibilité d'effectuer des analyses dans des conditions plus poussées permet un meilleur contrôle sur la chromatographie. Les particules de l'accucore aQ contiennent un corps solide et une couche externe poreuse qui permettent une séparation rapide et à haute résolution. Le transfert de masse a un impact important sur l'efficacité de la chromatographie. En effet, la résistance au transfert de masse est minimisée par la présence d'un corps solide, car le parcours de diffusion des analytes est limité à l'épaisseur de la couche externe poreuse. Le contrôle élevé du diamètre des particules et de leur reproductibilité permet l'obtention de performance équivalente à des colonnes sub 2 μm et cela sans l'inconvénient d'une pression élevée. De plus, l'Accucore aQ contient à la surface de la silice non greffée par des chaînes C₁₈, des groupements fonctionnels (« *end-capping* ») de type diol, permettant une meilleure rétention des analytes polaires.

Ce type de fonctionnalisation, en éliminant les silanols libres, permet aussi une meilleure reproductibilité des résultats lors de l'analyse des composés polaires. [29]

Les deux projets de ce mémoire contiennent un nombre impressionnant d'isomères et d'analogues, donc de composés qui ont des structures similaires. Pour permettre une bonne séparation chromatographique, il est nécessaire d'avoir une phase stationnaire avec une bonne sélectivité. La sélectivité (α) est l'aptitude d'une colonne à distinguer et donc séparer les composés injectés en fonction de la structure de l'analyte. La sélectivité est donc utilisée pour calculer le pouvoir de séparation d'une colonne.

En chromatographie sur phase inverse, la rétention d'un composé sur la phase stationnaire est basée sur un mécanisme de partage entre deux phases non-miscibles : l'une mobile (le solvant) et l'autre stationnaire. [30-32] Ce phénomène est dit dynamique car les analytes sont dans un état d'équilibre entre les deux phases, selon l'équation $K=C_s/C_m$ (où K est le coefficient de partage, C_s est la concentration de l'analyte dans la phase stationnaire et C_m est la concentration de l'analyte dans la phase mobile). [30-32] Plus K est élevé, plus le composé sera retenu fortement par la phase stationnaire et donc la rétention sera plus élevée et inversement si K est petit. K est influencé par la structure d'un analyte qui détermine l'affinité qu'il aura pour la phase stationnaire. Au cours des deux différents projets de cette thèse, une colonne munie d'une phase stationnaire C_{18} dite inverse (apolaire) et d'end-capping polaire a été utilisée. Dans ce type de chromatographie la phase mobile est un solvant organique (MeOH, ACN, THF) souvent mélangé avec de l'eau. Plus le solvant organique est apolaire, plus il possède une force éluante élevée (grand pouvoir d'éluion). Il augmente donc C_m et diminue le temps de rétention des analytes. Les composés analysés au cours des deux projets, comme il peut être perçu aux figures 4.1 et 5.1, contiennent des structures majoritairement apolaires, qui sont fortement retenues sur une phase stationnaire apolaire. Certains analytes contiennent aussi des fonctions polaires et l'utilisation d'un recouvrement des silanols libres « end-capping » de nature polaire aide à retenir suffisamment ces composés.

Une éluion isocratique consiste en l'utilisation des mêmes proportions de phase mobile du début jusqu'à la fin de l'injection. Ceci est souvent utilisée lorsqu'un faible nombre de composés est à analyser et que des proportions d'organique élevées sont déjà de mise, ou dans l'éventualité où la sélectivité des composés pour la phase mobile est similaire et que la résolution chromatographique entre les pics est équivalente ou légèrement supérieure à 2,00.

[30-32] Par contre, dans plusieurs cas, dont ceux des deux projets de ce mémoire, l'utilisation d'un gradient est nécessaire pour diminuer le temps d'analyse total et par le fait même, permettre l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons par jour. Un gradient consiste à varier les proportions de solvant aqueux et organique lors d'une séparation. Donc, en augmentant linéairement la proportion de solvant organique sur une certaine période de temps, un meilleur contrôle sur le temps d'élution des différents composés est possible. Par contre, dans ce cas-ci, en considérant qu'on augmente la proportion de solvant organique dans la colonne, il est nécessaire, après la sortie du dernier pic, de conditionner la colonne en passant environ six à dix volumes de colonne avec la composition du départ de la phase mobile afin de retrouver les conditions initiales de séparation et permettre une reproductibilité entre les injections. [30-32]

Le système HPLC utilisé dans ce travail contient un compartiment pour contrôler la température de la colonne (TCC), car les changements de température peuvent avoir une influence sur les résultats, comme la reproductibilité. En effet, comme il peut être perçu dans l'équation (1) de Hagen-Poiseuille, la pression (p) du système est affectée par différents paramètres soit le débit (F), la longueur de la colonne (l), la viscosité de la phase mobile (η) et le rayon interne de la colonne (r). [30-32] Donc, la diminution de la viscosité de la phase mobile est directement proportionnelle à l'augmentation de la température du système, ce qui par le fait même, diminuerait la pression du système. Le rayon interne de la colonne est le paramètre ayant le plus d'effet sur la pression du système. En effet, comme il peut être perçu dans l'équation de Hagen-Poiseuille, le rayon interne de la colonne contient un exposant quatre ce qui peut modifier drastiquement la pression lorsqu'une colonne avec un diamètre interne de 2.1 mm est utilisée comparativement à une colonne de 4.6 mm de diamètre.

$$p = \frac{8Fl\eta}{\pi r^4} \quad (1)$$

Le nombre de plateaux théoriques (N), aussi connu sous le nom d'efficacité, détermine la largeur que les pics auront sur le chromatogramme. [30-32] Le diamètre des particules de la colonne a un impact direct sur l'efficacité et le débit qui peut être utilisé, comme il peut être perçu à la figure 2.1. En effet, plus les particules ont un faible diamètre, plus la hauteur

équivalente à un plateau théorique (*HETP*), sera faible et par le fait même N élevé ($N=l/HETP$). De plus, comme il peut être perçu à la figure 2.1, avec un diamètre de particules plus faible, il est possible d'utiliser des débits plus élevés et cela sans perdre l'efficacité de la colonne et donc d'augmenter la vitesse d'élution des composés et diminuer le temps total d'analyse. [30-32] Donc, si l'Accucore aQ qui contient des particules avec un diamètre de 2.6 μm , est comparée avec une colonne qui contient des particules de 3 μm , il est possible d'avoir un N plus élevé et cela même avec un débit plus élevé. De plus, si l'Accucore aQ est comparée à une colonne qui contient des particules avec un diamètre de 1.7 μm , une gamme de débit similaire est possible, sans avoir un impact significatif sur le nombre de plateaux théorique et cela grâce à les particules qui sont des particules à noyau solide. Donc, la colonne utilisée au cours des deux projets, possède une efficacité similaire à une colonne avec un diamètre de particules plus bas, mais cela sans l'inconvénient de la pression plus élevée associée à des plus petites particules et/ou des plus longues colonnes.

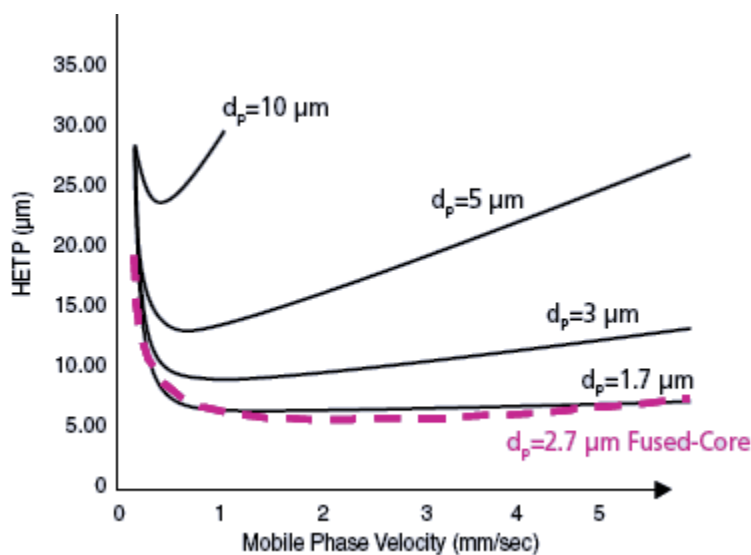


Figure 2.1. Variation de l'efficacité de la séparation en fonction du débit (relation de Van Deemter) selon les différentes dimensions de particules. [30]

La température a aussi un impact sur le nombre de plateaux théoriques, le facteur de capacité et la sélectivité. Comme il peut être perçu dans la figure 2.2, en modifiant la température de la colonne de 25°C à 50°C, la gamme de débit pouvant être utilisée est augmentée et cela en

minimisant l'impact du choix du débit sur le nombre de plateaux théoriques. En effet, la droite linéaire de la hauteur du plateau en fonction du débit est plus constante lors de l'utilisation d'une plus haute température et une légère modification du débit aura un moins grand impact sur le nombre de plateaux théoriques.

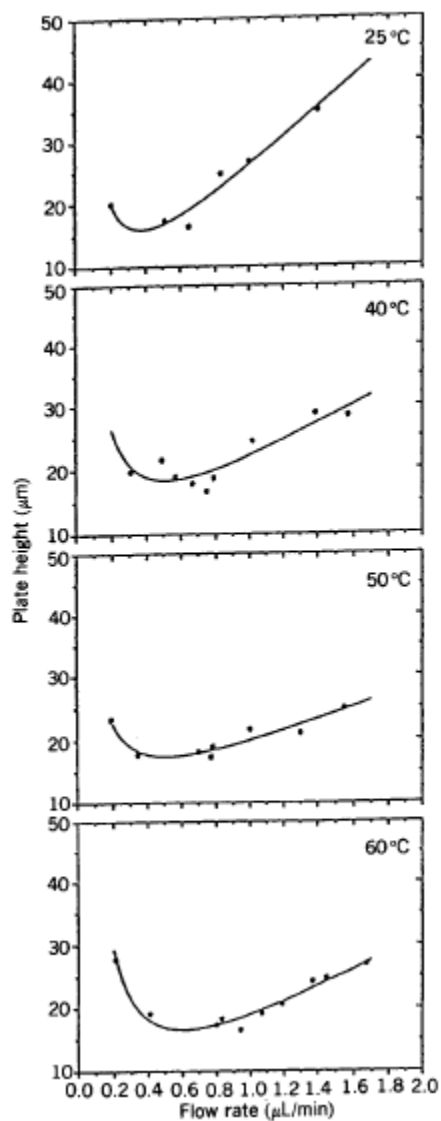


Figure 2.2. Impact de la température de la colonne sur l'efficacité d'un system en fonction du débit. [30]

Comme perçu à l'équation (2), α , k et N ont tous un impact sur la résolution (R). En chromatographie liquide, la résolution est l'efficacité de la séparation entre deux composés. Il

est recommandé d'avoir une résolution supérieure ou égale à deux entre deux composés qui ne sont pas distinguables autre que par le temps de rétention, voir figure 2.3. [30]

$$R = \frac{1}{4}(\alpha - 1) \left(\frac{k}{k + 1} \right) \sqrt{N} \quad (2)$$

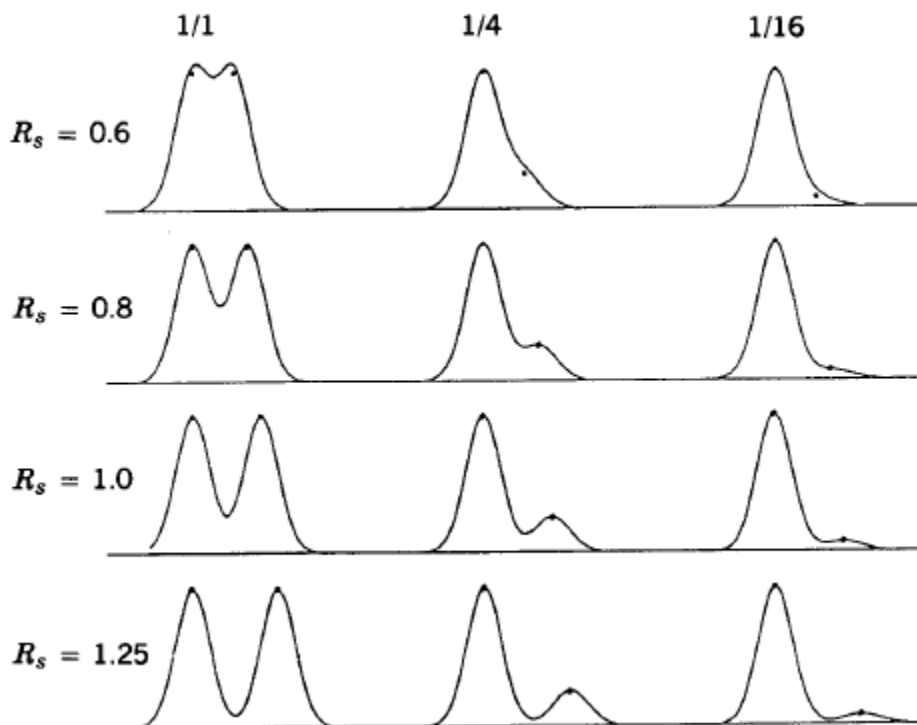


Figure 2.3. Impact de la résolution sur la séparation chromatographique entre deux composés à différentes concentrations relatives.

Un volume compris entre 3 et 5 μL a été injecté pour les deux projets. Lorsqu'une colonne contient un faible diamètre interne et des particules avec une capacité de chargement limitée, il est nécessaire d'employer un faible volume d'injection. En effet, plus le volume d'injection augmente, plus une grande quantité d'analyte tentera de se lier à la phase stationnaire de la colonne et cela sans succès. Cela aura donc comme impact la présence d'élargissement frontal «*fronting*» ou la sortie d'une partie du composé dans le volume mort de la colonne et une diminution significative du recouvrement.

2.2 Spectrométrie de masse

Un schéma du LTQ Orbitrap XL, le spectromètre de masse utilisé dans ce travail, est présenté à la figure 2.4. Chaque section de l'instrument sera couverte dans cette section, soit la source d'ions, la trappe ionique linéaire (LTQ), la C-trappe et la trappe ionique orbitale.

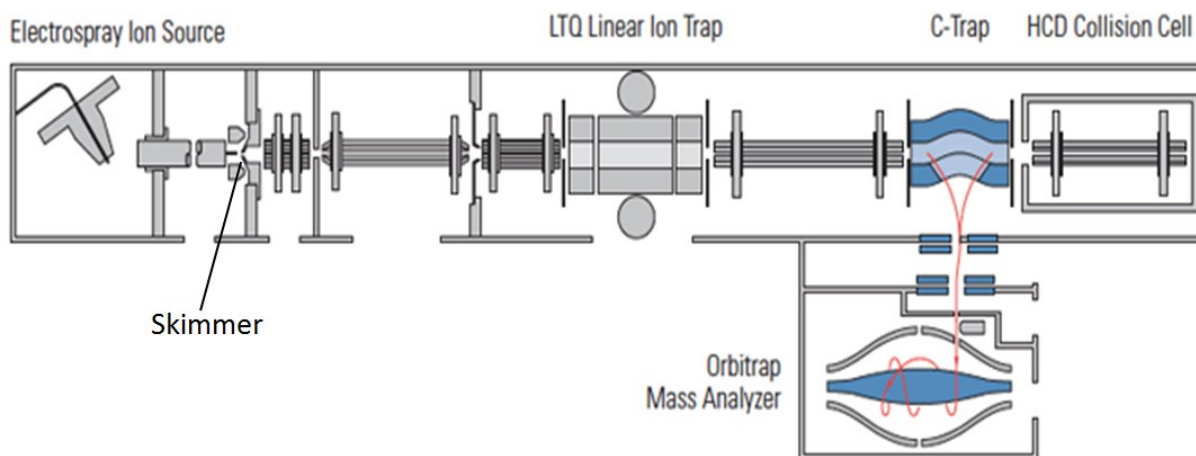


Figure 2.4. Schéma interne de LTQ Orbitrap XL. [33]

Le couplage de la spectrométrie de masse à la chromatographie liquide est une technique sensible et robuste qui est couramment utilisée dans plusieurs domaines. Dans le cadre de cette recherche, l'électronébulisation (ESI) sera la seule méthode d'ionisation utilisée. Cette méthode d'ionisation s'applique bien aux cannabinoïdes et aux ED. Il est difficile de prédire quelle source utiliser lors de l'analyse de médicaments contrefaits, car ils peuvent contenir des composés polaires ou apolaires, de structures inconnues. Comme il peut être perçu dans la figure 2.5, l'ESI est la source qui permet l'ionisation et l'analyse du plus grand nombre de composés. [34]. Il est donc pertinent de l'utiliser pour le monitoring des composés inconnus.

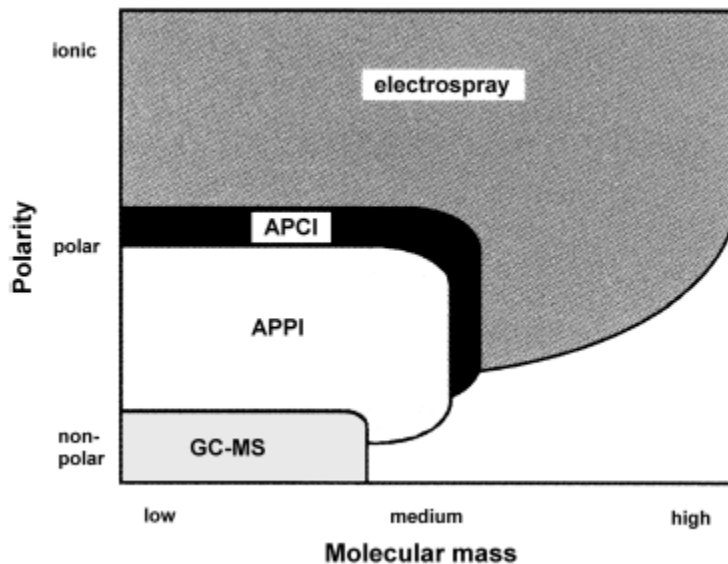


Figure 2.5. Application des différentes sources à pression atmosphérique (API). [34]

L'ionisation par électronébulisation s'effectue à pression atmosphérique. Une solution contenant un échantillon à mesurer est vaporisée d'une aiguille chargée de quelques kV. (33-34) L'effluent chargé s'accumule à la surface de l'aiguille et est dirigé vers le cône de balayage (« *sweep cone* ») pour former un cône de Taylor, (figure 2.6). À des débits supérieurs à 1 $\mu\text{L}/\text{min}$, l'évaporation des ions contenus dans les gouttelettes peut être facilitée grâce au gaz auxiliaire et au gaz d'appoint (« *sheath gas* »). Le gaz auxiliaire n'est pas nécessaire à des débits inférieurs à 500 $\mu\text{L}/\text{min}$. Par contre, l'utilisation d'un gaz auxiliaire entre 0 à 20 unités instrumentales, peut réduire la présence de bruit causé par des ions présent dans le solvant. [35]

Une fine brume contenant des gouttelettes électriquement chargées à la surface sont libérées du cône de Taylor. Au fur et à mesure que le solvant s'évapore des gouttelettes, la densité de la charge électrique augmente à leur surface. Ce processus s'effectue jusqu'à un certain niveau critique, nommé la limite de stabilité Rayleigh où une explosion coulombienne survient. À ce point, en raison de la répulsion électrostatique présente à l'intérieur des gouttelettes qui est supérieure à la tension de surface, les gouttelettes se divisent en de plus petites gouttelettes. Ce processus est effectué plusieurs fois ce qui permet l'obtention de très petites gouttelettes, contenant l'échantillon, hautement chargées. Ensuite, en raison d'une répulsion

électrostatique, les ions contenus dans les gouttelettes sont expulsés de celles-ci, pour finalement se diriger vers l'analyseur du spectromètre de masse. [33-36] Pour qu'une molécule soit analysée par ESI, les molécules analysées doivent contenir des fonctions facilement ionisables. Dans le cas des drogues contre la dysfonction érectile et des cannabinoïdes, la présence d'atomes d'azote rend l'ionisation par électronébulisation possible.

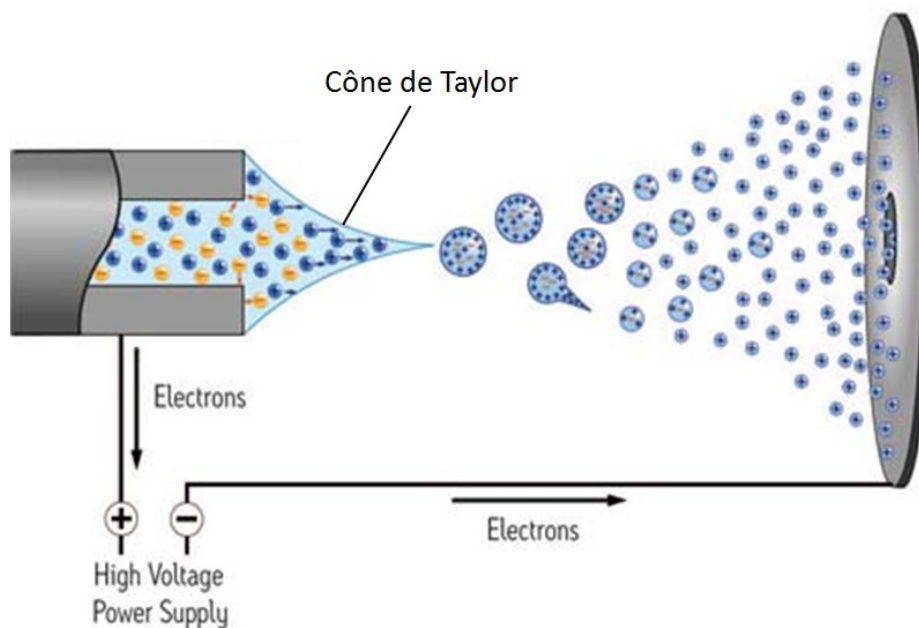


Figure 2.6. Schéma du processus d'ionisation par nébulisation électrostatique. [35]

Il est nécessaire de positionner la source pour être en mesure d'obtenir la meilleure sensibilité pour les mesures. Pour ce faire, la source est ajustée sur l'axe x, y et z pour obtenir un angle où l'intensité du signal est maximal. Le positionnement de la source à la verticale est dépendant du débit de la phase mobile appliqué. En effet, lorsqu'un débit élevé est utilisé, la source peut être positionnée à différente profondeur pour obtenir une intensité de transmission des ions optimale. La profondeur de la source peut avoir un impact sur le rapport signal sur bruit. Le positionnement de la source sur l'horizontale et l'angle ont aussi un impact sur le signal.

L'interface de la source après le cône de balayage «*sweep cone*» est maintenue sous vide à l'aide de deux pompes mécaniques. Lorsque les ions traversent le tube de transfert d'ion, ils entrent dans l'optique ionique à l'aide d'un gradient de pression négative, ce qui permet de focaliser les ions qui ont été produits dans la source. Un voltage entre 0 et $\pm 10V$ (positif pour des ions positif et négatif pour des ions négatif) permet le transfert d'ions du capillaire vers le «*skimmer*».

Lorsque les ions entrent dans la trappe ionique (voir figure 2.4), pour permettre une fragmentation, ils sont maintenus dans cette trappe à l'aide d'un potentiel DC appliqué au centre et au bout des quatre tiges hyperbolique et d'un RF avec une fréquence et une amplitude constante pour piéger les ions. Comme il peut être vu à la figure 2.7, le LTQ utilise trois DC axiaux qui créent un puit de potentiel d'énergie qui confine les ions vers le milieu de la trappe. Plus les ions sont confinés longtemps dans la trappe, plus ils entreront en collision avec des molécules d'hélium ce qui permettra de stabiliser les ions à l'intérieur de la trappe en diminuant leur énergie cinétique, mais aussi en diminuant l'amplitude de l'oscillation pour permettre au champ RF de piéger les ions. [33]

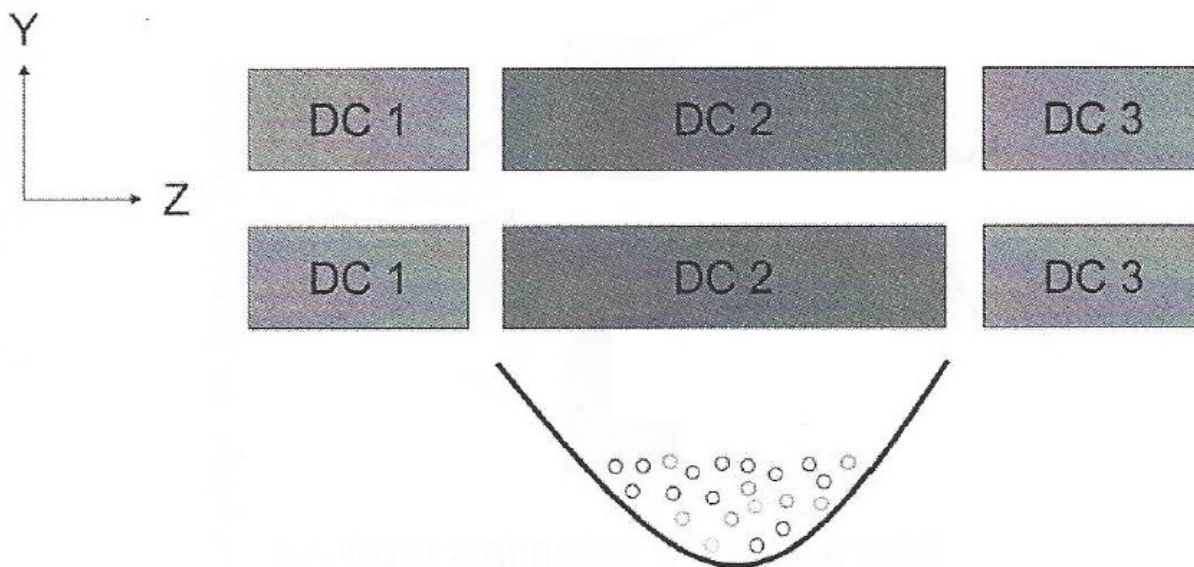


Figure 2.7. Principe du piégeage des ions à l'intérieur de la trappe ionique. [33]

Plus les ions auront une vitesse élevée, plus ils entreront rapidement dans la trappe ionique et par le fait même, entreront en collision avec les molécules d'hélium. L'activation collisionnelle dans une trappe ionique est obtenue par excitation dipolaire avec un voltage AC auxiliaire. Ceci est dû au mouvement de vibration de la molécule engendré par de multiples collisions. À un certain moment, la molécule deviendra instable et les liens les moins forts seront rompus. En présence d'une trappe, il est possible d'effectuer des fragmentations à répétition (MS^n) et par le fait même d'obtenir plus d'information sur la structure de la molécule. [33,34] Ce principe est ce qui constitue l'avantage principal de la trappe ionique face à la cellule de collision (hexapole) d'un triple quadripôle ou d'un QTOF. En présence d'un triple quadripôle, les ions sont toujours en mouvement vers le détecteur, même au moment où ils entrent en collision avec le gaz de collision; les ions produits seront par la suite éjectés de l'hexapole pour se diriger vers le détecteur ce qui permet seulement l'obtention de MS^2 .

Le LTQ est équipé d'un système de détection à haute sensibilité, soit un multiplicateur d'électron et d'une dynode. Le multiplicateur d'électron est constitué d'une anode et d'une cathode (constitué d'oxyde de plomb) où l'anode recueille les électrons produits par la cathode. Les particules secondaires créées dans la dynode de conversion, qui est une surface de métal concave qui utilise un potentiel de +15 kV pour la détection des ions négatifs et -15 kV pour les ions positifs, entrent en contact avec le mur de la cathode avec suffisamment d'énergie pour éjecter des électrons. Un gradient positif de potentiel est utilisé dans la cathode pour diriger les électrons vers l'anode; ces électrons entreront eux aussi en contact avec le mur pour expulser d'autres électrons et ainsi de suite. Des millions d'électrons recueillis par l'anode créeront une charge sur l'anode ce qui pourra représenter le signal de cet ion. [33,34]

Lorsque les ions sont dirigés vers la trappe ionique orbitale, ils seront accumulés dans une trappe nommée C-trap. Après l'accumulation des ions dans la C-trap, le RF est diminué et un voltage DC est appliqué aux tiges. Les ions sont par la suite éjectés de la C-trap vers la trappe ionique orbitale. Lorsque les ions entrent dans la trappe ionique orbitale, les ions sont piégés à l'aide d'attraction électrostatique. Cette attraction est compensée par une force centrifuge causée par la vitesse que les ions avaient initialement. À l'aide d'un transformé de Fourier de l'image du courant, il est possible d'obtenir la fréquence des oscillations axiales et par le fait

même, la masse sur la charge des ions avec une haute résolution. Suite à l'entrée des ions dans la trappe ionique orbitale, ils seront par la suite comprimés vers le milieu de cette trappe en augmentant le voltage au milieu. Dans la direction axiale, les ions sont forcés de s'éloigner des espaces étroits (côtés de la trappe ionique orbitale) et se diriger vers un espace plus grand (centre de la trappe ionique orbitale). Lorsque le voltage est éteint, la trajectoire des ions deviennent une spirale stable à l'entour de l'électrode de la trappe ionique orbitale. La fréquence de ces oscillations harmoniques dépend seulement de la masse sur la charge de l'ion et de la courbure du champ appliqué (figure 2.4). [33]

La pression interne du système est importante pour permettre un mouvement continu des ions à travers le spectromètre de masse sans collision (en excluant le principe de la cellule de collision) jusqu'au détecteur. Il est donc important d'avoir un vide adéquat dans le système (entre $2-2.5 \times 10^{-5}$ Torr dans la région de la trappe ionique en raison de la présence du HCD, entre 0.9-1.5 Torr pour la source et inférieur à 6×10^{-10} Torr pour la cellule de la trappe ionique orbitale), tant de la pompe mécanique que de la pompe turbomoléculaire. Si ces valeurs ne sont pas optimales, l'hélium de la cellule de collision pourrait être présent ailleurs dans le système ce qui pourrait déstabiliser la trajectoire des ions.

3. Partie expérimentale

3.1 Préparation des échantillons

Les méthodes d'extraction pour les médicaments traitant la dysfonction érectile sont présentes dans la section 4.3.2 et celles pour les cannabinoïdes dans la section 5.3.2. La majorité des composés analysés au cours du premier projet ont été des tablettes et pour les cannabinoïdes, des composés herbacés. Par contre, il demeure que différentes matrices, telles des gélules et des liquides oraux ont aussi été analysées. Pour être en mesure de développer une méthode reproductible et robuste, il est nécessaire de contrôler certains paramètres qui peuvent avoir un impact sur la sélectivité et la rétention des composés dans la colonne, mais surtout sur la durée de vie de la colonne. Malgré l'utilisation d'une centrifugeuse et d'un filtre 0,45µm de PVDF lors de l'extraction, il y a des chances que certaines particules puissent boucher le fritte de la colonne ou s'adsorbent de façon irréversible sur les particules, ce qui par le fait même, diminuerait l'efficacité de la colonne. Pour régler ce problème, une colonne de garde et un filtre en ligne tous deux de chez Phenomenex ont été utilisés. Par contre, il est important de préciser que la colonne de garde demande un entretien régulier et que plus les échantillons analysés contiennent une matrice complexe ou chargée, plus il sera nécessaire de changer la cartouche de cette colonne de garde à une fréquence élevée.

Lorsqu'un spectromètre de masse est utilisé en aval, certaines limitations s'imposent au niveau des solvants et additifs pouvant être employés lors de la préparation des échantillons. La trappe ionique orbitale, comme mentionné dans la section 2.2, permet une analyse à haute résolution, R , en masse, m , des composés d'intérêts ($R=m/\Delta m \approx 100\ 000$). Par contre, cette efficacité a un prix à payer dans le grade des solvants à utiliser. En effet, il est recommandé par le détaillant d'utiliser seulement des solvants de grade LC-MS en raison de leur haute pureté. Pour les différentes méthodes développées au cours de ce projet, les solvants de chez J.T. Baker, de grade LC-MS, ont été utilisés. En effet, plus de prétraitements et de précautions sont effectués pour garantir une pureté de 99.9% avec les solvants de type LC-MS, mais aussi moins de résidus sont présents après l'évaporation du solvant. Le méthanol et l'acétonitrile de deux différentes compagnies, soit J.T. Baker et Thermo Fisher et l'eau d'un système Milli-Q et de chez J.T. Baker ont été injectés par infusion directe en mode balayage (« *Full scan* »). L'intensité du signal due à la présence de contaminants était similaire entre chaque solvant analysé. Dans les deux projets, le mode d'ionisation ESI positif a été utilisé et des additifs

volatils qui sont de bons donneurs de protons tels que l'acide formique ou l'acide acétique ont été ajoutés dans les phases mobiles. Ces additifs permettent un contrôle du pH de la phase mobile, mais aussi d'aider à l'ionisation des analytes d'intérêts.

Les contenants utilisés pour les phases mobiles doivent être rincés avec des solvants de type LC-MS et aucun détergent ne doit être utilisé, comme mentionné dans cette section. Plusieurs manufacturiers recommandent fortement de dégazer et de filtrer les phases mobiles avant leur utilisation pour éviter d'endommager le système. Pour dégazer les phases mobiles il est recommandé de les passer au bain ultrasons avant l'utilisation. De nos jours, la grande majorité des systèmes HPLC-MS ont des dégazeurs intégrés, comme c'est le cas de l'appareil employé dans ce travail. Cette configuration diminue les chances de contamination des phases mobiles. Il est aussi nécessaire de limiter l'utilisation de seringues, de parafilm ou d'équipement en plastique, car un transfert d'additifs du plastique vers la solution est possible. L'utilisation de contenants, seringues et autre équipement en verre est accepté à condition qu'ils aient été rincés avec des solvants appropriés et entreposés dans des conditions acceptables. Pour éviter la contamination de la phase mobile et éviter l'élévation du bruit de fond, il est recommandé de changer fréquemment la phase mobile aqueuse. Effectivement, après une période de stockage de la phase aqueuse et en présence de lumière, il y a de fortes chances qu'une activité microbienne soit présente ce qui pourrait contaminer le système et donc qui pourrait augmenter le bruit de fond et même boucher les filtres et/ou la colonne.

3.2 Détermination des paramètres expérimentaux du spectromètre de masse

Le LTQ Orbitrap XL est un instrument à haute résolution (jusqu'à 100 k) qui nécessite un étalonnage hebdomadaire, soit avec la caféine, le MRFA et l'Ultramark® 1621 pour permettre la couverture des masses petites, moyennes et élevées.

Le positionnement du capillaire en silice fondu à l'intérieur de la source ESI, soit de 1 mm, est important, car un contact de l'éluant avec le nébuliseur chargé est nécessaire pour ioniser des composés d'intérêts (figure 3.1). Par contre, dans le cas d'un capillaire en acier inoxydable,

étant un bon conducteur, le courant est appliqué sur le solvant même si le capillaire sort de 0,5 mm, voir figure 3.1. De plus lorsqu'un capillaire en acier inoxydable est utilisé, il n'est pas nécessaire d'utiliser un «*spray voltage*» aussi élevé (3.5-4 kV) que celui appliqué pour le capillaire en silice (4.5-5 kV). [33] Il est important de vérifier l'intégrité et le positionnement de l'aiguille, car cela peut avoir un impact sur l'intégrité du spray et sur le résultat obtenu.

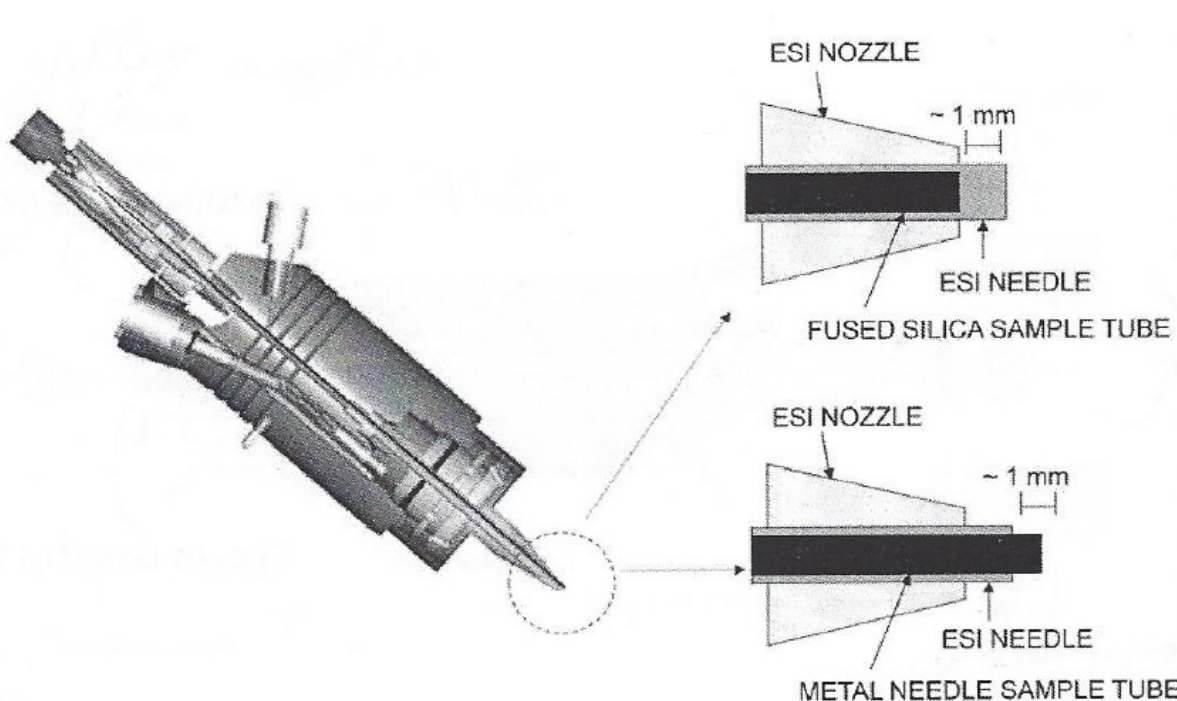


Figure 3.1. Schéma de l'interface ESI (vue rapprochée de la pointe de l'aiguille) où dans l'image du haut un capillaire en silice fondu est utilisé et dans celle du bas, un capillaire en acier inoxydable. [33]

Il est nécessaire d'optimiser les paramètres instrumentaux du spectromètre de masse pour chaque famille de composés pour obtenir un signal stable et intense. Les paramètres suivants ont été optimisés : le positionnement de l'électronébuliseur dans la source, le flux du gaz auxiliaire, du gaz de gainage, le voltage appliqué au capillaire, l'énergie de collision, le voltage des lentilles («*tube lens*»), la température du cône, etc. Chacun de ces paramètres a été déterminé à l'aide du logiciel *Tune Plus* (Thermo Scientific) utilisé en mode manuel ou semi-automatique par infusion directe ou par injection à travers la colonne chromatographique. Chaque paramètre a été ajusté individuellement à travers une plage déterminée par l'utilisateur

et la masse (m/z) du composé. Comme il peut être perçu à la figure 3.2 sur l'axe horizontale, le paramètre à être optimisé est l'énergie de collision dans ce cas-ci et sur l'axe vertical on voit l'abondance relative de l'ion analyte en unités d'intensité. L'abondance relative la plus élevée est sélectionnée et donc l'apex de la courbe tracée par le logiciel, pour permettre la meilleure détection de cet ion. Tous les paramètres instrumentaux mentionnés dans ce paragraphe auront un impact direct sur la stabilité du signal. Pour être en mesure de déterminer la stabilité du signal, il est nécessaire d'obtenir une transmission d'ion $\pm 10\%$ au maximum. Si cela n'est pas obtenu, le signal sera instable et il est nécessaire d'ajuster le positionnement de la source ou les paramètres des gaz de la source. Les paramètres expérimentaux du spectromètre de masse pour les médicaments traitant la dysfonction érectiles peuvent être retrouvés dans la section 4.3.3 et ceux pour les cannabinoïdes dans la section 5.3.3.

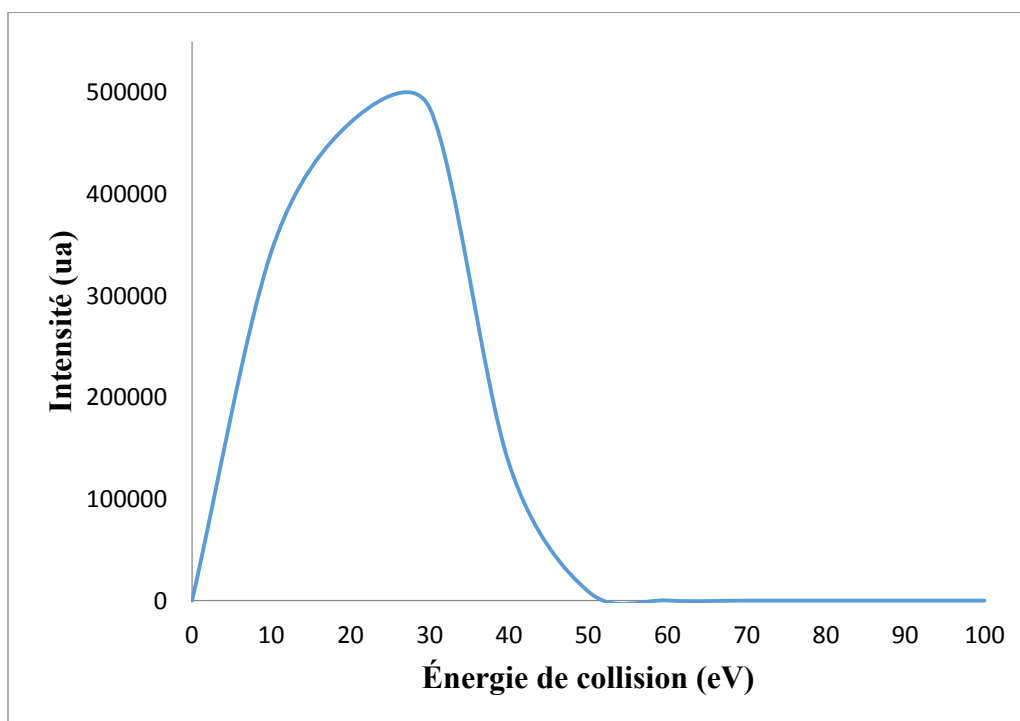


Figure 3.2. Schéma de l'optimisation de l'énergie de collision de 0-100 eV du Tadalafil.

Dans les deux projets, un débit de 350 $\mu\text{L}/\text{min}$ est utilisé, il est donc nécessaire de positionner la source à la verticale en position D. Le signal optimal a été obtenu avec un positionnement horizontal de 0 et un positionnement en Y de 0,5. Pour permettre l'optimisation optimale des

différents composés, une concentration élevée, soit 1 µg/ml, a été infusée directement dans le spectromètre de masse pour faciliter la détermination de l'apex de ce composé.

L'énergie de collision est optimisée en débutant avec une valeur initiale de 25 % et par la suite modifiée de ± 5 %. Comme il peut être perçu à la figure 3.3, en modifiant l'énergie de collision appliqué, l'abondance relative des ions fragment change. Habituellement, plus on augmente en énergie de collision, plus les fragments seront abondants (voir figure 3.3 du milieu et du bas) jusqu'à un certain point où les fragments sont trop instables. L'énergie de collision optimale pour MS² et MS³ a été déterminée pour chaque composé en utilisant l'énergie de collision où l'apex d'intensité des ions est présent (à la figure 3.2, l'apex est obtenu à 30 eV). Deux types de bibliothèques ont été créées pour les projets, soit dans un premier temps, la fragmentation optimale pour obtenir l'abondance des ions produits la plus élevée. L'énergie optimale sera légèrement différente pour chaque composé, mais il est possible d'utiliser une énergie de collision par étapes aussi connue sous le nom de «*step collision energy*» pour obtenir un patron de fragmentation moyen. Au cours des différents projets, une énergie de collision normalisée de 30 % est appliquée à chaque composé avec trois étapes et ± 5 % d'écart. Donc, lorsqu'un ion est fragmenté, le système va appliquer trois énergies de collision, soit 25%, 30% et 35% et par la suite donner un patron de fragmentation moyen. Cette application permet l'obtention de patrons de fragmentation plus reproductibles pour créer une bibliothèque.

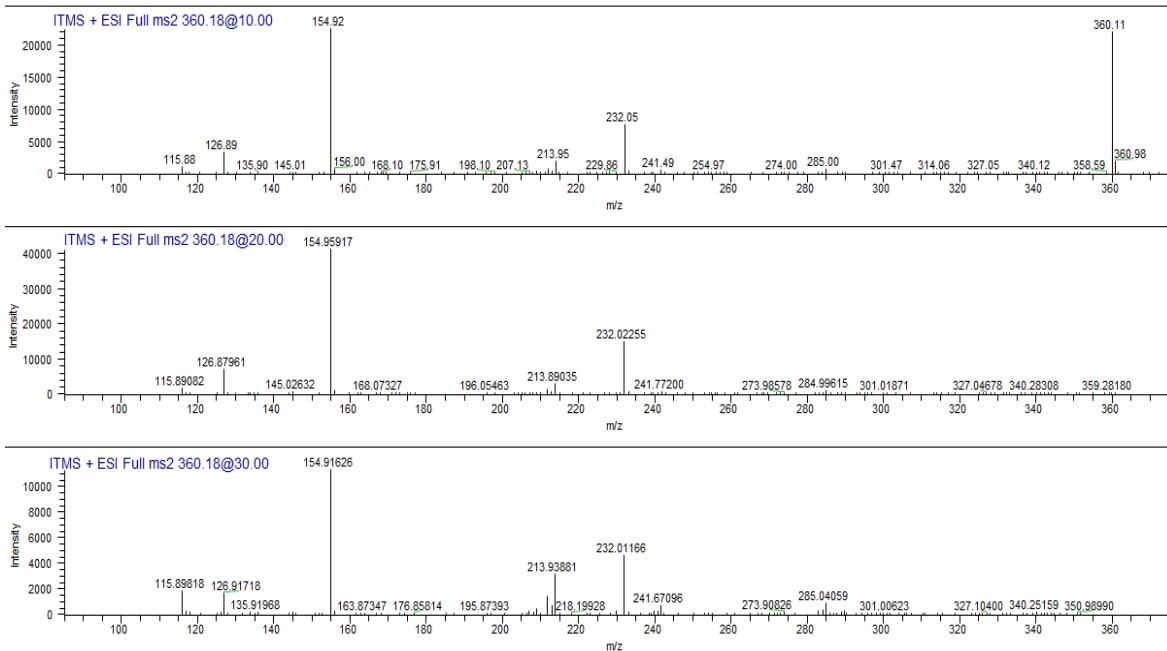


Figure 3.3. Impact de l'énergie de collision sur l'abondance relative des ions produits. Une énergie de collision de 10% a été appliquée dans l'image du haut, 20% dans celle du milieu et 30% dans l'image du bas.

Dans les deux projets, deux types de spectres de masse ont été enregistrés, soit un spectre de balayage complet à haute résolution (FTMS) et un spectre MS/MS de basse résolution sur la masse en mode acquisition dirigée. Pour le spectre de balayage, la résolution (7500, 15000, 30000, 60000, 100000), la polarité (positive ou négative), le type de données (centroid ou profil), l'analyseur (FTMS ou ITMS) et le spectre de masse (bas, moyen ou élevé) sont sélectionnés par l'utilisateur. Nos spectres de balayage ont été enregistrés à une résolution de 30000, en mode profile dans la trappe ionique orbitale (FTMS) en ESI positif. Des résolutions plus élevées ont été employées de façon ponctuelle afin d'élucider la composition de certains analytes inconnus. Plus la résolution sélectionnée est élevée, plus le temps d'acquisition par point sera long, ce qui par le fait même diminue le nombre de points par composé. De ce fait, dans nos méthodes courantes, une résolution de 30000 a été choisie. L'erreur sur la masse (Δm) est inversement proportionnelle à la résolution (R) et directement proportionnelle à la masse (m) de cet ion ($\Delta m = m/R$).

Le deuxième type de spectre, le MS/MS en acquisition dirigée, prend en compte le spectre de balayage et aussi une liste d'ion parents définie par l'utilisateur. Cette liste contient une tolérance sur la variation de masse de l'ion parent et une abondance minimale nécessaire pour déclencher l'acquisitions du spectre MS/MS de l'ion respectif. Il est nécessaire d'utiliser une fonction d'exclusion dynamique pour les deux méthodes, car plusieurs composés avec des masses moléculaires différentes se superposent sur le chromatogramme. L'exclusion dynamique permet une analyse contrôlée du nombre de fois que l'ion parent sera sélectionné pour fragmentation. Par exemple, dans le premier projet, le chlorodenafil (m/z 389.1375 à 5.11 min) et le chloropretadalafil (m/z 427.1055 à 5.18 min) coéluent, comme il peut être perçu au tableau S4.1 de la première publication. Dans l'éventualité où une grande quantité de chlorodenafil est présente dans l'échantillon, mais que le chloropretadalafil n'est présent qu'à l'état de trace, sans l'exclusion dynamique, le système fragmenterait constamment la masse la plus abondante, soit le chlorodenafil dans ce cas-ci. Dans les deux projets une exclusion dynamique de 15 s est employée afin de permettre la fragmentation des ions moins abondants.

Initialement, une méthode contenant quatre segments, contenant chacun sa liste d'ions parents a été développée. En utilisant différents segments, il est possible d'augmenter le nombre de points par pic chromatographique pour chaque analyte. Par contre, lors d'une collaboration avec Thermo Scientifique, où la méthode a été transférée sur un système différent, on s'est rendu compte que l'utilisation de différents segments posait des problèmes. En injectant des standards sur le système de Thermo Scientifique, on a confirmé que les temps de rétention des composés avaient changé et que les listes d'inclusion n'étaient plus adéquates. L'efficacité de la pompe est un facteur important à considérer lors de l'utilisation d'un gradient, car l'augmentation progressive du pourcentage de solvant organique va varier légèrement d'une pompe à l'autre comme il peut être vu dans la figure 3.4. [37] Cela peut expliquer la difficulté à reproduire les mêmes résultats d'un laboratoire à l'autre. À la figure 3.4, le système A fournit constamment plus de solvant organique comparativement au système B, lors de l'élution du gradient. Différents facteurs peuvent aussi influencer la rétention des composés d'un système à l'autre, par exemple : la dimension interne et la longueur des tubes de transfert avant et après la colonne (« *tubing* »), le volume de la chambre de mélange (« *mixing chamber* ») dans sa capacité de faire les éluants homogènes, l'efficacité de la pompe, le type de système utilisé

(Acella versus un Ultimate 3000, les deux de Thermo Scientific dans notre cas). Il fallait donc soit réajuster les temps de rétention, soit utiliser une liste d'ions parents unique, dans un seul segment. Le dernier scénario a été choisi, car il facilite le potentiel transfert de la méthode à d'autres systèmes LC-MS.

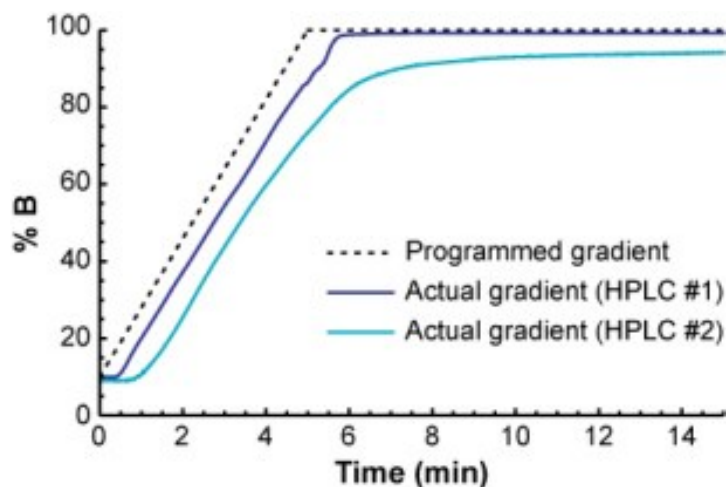


Figure 3.4. Comparaison du pourcentage d'éluant B, typiquement fait du solvant organique, fourni entre deux systèmes HPLC. [37]

En utilisant un LC-MS/MS avec la trappe ionique orbitale XL, il est possible de mesurer en 1,5 s une masse de m/z 400 avec une résolution de 100000 et en 0.5 s avec une résolution de 30000. Ces options sont largement suffisantes pour analyser les différents médicaments traitant la dysfonction érectile et les cannabinoïdes lorsque la séparation chromatographique n'est pas en mesure de les distinguer à cause d'une coélution. En effet, au cours des deux projets, les méthodes développées possèdent une vitesse d'éluion des analytes rapide et donc des pics très étroits. L'utilisation d'un instrument avec une vitesse d'acquisition rapide est donc impérative. En effet, la forme des pics doit être gaussienne et contenir entre 10-20 points pour permettre une quantification efficace, voir figure 3.5 a). Autrement, avec un nombre de points inférieur à 10, tel que démontré à la figure 3.5 b), l'aire du pic pourrait varier d'une injection à l'autre, ce qui rendrait la quantification erronée. De plus, la forme du pic est importante, car un pic qui contient un épaulement peut démontrer la présence d'une mauvaise résolution chromatographique (deux composés présents) ou d'un nombre insuffisant de points.

En présence d'un faible nombre de points à l'intérieur du pic, le logiciel effectue des approximations pour connecter les points ce qui peut parfois donner des résultats erronés ou plus difficiles à analyser.

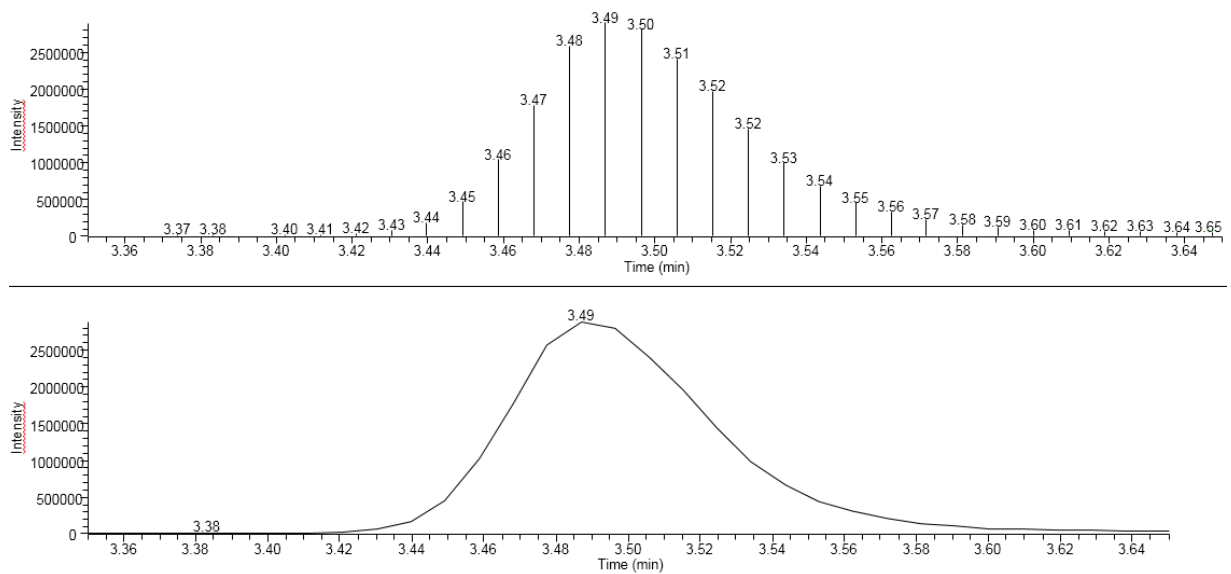


Figure 3.5.a

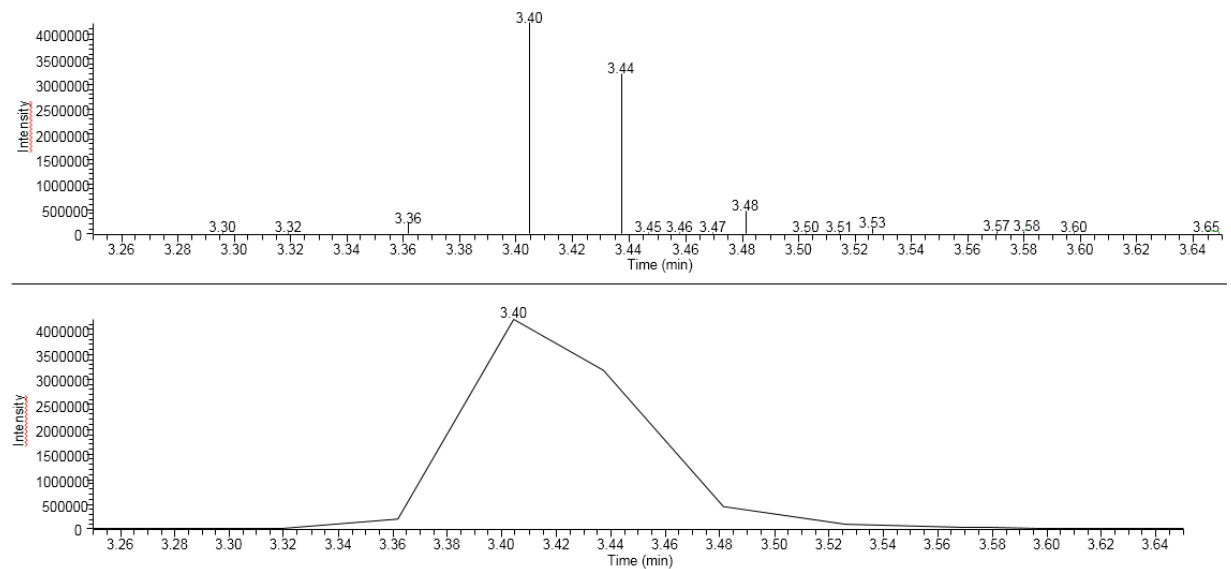


Figure 3.5.b Comparaison de la forme du pic entre deux injections ou en a) l'exemple d'un pic chromatographique avec un nombre suffisant de points et en b) l'exemple d'un pic chromatographique avec un nombre insuffisant de points.

3.3 Optimisation de la méthode LC-MS

3.3.1 Phase stationnaire

Lorsque les paramètres du spectromètre de masse sont déterminés, différentes colonnes sont testées et cela avec différentes phases mobiles, gradients et températures de colonne. Pour chaque colonne, une méthode chromatographique générique de 30 min, allant de 5% à 95% organique a été évaluée. Dans l'éventualité où un ou plusieurs composés ne sortent pas à l'intérieur de cette plage de temps, la phase stationnaire retient trop fortement les composés analysés. Il est nécessaire, si possible, de changer le type de phase mobile et si cela ne fonctionne pas, cette colonne n'est pas retenue pour le reste de l'étude. Différentes colonnes et phases mobiles ont été essayées pour permettre une séparation chromatographique optimale des différents composés.

Certaines colonnes n'ont pas une bonne résolution chromatographique entre certains isomères ou le nombre de plateaux théoriques est faible ce qui donne des pics larges et faibles en intensité. Lorsque possible, les composés sont injectés sur une colonne d'un lot différent pour déterminer la reproductibilité de la méthode développée. Les différentes colonnes utilisées au cours des deux projets peuvent être retrouvées à la section 4.4.1 pour les médicaments traitant la dysfonction érectiles et 5.3.3 pour les cannabinoïdes synthétiques et naturelles.

La colonne utilisée au cours de ces deux projets est l'Accucore aQ C₁₈. Cette colonne permet la rétention de composés hydrophobes, mais aussi des composés légèrement polaires en raison d'une modification des silanols résiduels «*end-capping*» polaire comme mentionné dans la section 2.1. La majorité des composés analysés au cours de ces projets contiennent des groupements fonctionnels apolaires, mais les groupements chimiques nitro (NO₂) ou autre fonctions polaires ne sont pas fortement retenus sur une colonne C₁₈ standard. L'*end-capping* polaire de l'Accucore aQ permet une légère, mais suffisante, rétention de ces composés. [29]. Ce type de colonne utilise une technologie où le cœur des particules de 2,6 µm est solide et la couche externe est poreuse ce qui améliore la séparation chromatographique en diminuant les possibilités d'élargissement des pics. Ces particules de diamètre 2,6 µm sont aussi efficaces

qu'une particule sub-2 μm et ont l'avantage d'opérer à une pression moins élevée ce qui permet d'utiliser un débit plus élevé comme expliqué précédemment à la section 2.1.

3.3.2 Phase mobile

Au cours des deux projets, deux différents types de phase mobile ont été comparés, soit un mélange acétonitrile : eau et méthanol : eau. Pour chaque colonne, une variation du pourcentage de solvant organique de 5% jusqu'à 95%, pour un temps total d'analyse de 30 min, pour les deux choix de phases mobiles a été évaluée. Par contre, comme mentionné dans les deux publications présentées dans les chapitres 4 et 5, le mélange acétonitrile : eau a permis l'obtention de meilleurs résultats en ce qui concerne la vitesse d'élution des différents composés et la séparation chromatographique. Ce choix a permis de répondre aux objectifs quant à la rapidité et l'efficacité des séparations, tels que définis dans la section 1.3. La viscosité de la phase mobile a aussi eu un impact sur les résultats chromatographiques obtenus. En effet, l'acétonitrile a une viscosité plus faible que celle du méthanol et tel que mentionné à la section 2.1, plus la température du système est élevée, plus la viscosité de la phase mobile sera faible. Avec un mélange acétonitrile : eau, il est donc possible d'avoir une élution plus rapide à travers le système.

3.4 Performance de la méthode

3.4.1 Paramètres analytiques

Les résultats obtenus pour les deux projets, soit la précision, l'exactitude, la reproductibilité, la robustesse, le pourcentage de récupération et les limites de détection de ces méthodes (LOD et LOQ) peuvent être retrouvés dans la section 4.3 pour les médicaments traitant la dysfonction érectile et 5.3 pour les cannabinoïdes. Pour ce faire, chaque composé a été injecté de nombreuses fois seul et tous ensembles pour être en mesure de déterminer la présence de variation dans les temps de rétention et les aires sous les pics. Comme il peut être perçu à la figure 3.6, les courbes d'étalonnage des cinq composés sélectionnés sont linéaires et démontrent bien la sensibilité du système.

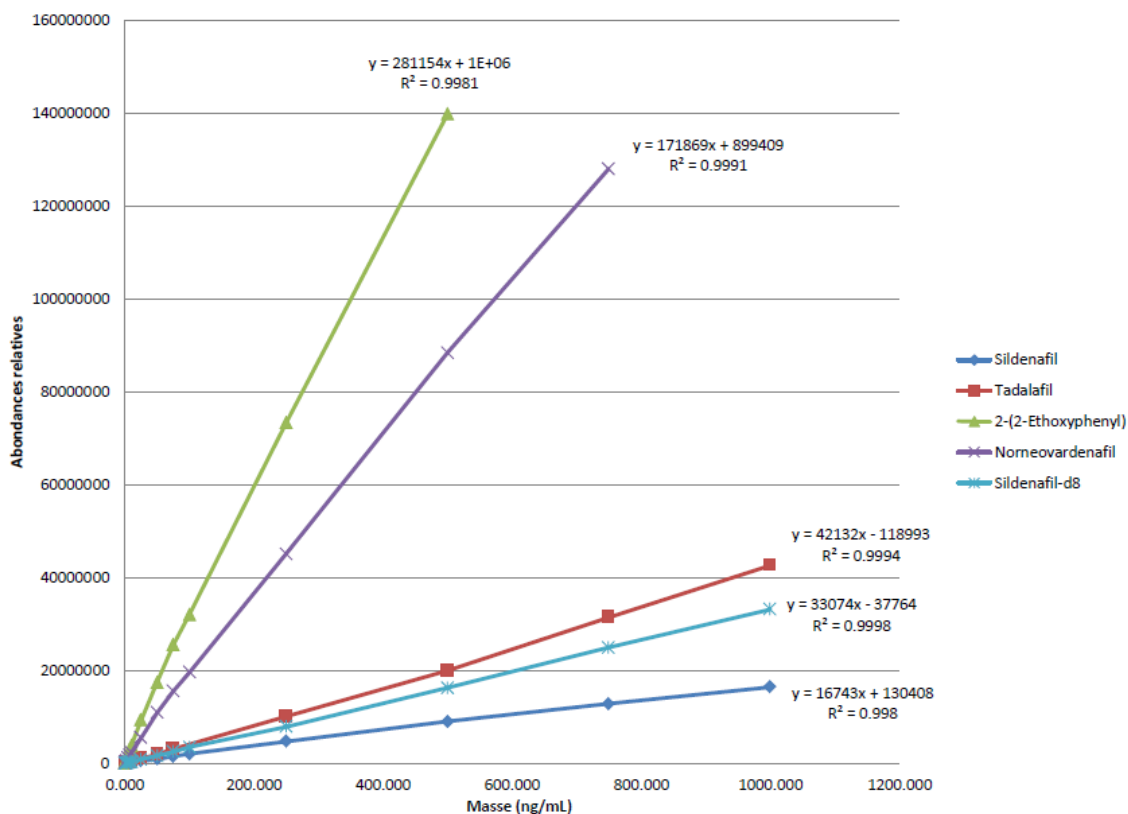


Figure 3.6. Courbes d'étalonnage de cinq drogues contre la dysfonction érectile (sildenafil, tadalafil, 2-(2-Ethoxyphenyl)-5-méthyl-7-propyl-3H-imidazo[5,1-f][1, 2, 4]triazin-4-one, norneovardenafil et sildenafil-8)

Lors du développement d'une méthode, il est intéressant de connaître la plus petite valeur pour laquelle on peut prouver la présence ou l'absence d'un analyte, aussi connue sous le nom de limite de détection (LOD). La limite de détection est définie comme étant trois fois le signal/bruit. La limite quantification (LOQ) est la concentration à partir de laquelle on peut fournir un résultat fiable et quantifiable sur un analyte et elle est calculée comme étant 10 fois le signal/bruit. La méthode utilisée pour déterminer la reproductibilité, l'efficacité, la précision, l'effet de matrice, la contamination croisée (« *carry-over* »), la sensibilité et les résultats sont expliqués plus en détail dans la section résultats et discussion des publications (section 4.3 pour les médicaments traitant la dysfonction érectiles et 5.3 pour les cannabinoïdes).

3.4.2 Étude de stabilité

Selon le guide «*Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*» publié en mai 2001, des tests de stabilité devraient être effectués en respectant certains critères de temps et de température. [38] En effet, des tests de stabilité à température ambiante et au réfrigérateur à court terme (4-24 h), à long terme (du début jusqu'à la fin du développement de la méthode), un gel et dégel (12-24 h) et finalement la stabilité de la solution stock en effectuant aussi un gel et dégel (6 h) seraient nécessaires pour assurer l'exactitude et la reproductibilité des résultats et éviter l'apparition de composés de dégradation dans les chromatogrammes. [38] Il est aussi nécessaire d'effectuer des tests de stabilité pour les composés qui seront placés dans l'échantillonneur pendant une longue période de temps à une température supérieure à celle de conservation. Par contre, dans le cas présent, les composés analysés sont distribués par des compagnies pharmaceutiques qui ont déjà effectuées des contrôles de stabilité sur ceux-ci. En effet, en prenant l'exemple des composés contre la dysfonction érectile, les composés principaux, c'est-à-dire le sildenafil citrate, vardenafil hydrochlorure et le tadalafil, sont stables à température ambiante pendant une longue période de temps, soit jusqu'à la date d'expiration du comprimé et lorsque les échantillons sont placés en solution et analysés, un court laps de temps est demandé entre le temps de dissolution et d'analyse ce qui diminue les chances de dégradation des excipients et réactifs présent dans l'échantillon. En ce qui concerne les solutions mères («stock»), il est possible d'assumer qu'elles n'ont pas subi de dégradation étant conservées dans une solution organique, soit le méthanol dans la majorité des cas, ou l'acétonitrile selon la solubilité des standards, au congélateur.

3.4.3 Validation croisées

Lorsqu'un échantillon est analysé dans les agences gouvernementales, il est nécessaire de valider les résultats obtenus avec une seconde méthode n'utilisant pas le même détecteur ou source d'ionisation selon le SOP 0440 de Santé Canada et le critère 21 CFR 320.29 du FDA «FDA Good Laboratory Practices (GLP)». En effet, lorsque qu'un échantillon inconnu est analysé par LC-MS/MS, comme la trappe ionique orbitale, malgré la certitude du résultat face à la présence ou non d'un réactif, il est nécessaire de l'analyser avec un autre instrument analytique en respectant les critères de validations croisées. Tous les échantillons analysés au

cours des projets de cette thèse ont déjà été analysés dans le passé par d'autres instruments analytiques, soit la chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) ou la chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur UV (HPLC-PDA). Les résultats obtenus avec la trappe ionique orbitale concordaient avec les résultats précédemment obtenus. La validation croisée permet donc de s'assurer que dans l'éventualité où il y a présence de contamination croisée, la deuxième méthode permet de confirmer le résultat ou de le contredire.

Enfin, la méthode a été testée par un analyste de Santé Canada avec différents échantillons nouvellement saisis. L'identification des composés présents dans l'échantillon saisi concordaient lorsque les différents instruments HPLC-PDA et le GC-MS étaient comparés avec les résultats obtenus par le LTQ trappe ionique orbitale XL. Par contre, les résultats obtenus avec la trappe ionique orbitale étaient beaucoup plus rapides (de trois à six fois plus rapide) et plus sensibles (≤ 0.1 ng/ml comparativement aux autres techniques dont les limites de détection se situent dans l'ordre de 0.1-1.0 $\mu\text{g/ml}$). Un autre avantage de la trappe ionique orbitale est la possibilité d'identifier les composés présents dans les échantillons avec une analyse FTMS non ciblée pour la détermination d'espèces inconnues. Ceci implique la possibilité de ré-analyser un spectre de masse enregistré dans le passé et extraire le signal d'une masse que nous ne cherchions pas dans un premier temps, mais qui est devenue importante. Cela n'est pas possible avec des triples quadripôles (QQQ), car avec ces instruments il est nécessaire sélectionner les analytes ciblés par MRM, SIM ou perte de neutre. Donc, plusieurs informations sont perdues, car habituellement, les laboratoires utilisent l'analyse MRM et monitorent seulement les masses qui ont été présélectionnées. Dans l'éventualité où un nouvel analogue doit être monitoré, avec le QQQ, il est nécessaire d'injecter de nouveau l'échantillon pendant que, avec la trappe ionique orbitale on peut tout simplement ré-analyser les données, comme mentionné plus haut.

4. Analyse des médicaments traitant la dysfonction érectile

L'étude présentée dans le chapitre 4, publié dans *Journal of Chromatography A*, portes sur le développement d'une méthode étant en mesure de simultanément analyser 82 composés pouvant traiter la dysfonction érectiles qui sont suspectés d'être présent dans des échantillons contrefaits.

J'ai effectué toutes les manipulations, analyse de résultats et rédaction d'article. Mes co-auteurs, étant les co-directeurs du projet, ont fait les révisions pour la précision de l'anglais. Alexandra Furtos a été en charge de ma formation, mais aussi de l'élaboration et de la mise en place de chaque projet.

Santé Canada, situé (Longueuil, QC), a subventionné et donné accès aux standards, réactifs, échantillons et l'instrument (LC-MS/MS).

A rapid, quantitative liquid chromatography-mass spectrometry screening method for 71 active and 11 natural erectile dysfunction ingredients present in potentially adulterated or counterfeit products

Philippe Lebel^a, Jacques Gagnon^b, Alexandra Furtos^a, Karen C. Waldron^a

^a Department of Chemistry, Université de Montréal, C.P. 6128, succ. Centre-ville, Montréal, QC, H3C 3J7 Canada;

^b Inspectorate Laboratory Programme, Health Canada, Quebec Region, 1001 St-Laurent Street West, Longueuil, QC, J4K 1C7 Canada

P. Lebel, J. Gagnon, A. Furtos, K.C. Waldron, *J. Chromatogr. A.* **1343** (2014) 143-151.

Corresponding author:

Karen C. Waldron

Department of Chemistry

Université de Montréal

C.P. 6128, succ. Centre-ville

Montréal, QC H3C 3J7 Canada

Abbreviations: PDE-5, Phosphodiesterase type 5; ED, erectile dysfunction; PE, premature ejaculation; FTMS, Fourier Transform Mass Spectrum; TIC, Total ion chromatogram.

Running title: Rapid LC-MS/MS screening of 82 erectile dysfunction drugs

4.1 Abstract

A rapid LC-MS/MS method has been developed to simultaneously separate 71 erectile dysfunction (ED) drugs and 11 natural ingredients that are sometimes found alongside ED drugs, present in suspected adulterated or counterfeit samples. The separation was achieved in 10 min using 2.6 μm fused-core C_{18} particles in a 100×2.1 mm column coupled to an LTQ Orbitrap XL mass spectrometer operated in positive electrospray mode. Using a straightforward methanolic extraction procedure, recovery from real samples (tablets, capsules, oral liquids and herbal products) was 92–111% and the lower and upper limits of detection and quantification were in the sub ng/mL and the sub $\mu\text{g/mL}$ ranges, respectively. The intra- and inter-assay precision were $\leq 3.2\%$ and 10.4% respectively across three concentrations of standards (50, 250 and 1000 ng/mL) measured for 4 representative drugs spiked into a tablet-based matrix. This behavior was consistently observed for all the other compounds. The mass accuracy was less than 3 ppm. Moreover, an advantage of this method is that the full scan event in the acquisition method associated with the high resolution of the Orbitrap XL allows post-analysis identification, in an untargeted approach, of additional species in the complex matrices. Our LC-MS/MS method for ED drugs was successfully applied to 32 samples and the drug identifications were in 100% agreement with those obtained by the conventional methods HPLC-UV and GC-MS. Following the complete validation of the ED method, it has been introduced in the current counterfeit identification procedures at Health Canada.

Keywords: Erectile dysfunction drugs; Flavonoids; Phosphodiesterase type 5 inhibitors; Premature ejaculation; Counterfeit samples; Adulterated dietary supplements.

4.2 Introduction

Phosphodiesterase type 5 (PDE-5) inhibitors, which are clinically indicated for treatment of erectile dysfunction (ED), are widely available on the illegal market and as undeclared adulterants [2-4,13,39]. Some suppliers deliberately adulterate herbal medicines or dietary supplements with these synthetic compounds, or related substances, claiming to enhance sexual abilities and vitality in a natural, safe, healthy way. Others try to replicate and thus infringe on the patented drugs and sell them at a lower price. Products from these unethical sources are often made in unsanitary environments, can contain more ED drugs than recommended and the active ingredients are often mislabelled; combinations of 3–5 compounds may be present [1,40-45]. Aside from the drugs sildenafil citrate (Viagra), tadalafil (Cialis) and vardenafil hydrochloride (Levitra), few formal studies have been performed on the many analogues of PDE 5 inhibitors. The assumption that such analogues have toxicity and clinical effect similar to the parent compound is very dangerous. Since Health Canada's mission is to maintain and improve the health of Canadians, it was essential to develop fast screening methods to analyze as many PDE-5 inhibitors and their analogues as possible.

Erectile dysfunction drugs encompass a range of compounds that include many closely related structures and the presence of isomers, therefore requiring the use of a powerful analytical separation method like LC-MS/MS. An excellent review article by Venhuis and de Kaste [14] puts this challenge into perspective and also addresses the history and health risks of PDE-5 inhibitor analogues in food supplements. Also present in natural (e.g., herbal) samples are natural ingredients such as flavonoids and isoflavonoids. Those from the *Epimedium* species (icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icaritin and baohuoside I) have beneficial properties (anxiolytic, antioxidant, etc) and are touted to improve sexual performance; icariin is known to have PDE-5 inhibitor-like activity [46,47]. Flavonoids from the *Scutellaria* species (scutellarin, baicalin, wogonin) also show anxiolytic activity [48]. Thus the identification of 11 natural products was also incorporated in the method development, not only because of their potential to have PDE-5 inhibitor-like activity but also because they are present in some herbal products sold to treat ED.

Dapoxetine, which is a short-acting selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) designed to treat depression, has been shown effective to treat premature ejaculation (PE) even though it is not typically labeled for this use [49,50]. Patients with ED and PE may be prescribed both dapoxetine and a PDE-5 inhibitor simultaneously whereas some products sold to enhance sexual performance already contain both, e.g., Tadapox (tadalafil and dapoxetine) and Snovitra (vardenafil and dapoxetine).

The original goal was to develop a fast screening method for identification and quantification of 10 ED drugs in suspected adulterated or counterfeit medications and dietary supplements by high resolution mass spectrometry, which was achieved in 5 min with high accuracy and reproducibility for sildenafil citrate, vardenafil HCl, tadalafil, nortadalafil, dimethylsildenafil, homosildenafil, norneosildenafil, pseudovardenafil, thiodimethylsildenafil and hydroxythiohomosildenafil. Even though these 10 compounds are the most often found in the adulterated samples, we realized that many other ED drugs were also present and thus a better and wider screening method was needed. Most reports describe the separation of only a small number of ED drugs and these required run times longer than 20 or even 30 min. In reports where identification was achieved in less than 5 min, the researchers were monitoring only 2–5 compounds [1,40-45]. To the best of our knowledge, no separation method has been reported for the simultaneous determination of 71 ED-active ingredients and 11 natural ingredients in just 10 min.

4.3 Materials and methods

4.3.1 Reagents and standards

LC-MS grade methanol and acetonitrile were purchased from J.T. Baker (Tekniscience, Canada) and LC-MS grade formic acid (98%) was bought from Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). HPLC grade water from a Milli-Q Reference A+ system (Fisher Scientific, Canada) was used to prepare all aqueous solutions and eluants.

The following 82 standards, whose chemical structures are shown in Fig. 4.1 and whose purity and supplier are provided in the Supporting Information, were used in this study: 2-(2-

ethoxyphenyl)-5-methyl-7-propyl-3H-imidazo[5,1-f][1,2,4]triazin-4-one, acetic acid, acetildenafil (hongdenafil), acetylwardenafil, aminotadalafil, apixaban, avanafil, baicalin, baohuoside I, benzyl sildenafil, carbodenafil, chlorodenafil, chloropretadalafil, cinnamylildenafil, cyclopentynafil, daidzein, dapoxetine, demethylpiperazimyl sildenafil, desmethyl carbodenafil, dimethyl acetildenafil, dimethylsildenafil, dioxohongdenafil, dithio-desmethyl carbodenafil, epimedin A, epimedin B, epimedin C, gendenafil, genistein, homosildenafil, hydroxyacetildenafil, hydroxychlorodenafil, hydroxyhomosildenafil, hydroxythiohomosildenafil, hydroxythiowardenafil, hydroxywardenafil, icariin, icaritin, imidazosagatriazinone (desulfovardenafil), N-butyl tadalafil, N-desmethyl acetildenafil, N-desmethyl sildenafil, N-desmethyl vardenafil, N-ethyl tadalafil, nitrodenafil, N-octyl-nortadalafil, nor-acetildenafil (desmethylacetildenafil), norneosildenafil, norneovardenafil, nortadalafil, O-desmethyl sildenafil sildenafil impurity C), oxohongdenafil, papaverine, Phentolamine mesylate, piperiacetildenafil, propoxyphenyl sildenafil, pseudovardenafil, pyrazole N-desmethyl sildenafil, scutellarin, sildenafil amine HCl, sildenafil analogue (propoxyphenyl-aildenafil), sildenafil Analogue I (propoxyphenyl-thiohydroxyhomosildenafil), sildenafil Analogue III (propoxyphenyl-thioaildenafil), sildenafil chlorosulfonyl, sildenafil citrate, sildenafil coupled, sildenafil-d₈ (internal standard), sildenafil dimer impurity, sildenafil 2nd step impurity, sildenafil impurity A (isobutyl sildenafil), tadalafil, tadalafil impurity A, tadalafil impurity B, tadalafil impurity C, tadalafil impurity D, thiodimethyl sildenafil (dimethylthiosildenafil), thiohomosildenafil, thiomethisosildenafil (thioaildenafil; sulfoaildenafil) sildenafil impurity Z, thiosildenafil, udenafil, vardenafil HCl, wogonin, yohimbine. Stock solutions of individual standards were prepared separately in 10 mL volumetric flasks at an approximate concentration of 100 µg/mL in methanol, with small quantities of acetonitrile added if required for solubilisation. Diluted stock solutions (100 ng/mL–1 µg/mL) were directly infused into the mass spectrometer for adjustment of the experimental parameters for each analyte as described in Section 4.2.3.

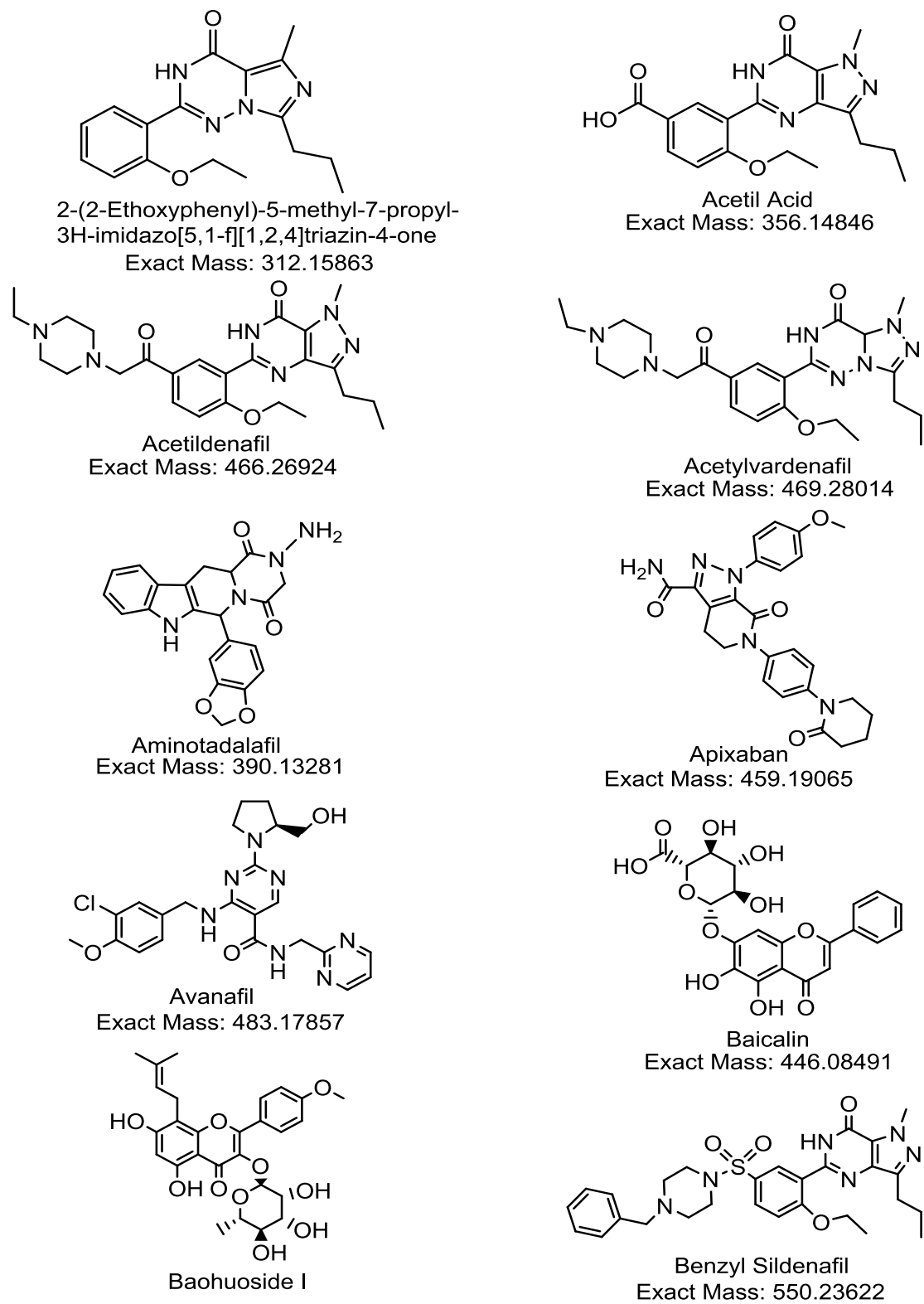
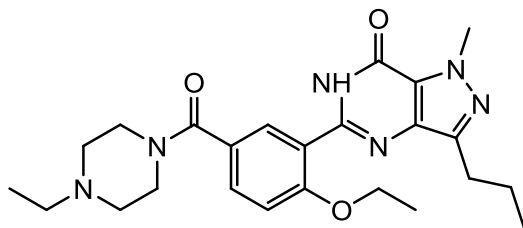
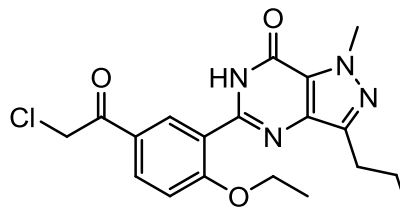


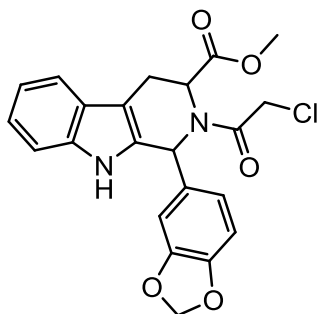
Figure 4.1. Chemical structures and monoisotopic masses of the 71 erectile dysfunction active ingredients and 11 natural ingredients investigated (figure continued on the next seven pages)



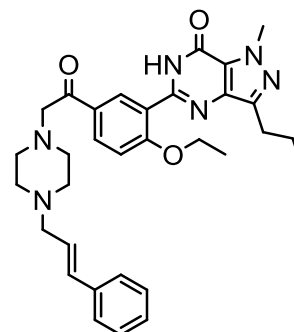
Carbodenafil
Exact Mass: 452.25359



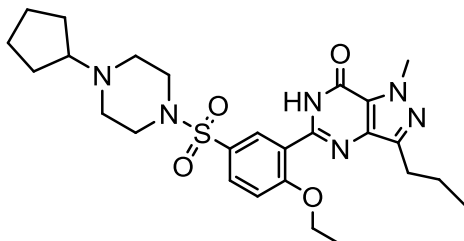
Chlorodenafil
Exact Mass: 388.13022



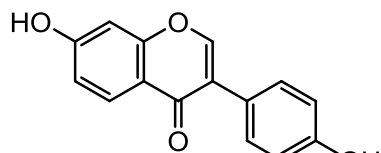
Chloropretadalafil
Exact Mass: 426.09825



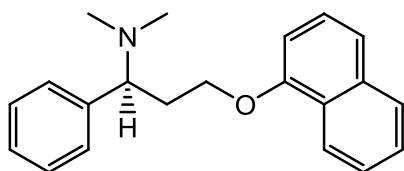
Cinnamyldenafil
Exact Mass: 554.30054



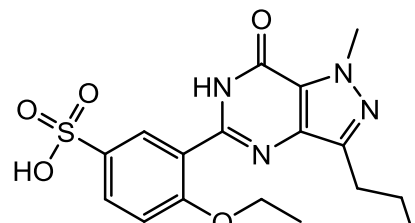
Cyclopentynafil
Exact Mass: 528.25187



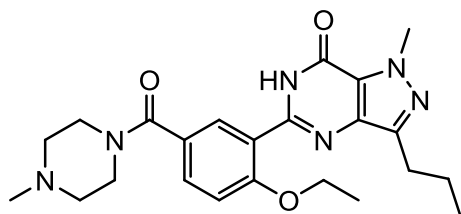
Daidzein
Exact Mass: 254.05791



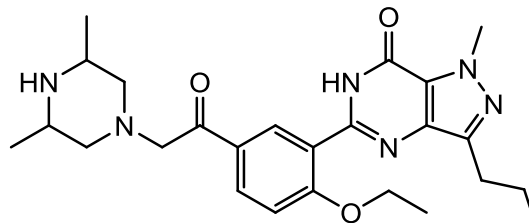
Dapoxetine
Exact Mass: 305.17796



Demethylpiperazinyl Sildenafil
Exact Mass: 392.11544

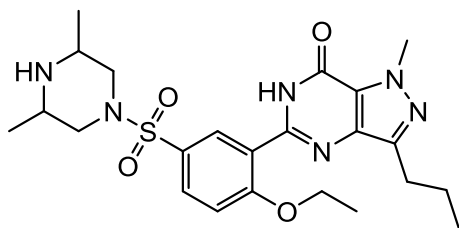


Desmethyl Carbodenafil
Exact Mass: 438.23794

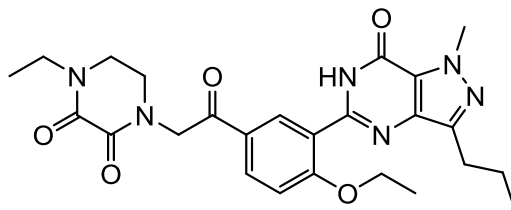


Dimethyl acetildenafil
Exact Mass: 466.26924

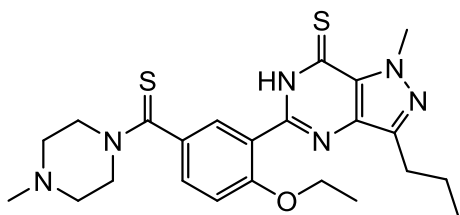
Figure 4.1. Continued



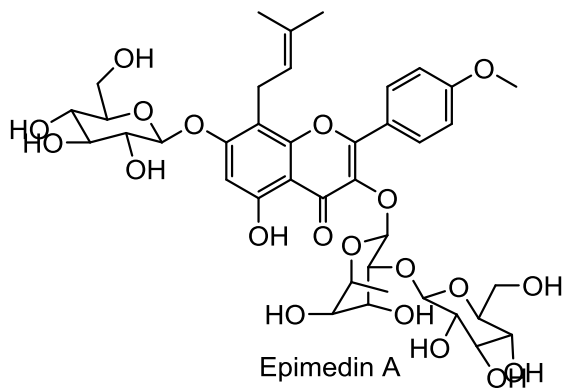
Dimethylsildenafil
Exact Mass: 488.22057



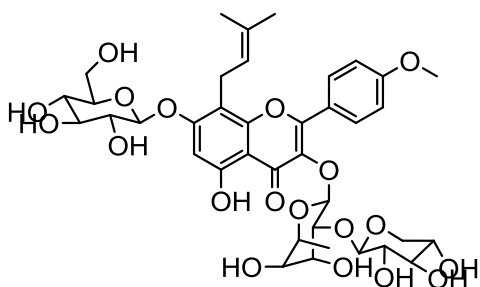
Dioxohongdenafil
Exact Mass: 494.22777



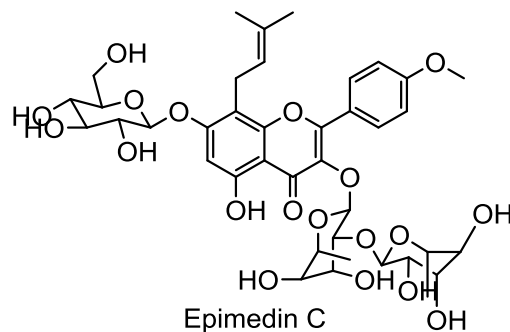
Dithio-desmethyl-carbodenafil
Exact Mass: 470.19225



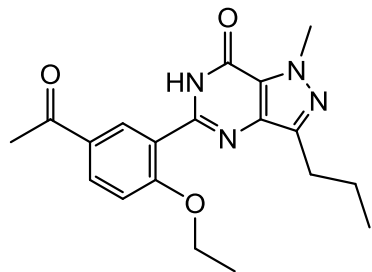
Epimedin A
Exact Mass: 838.28954



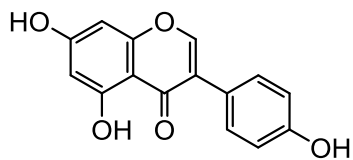
Epimedin B
Exact Mass: 808.27898



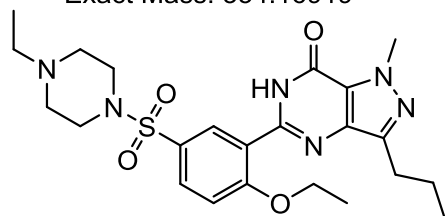
Epimedin C
Exact Mass: 822.29463



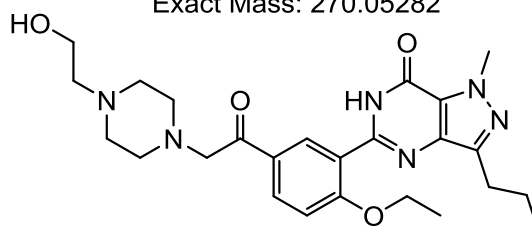
Gendenafil
Exact Mass: 354.16919



Genistein
Exact Mass: 270.05282

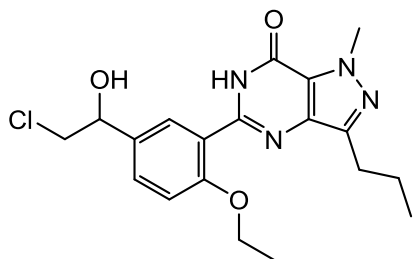


Homosildenafil
Exact Mass: 488.22057

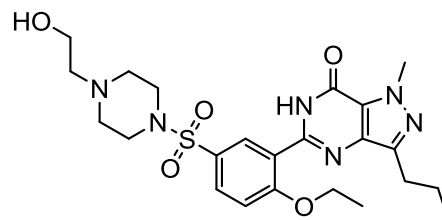


Hydroxyacetildenafil
Exact Mass: 482.26415

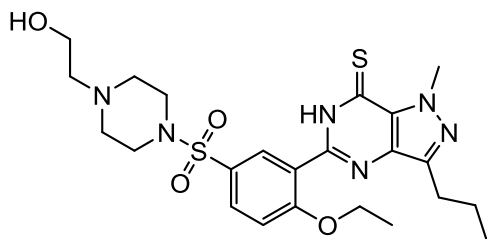
Figure 4.1. Continued



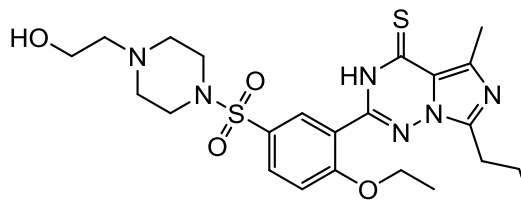
Hydroxychlorodenafil
Exact Mass: 390.14587



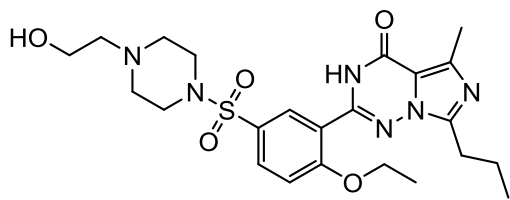
Hydroxyhomosildenafil
Exact Mass: 504.21549



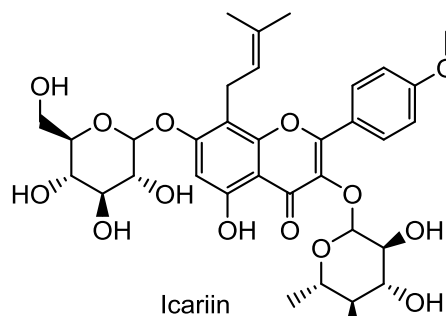
Hydroxythiohomosildenafil
Exact Mass: 520.19264



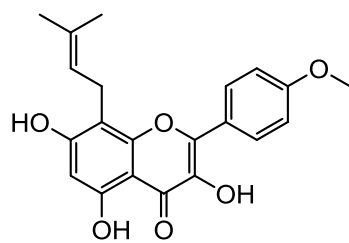
Hydroxythiovardenafil
Exact Mass: 520.19264



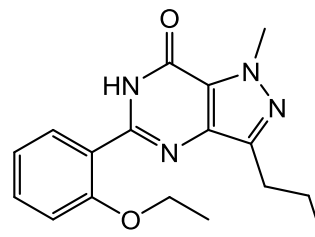
Hydroxy Vardenafil
Exact Mass: 504.21549



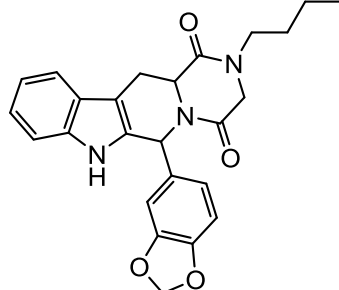
Icaritin
Exact Mass: 676.236720H



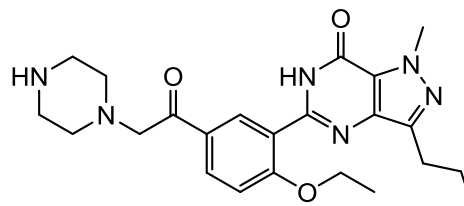
Icaritin
Exact Mass: 368.12599



Imidazosagatriazinone
Exact Mass: 312.15863

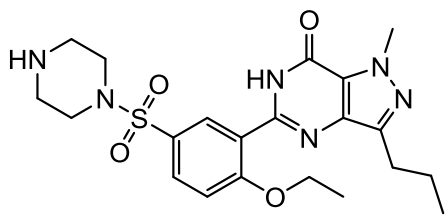


N-Butyl Tadalafil
Exact Mass: 431.18451

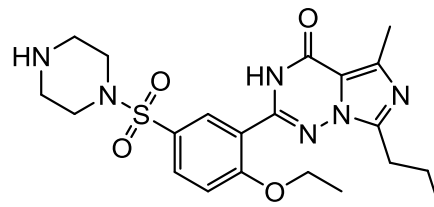


N-desmethyl acetildenafil
Exact Mass: 438.23794

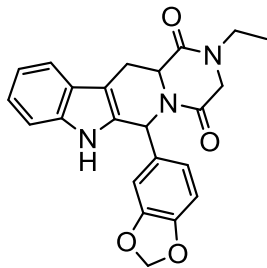
Figure 4.1. Continued



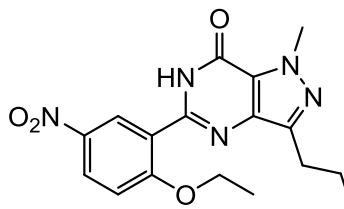
N-Desmethyl Sildenafil
Exact Mass: 460.18927



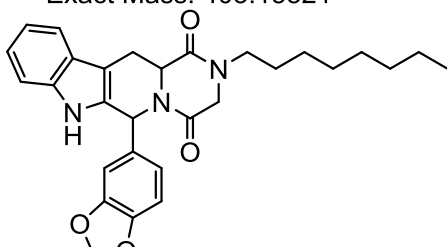
N-Desmethyl Vardenafil
Exact Mass: 460.18927



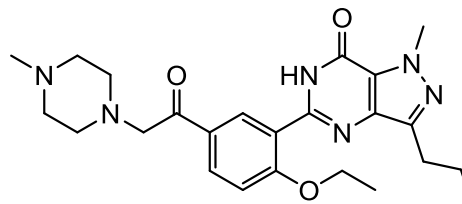
N-Ethyl Tadalafil
Exact Mass: 403.15321



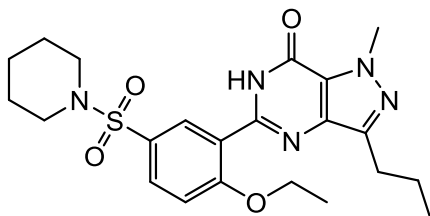
Nitrodenafil
Exact Mass: 357.14370



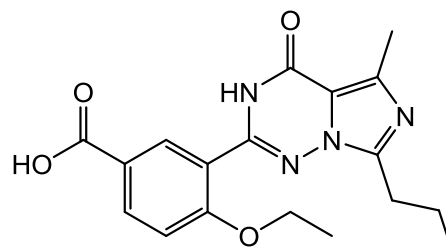
N-Octyl-Nortadalafil
Exact Mass: 487.24711



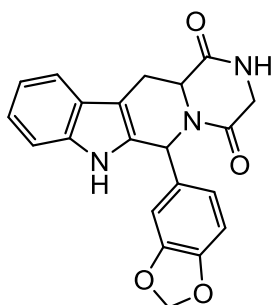
Nor-acetildenafil
Exact Mass: 452.25359



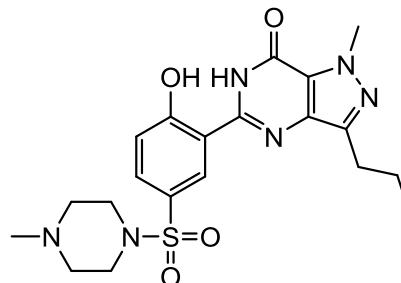
Norneosildenafil
Exact Mass: 459.19403



Norneovardenafil
Exact Mass: 356.14846

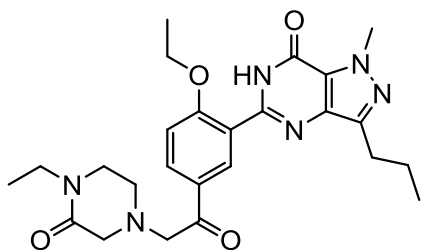


Nortadalafil
Exact Mass: 375.12191

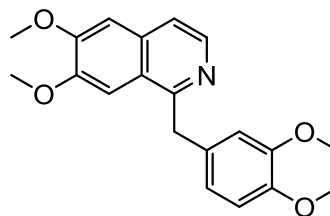


O-Desethyl Sildenafil (Sildenafil Impurity C)
Exact Mass: 446.17362

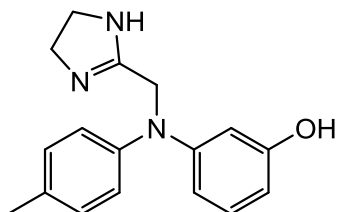
Figure 4.1. Continued



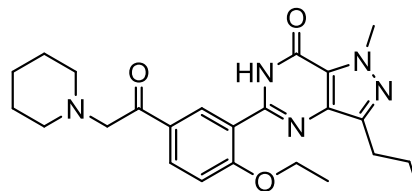
Oxohongdenafil
Exact Mass: 480.24850



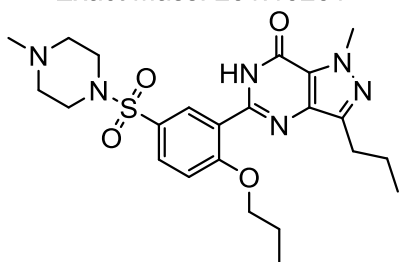
Papaverine
Exact Mass: 339.14706



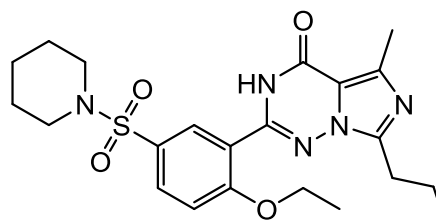
Phentolamine
Exact Mass: 281.15281



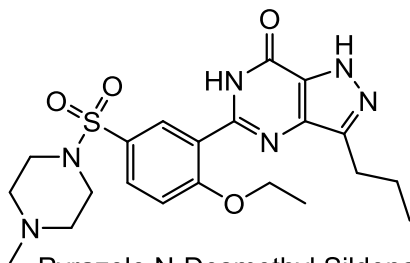
Piperiacetildenafil
Exact Mass: 437.24269



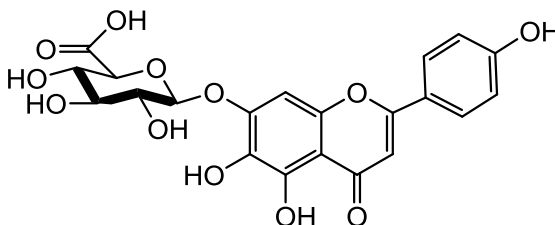
Propoxyphenyl Sildenafil
Exact Mass: 488.22057



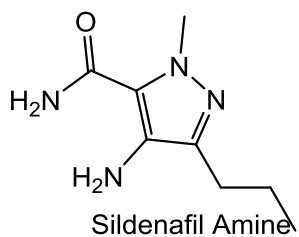
Pseudovardenafil
Exact Mass: 459.19403



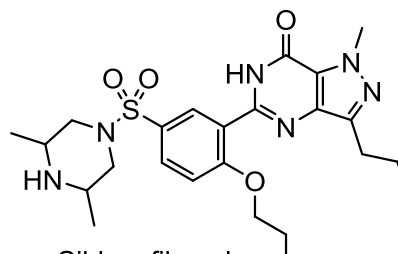
Pyrazole N-Desmethyl Sildenafil
Exact Mass: 460.18927



Scutellarin
Exact Mass: 462.07983

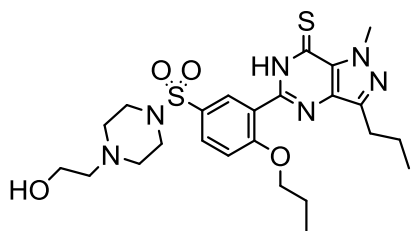


Sildenafil Amine
Exact Mass: 182.11676

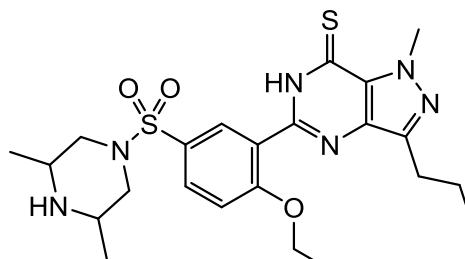


Sildenafil analogue
Exact Mass: 502.23622

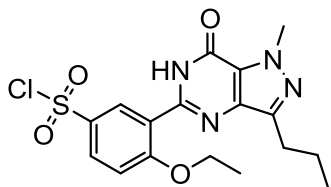
Figure 4.1. Continued



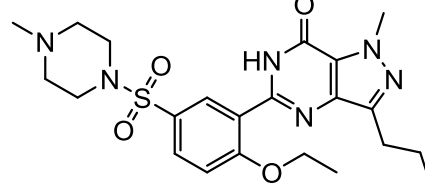
Sildenafil analogue I
Exact Mass: 534.20829



Sildenafil analogue III
Exact Mass: 518.21338

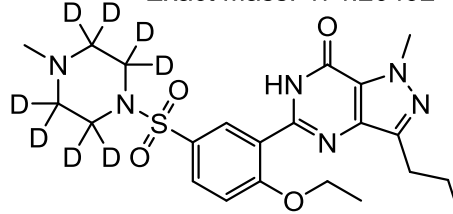


Sildenafil Chlorosulfonyl
Exact Mass: 410.08155



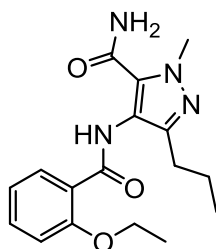
Sildenafil

Exact Mass: 474.20492

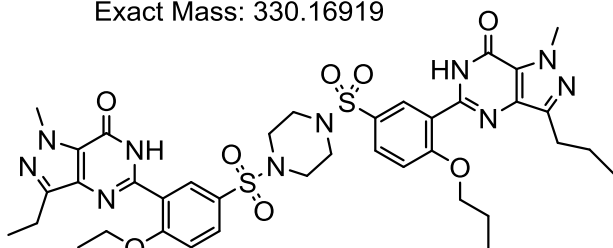


Sildenafil-d8

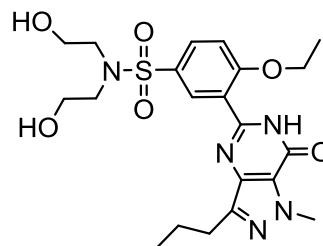
Exact Mass: 482.25514



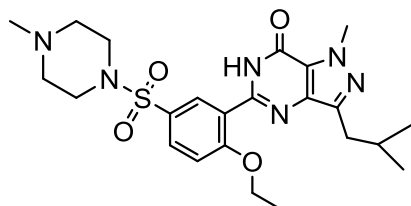
Sildenafil Coupled
Exact Mass: 330.16919



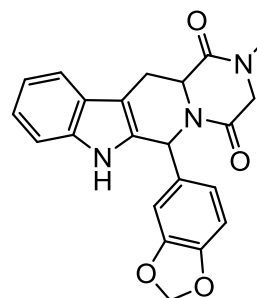
Sildenafil Dimer Impurity
Exact Mass: 834.29415



Sildenafil 2nd step impurity
Exact Mass: 479.18385



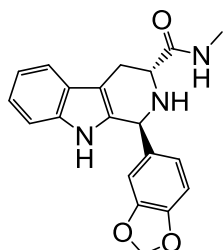
Sildenafil Impurity A (Isobutyl Sildenafil)
Exact Mass: 488.22057



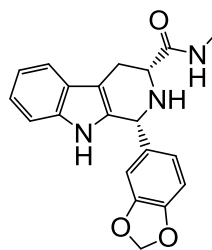
Tadalafil

Exact Mass: 389.13756

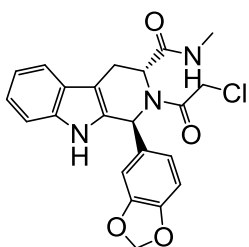
Figure 4.1. Continued



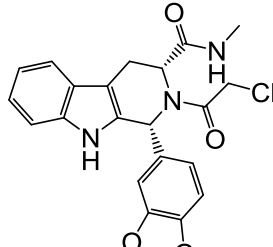
Tadalafil Impurity A
Exact Mass: 349.14264



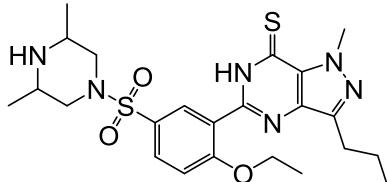
Tadalafil Impurity B
Exact Mass: 349.14264



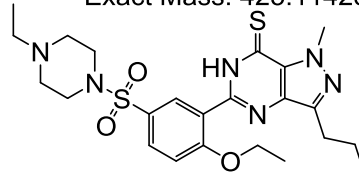
Tadalafil Impurity C
Exact Mass: 425.11423



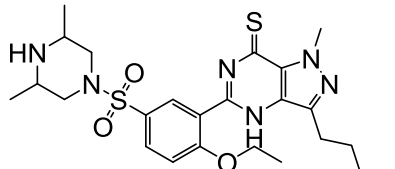
Tadalafil Impurity D
Exact Mass: 425.11423



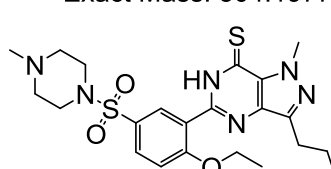
Thiodimethyl sildenafil
Exact Mass: 504.19773



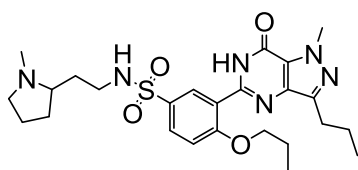
Thiohomosildenafil
Exact Mass: 504.19773



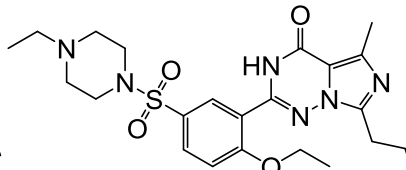
Thiomethisosildenafil
Exact Mass: 504.19773



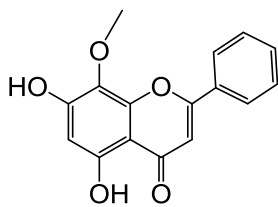
Thiosildenafil
Exact Mass: 490.18208



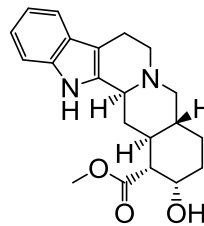
Udenafil
Exact Mass: 516.25187



Vardenafil
Exact Mass: 488.22057



Wogonin
Exact Mass: 284.06847



Yohimbine
Exact Mass: 354.19434

Figure 4.1. Continued

4.3.2 Samples and sample preparation

Viagra (25 mg) from Pfizer (Kirkland, Canada), Cialis from Eli Lilly (Toronto, Canada), Levitra from Bayer Health Care (Toronto, Canada) and 32 samples were analysed to determine the effectiveness and robustness of the LC-MS/MS method. Because some of the samples analysed during this project have not yet been released by Health Canada, only the dosage form and the detected analytes have been presented.

The samples analysed were present in different forms: tablets, conventional and liquid-gel capsules, oral liquids and herbal samples. Tablets and herbal products were finely ground. Aliquots of 3–5 mg of the resulting powder were transferred to 10 mL volumetric flasks and dissolved in a mixture of methanol:water:acetonitrile (70:20:10) containing 0.1-1% formic acid by treatment with vortex for 2 min, sonication for 10 min and vortex again for 3 min. The supernatant was filtered through a 0.45 µm pore polytetrafluoroethylene (PTFE) syringe filter (Phenomenex, Torrance, CA). The more complex herbal samples required an added centrifugation step at 3500 rpm for 10 min to reduce the possibility of mass overloading the syringe filter. Supernatants, which contain the analyte, were diluted 10 to 100-fold in water:acetonitrile (75:25), the initial mobile phase, before injection to avoid detector saturation and to maintain mass accuracy.

In the case of liquid-based oral samples, a 100 µL aliquot was mixed with 1 mL of the same ternary solvent as above and then the previous procedures were applied, except centrifugation. For gel capsule-based samples, 20 mL of 0.1 – 1% formic acid in water was added to the whole capsule (the casing included) in a 50 mL volumetric flask and shaken vigorously on a mechanical shaker for 10 min followed by sonication until the capsule opened (10–20 min). The solution was then diluted to volume with methanol. A second ultrasonic treatment was applied for 5-10 min then the solution was filtered through a 0.45 µm pore PTFE filter and finally diluted 100-fold in the initial mobile phase.

4.3.3 LC-MS/MS operating conditions

Data were acquired on an LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, San Jose, CA) coupled to an Acella HPLC system [51] equipped with an autosampler and Acella 600 pump. Xcalibur 2.1 and Thermo LTQ Tune Plus 2.5.5 software [51] were used to control the system and process the data. External mass calibration was used for all studies.

Amongst the available reversed-phase columns in our laboratory, five were tested for separation of the 82 standards: an XTerra C₁₈ (100 × 2.1 mm, 3.5 μm particles) from Waters (Mississauga, Canada); a Kinetex C₁₈ (75 × 2.1 mm, 2.6 μm particles) from Phenomenex (Torrance, CA); a Halo C₁₈ (100 × 3.0 mm, 2.7 μm particles) from Canadian Life Science (Montreal, Canada); an Accucore-RP (100 × 2.1 mm, 2.6 μm particles) from Thermo Scientific; and an Accucore aQ C₁₈ (100 × 2.1 mm, 2.6 μm particles), also from Thermo Scientific. All except the XTerra C₁₈ column contain fused-core particles. Initially, each column was screened from 5 to 95% organic solvent in the mobile phase with a linear 30-min gradient, for two solvent systems: methanol–water and acetonitrile–water, both containing 0.1% formic acid. The three columns giving the best results with these initial conditions (Halo C₁₈, Accucore-RP and Accucore-aQ) were then each subjected to gradient optimization.

For method validation and analysis of real samples, separations were carried out using the Accucore aQ C₁₈ column, which demonstrated the best selectivity as described further in Section 4.3.1. The analytical column was coupled to a Phenomenex (Torrance, CA) C₁₈ guard column (4 mm × 2.0 mm) and both were maintained at 50°C. The auto-sampler was maintained at 10°C to avoid sample degradation. The eluents consisted of 0.1% of formic acid in water (eluent A) and 0.1% of formic acid in acetonitrile (eluent B), and the initial mobile phase contained 25% B. After optimization, the following gradient elution was applied at a flow rate of 350 μL/min: 25–32% B from 0 to 2 min; 32–70% B from 2 to 5 min; hold at 70% B for 1.8 min. Eluent B was then decreased from 70 to 25% from 6.8 to 7 min and held constant for up to 10 min to permit column equilibration. The injection volume was 3 to 5 μL. A needle wash step using methanol:water:acetonitrile (70:20:10) was included in the method.

A 5 μ L blank of acidified 25% acetonitrile solution was injected after each sample to monitor and reduce any potential carryover.

The electrospray interface was operated in positive ion mode. Using direct infusion, the sheath gas, auxiliary gas, capillary voltage, tube lens voltage, etc., were optimized semi-automatically for every analyte using the tune tool in the LTQ Tune Plus software. Nitrogen was used as both sheath gas and auxiliary gas at flow rates of 34 and 20 (instrument units) respectively. Helium was used as collision gas. After tuning for every compound, the experimental parameters of the full scan event were set to the following values found to be suitable for all analytes: spray voltage, +3500V; capillary temperature, 310°C; capillary voltage, 42 V; tube lens, 110V. The MS² and MS³ transitions were determined for every compound by adjusting the normalised collision energy. The optimal collision energy for all compounds ranged between 26 and 35%. Therefore, a three-step collision energy function set at 25, 30 and 35% was used to perform average fragmentation on every compound. Mass spectra were acquired using two scan events: the first was an FTMS full scan for accurate mass detection and the second was a data dependent step with MS/MS acquired only for precursors from the parent mass list with a dynamic exclusion of 10 s. Every standard was then injected onto the column individually to determine its retention time and confirm the parent ion accurate mass, MS² and MS³. To determine if there were any interactions between the compounds, a mixture of all 82 standards was injected. The ion transitions MS² and MS³ for each standard are shown in Table S4.3 in the Supporting information.

4.3.4 Method performance

Once the separation and detection conditions were optimized, several parameters affecting method performance were studied. Analyte stability over time was evaluated for all 82 compounds under three different conditions: 6 h at room temperature, one week at 4°C and 18 h in the auto-sampler at 10°C, with each condition tested at three different solution concentrations (50, 250 and 1000 ng/mL). Following this, matrix effects and carryover were investigated. A selection of samples from 8 sources (4 different tablets, 3 different herbal products and 1 liquid-gel capsule) that had no detectable analytes were used for this purpose

and are henceforth referred to as “matrix-blank samples”. Each was spiked with the 82-analyte mixture of standards and extracted according to the procedures in Section 4.2.2. A comparison was then made between the peak areas in chromatograms obtained for individual standards and the 8 spiked matrix-blank samples.

Given the similarity in the structures of the 82 standards, a set of 21 of them, representative of the 82 masses and retention times, were chosen for linearity, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) determinations across a concentration range of 0.1–1000 ng/mL spiked into real herbal or tablet matrix-blank samples. To evaluate recovery, three different concentrations (50, 250 and 1000 ng/mL) of the same 21 standards were spiked into the herbal, or tablet, matrix-blank samples in triplicate, before or after extraction. Recovery was calculated by the following equation:

$$\text{Recovery (\%)} = 100 * \frac{(A_B - A_{Blk})}{A_A}$$

where, A_B and A_A are the peak areas found in the sample spiked with analyte before extraction and spiked after extraction, respectively, and A_{Blk} is the peak area found in an unspiked matrix-blank sample [52].

Next, the precision and accuracy of the LC-MS/MS method were evaluated rigorously for four standards (representative of the classes of compounds) spiked at three different levels (50, 250 and 1000 ng/mL) into herbal or tablet matrix-blank samples. All quantification and recovery studies described in this section were repeated, at minimum, in triplicate.

4.4 Results and discussion

The LC-MS/MS method was validated according to the United States Pharmacopeia (USP) [52]. The parameters validated were the selectivity, solution stability, matrix effects, carryover, linearity, limits of detection and quantification, recovery, precision and accuracy, as described below.

4.4.1 Selectivity

As seen in Fig. 4.1, many of the compounds have similar structures, which makes the chromatographic separation challenging. Two eluent systems were tested during method development: methanol-water and acetonitrile-water, both containing 0.1% formic acid. The acetonitrile gradient, once optimized, gave better selectivity for the separation of closely related compounds. Amongst the five columns tested for separation of the 82 component mixture using the acetonitrile:water mobile phase, the XTerra C₁₈ column gave quite broad peak shapes compared to the other four columns, likely because the particles were 35% larger. It also did not retain well the more hydrophilic compounds and was therefore excluded after the first screening tests. The Kinetex C₁₈ column also displayed problems with retention of the most hydrophilic analytes and was thus excluded early on. The Halo C₁₈ column, even after gradient optimization, produced a long run time (15 min) and broad peak shapes despite being packed with 2.7 µm diameter fused-core particles. The Accucore-RP column, which contains a different end-capping than typical C₁₈ particles, did not provide good chromatographic resolution or peak shape for dimethylsildenafil, homosildenafil and vardenafil, along with some other components, despite gradient optimisation. The Accucore aQ C₁₈ column demonstrated the best efficiency and selectivity and gave a better separation than any of the other columns, even for some of the isomers. According to the manufacturer, its end-capping is designed to have higher polar analyte selectivity, which we observed. It allowed us to use a higher initial organic content (25% B) for the gradient leading to a fast separation (10 min) without loss of selectivity and peak efficiency. To increase the analytical column lifetime, the guard column described previously was added.

Selectivity was further enhanced by coupling the high resolution chromatographic method to the high mass resolution power of the Orbitrap XL and optimizing the parameters for the 82 standards. Using direct infusion of each standard, flow rates of the N₂ sheath and auxiliary gases were optimised with the instrument's Tune Plus software. If the flow was too low for either gas, desolvation was not sufficient and this created droplets on the capillary cone. If the flow rates were too high, the spray was unstable and this triggered a 10-fold decrease in the signal intensity. The spray voltage for the metal needle needed to be between 3.0 and 3.5 kV.

The final optimized parameters for full scan detection of all 82 analytes (see values in Section 4.2.3) were selected to provide appropriate sensitivity for all components. The mass accuracy across the whole study was less than 3 ppm.

When operating the Orbitrap at a resolution of 30,000, approximately 12-15 scans (points) per chromatographic peak were obtained for the mixture containing 82 standards analysed simultaneously. This acquisition scan speed was well suited for the narrow peaks (6-10 s wide) produced by the fused-core particle chromatography allowing a very reliable quantification and improved method sensitivity. The well selected parent-fragment transitions helped to enhance the method selectivity. Indeed, as seen in Fig. 4.2 (spread across 4 panels for ease of peak identification), we were able to positively identify 71 ED drugs and 11 natural ingredients simultaneously from a mixture containing all 82 analytes by differentiating them with a combination of the accurate mass, the retention time and the fragmentation pattern (MS^2). The MS^3 data were acquired but not actually needed for the screening method. In the eventuality where a new analogue of identical parent ion mass, retention time and MS^2 is added to the method, the MS^3 data will be available for identification.

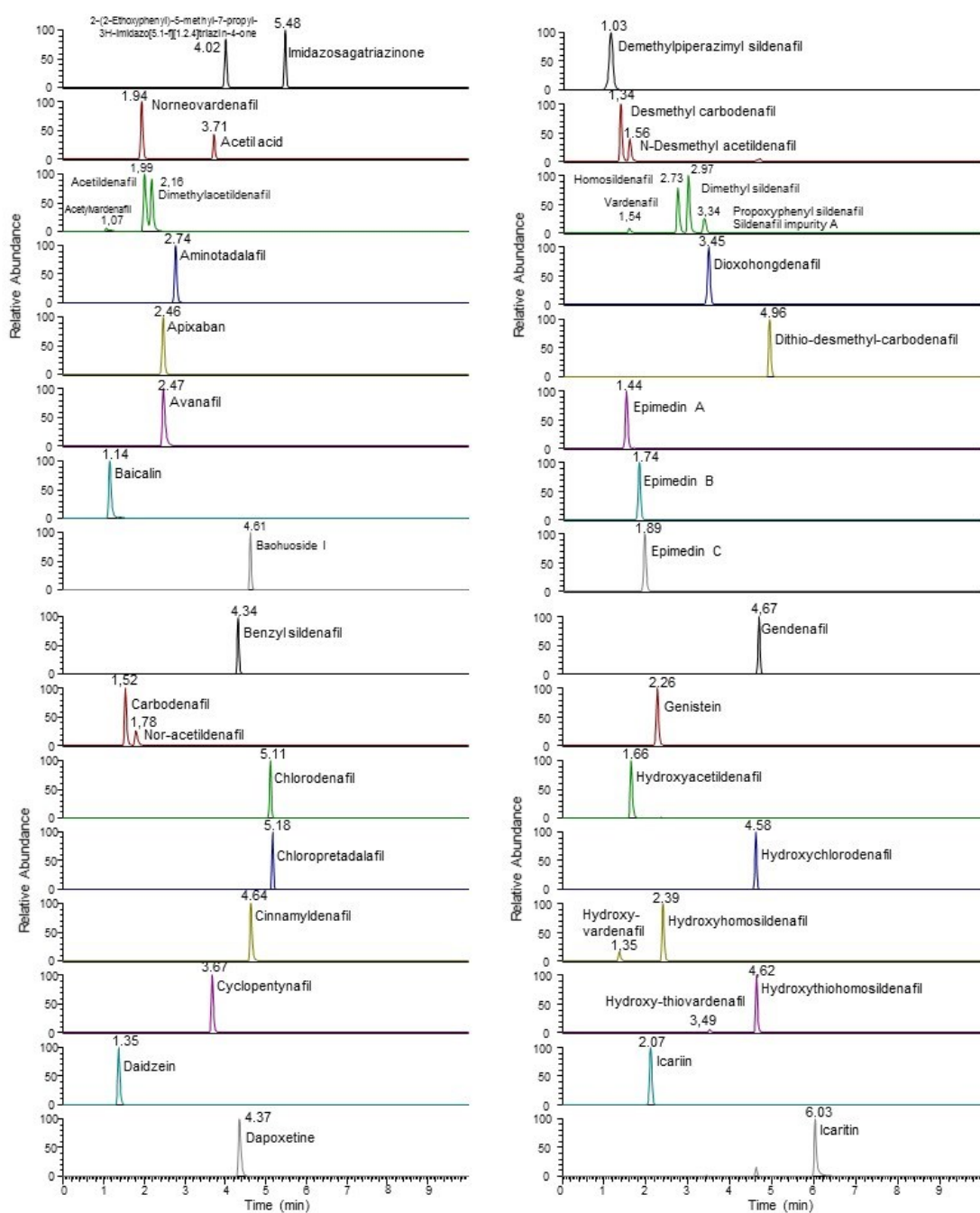


Figure 4.2. Typical chromatograms obtained by LC-MS/MS in positive electrospray mode. The extracted parent ion chromatograms (in alphabetical order) of all 82 compounds spread over 4 panels for ease of presentation are shown. Separation and detection were carried out as described in Section 4.2.3.

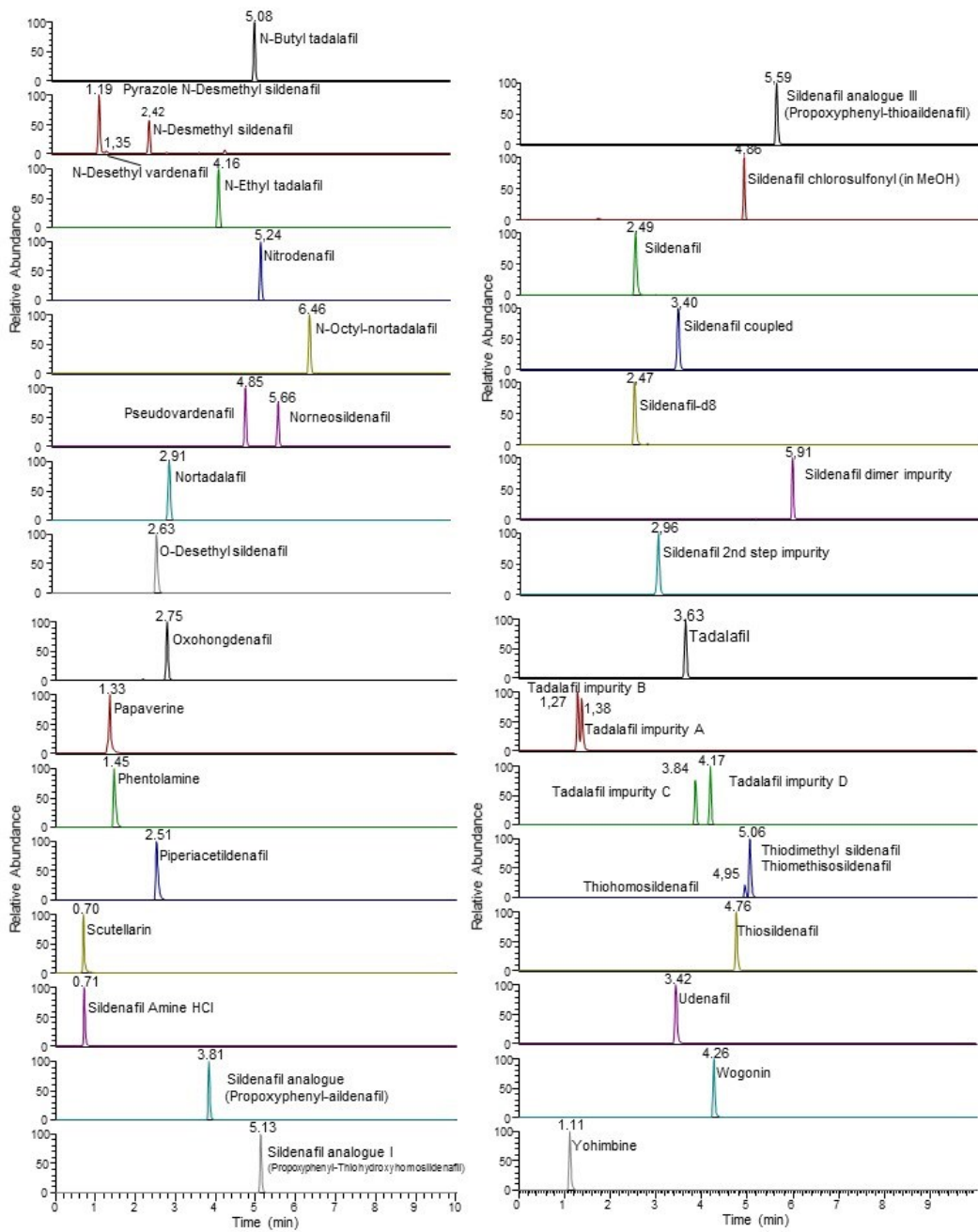


Figure 4.2. Continued

4.4.2 Solution stability

No significant degradation was observed at the three different storage times and temperatures tested (Section 4.2.4). Peak area variations were within 2–3% from the freshly prepared samples, regardless of sample concentration or storage conditions.

On the other hand, one compound was found to be sensitive to solvent conditions. During method development of the extraction conditions, methanol and acetonitrile were both tested as extraction solvents and methanol was found to perform significantly better. However, a peculiar behaviour was observed for sildenafil chlorosulfonyl, an intermediate in the synthesis of sildenafil citrate; when dissolved in methanol, its $[M+H]^+$ parent ion showed a shift of 4 mass units to m/z 407.13837, its chloride isotopic pattern was lost and its retention time was earlier (4.87 min). Accurate mass measurements indicated the substitution of chlorine by a methanol moiety. Therefore, when sildenafil chlorosulfonyl is suspected to be present or if an ion at m/z 407 is detected at that retention time, then sample preparation should be repeated using acetonitrile rather than methanol.

4.4.3 Matrix effects and carryover

To determine if interference from the various matrices was present, 8 samples from different sources were chosen as matrix-blanks and evaluated as described in section 4.2.4. A comparison of the chromatograms obtained for standards and for these 8 spiked matrix-blank samples revealed no difference in peak areas for the 82 analytes. Therefore, we were able to conclude that no interference came from the three different types of matrix (tablet, herbal, gel-capsule) during the extraction steps. Matrix effects should, however, always be determined as they are a function of the nature of the sample, which can vary (tablets, gel capsules, natural herbal samples, patches, etc.).

For the most part, the ED drugs, being mostly non-polar compounds, do not stick to the ESI source, the injector or the column. No problem with carryover, except with the compound icaritin, was observed when the samples and standards were run in the linear range of the analysed ED drugs. Indeed, only icaritin showed some carryover in the blanks following an

analysis: 1.6% when present at 1 µg/mL, 0.9% at 250 ng/mL and 0.3% at 50 ng/mL. To solve this problem, we suggest that two blank injections be used between the samples that contain icaritin and that the capillary temperature to be set at 325°C for one of the blanks to help remove any sample that may stick to the source.

4.4.4 Linearity, detection limit, quantification limit and recovery

The linearity of each of the 21 representative compounds was evaluated across a concentration range of 0.1–1000 ng/mL (n=17). Linear regression was obtained by plotting the peak area responses of each compound as a function of its respective concentration and applying a $1/X$ weighting factor. Calibration curve correlation coefficients (r^2) ranged between 0.9969 and 0.9991. As seen in Table 4.1, the detection limit (calculated at signal/noise ratio of 3) ranged from 0.10–7.50 ng/mL regardless of the presence of matrix. The limit of quantification (at signal/noise of 10) was found to be within 0.33–24.75 ng/mL whether with or without matrix (Table 1).

It was important to develop a simple and economical extraction method that was also fast and effective with good recovery to complement the rapid LC-MS/MS screening method. Recovery studies from the same herbal and tablet samples were made for the 21 standards that were selected to span the range of masses and polarities (i.e., retention times) of the 82 analytes. The recoveries ranged between 92 and 111% as seen in Table 4.1.

Table 4.1. Quantitative method performance (LOQ, LOQ and recovery) of 21 erectile dysfunction (ED) drugs spiked into herbal or tablet-based matrix.

Analytes	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Sensitivity (mL/ng)	Correlation coefficients (r ²)	Mean Recovery (%)		
					50 ng/mL (n = 3)	250 ng/mL (n = 3)	1000 ng/mL (n = 3)
Apixaban	1.5	4.3	43 112	0.9994	101±4	98±3	98±2
Baicalin	7.5	24.75	5 838	0.9916	111±6	95±2	90±2
Daidzen	1.1	3.6	29 617	0.9966	100±2	99±3	101±2
Genistein	1.5	4.95	18 518	0.9976	98±3	97±5	97±2
Icariin	2.6	8.6	11 173	0.9942	97±2	97.1±0.9	97±1
Norneosildenafil	0.15	0.5	106 096	0.9991	96±2	93±2	95±2
Norneovardenafil	0.15	0.5	174 038	0.9984	99±1	96.7±0.9	94.0±0.3
Nortadalafil	2.5	8.25	8 550	0.9983	100±5	99±4	96±1
Pyrazole N-desmethyl sildenafil	0.4	1.3	31 451	0.9986	102.2±0.6	97.3±0.9	96±1
Sildenafil (citrate salt)	0.4	1.3	41 840	0.9980	102±1	99.5±0.7	95.2±0.6
Sildenafil Coupled	0.2	0.65	68 538	0.9983	98±2	95.0±0.3	94±1
Sildenafil-d8	0.5	1.65	32 011	0.9998	102±2	98±6	96±2
Tadalafil	0.7	2.3	17 404	0.9994	103±3	101±2	99±2
Tadalafil Imp A	0.2	0.65	73 146	0.9981	99±1	95.7±0.6	97.1±0.6
Tadalafil Imp D	0.4	1.3	16 394	0.9985	99±4	98±1	92.6±0.6
Thiodimethylsildenafil	0.25	0.85	86 507	0.9995	94.4±0.9	95±1	93.7±0.6
Vardenafil (HCl form)	0.75	2.5	7 006	0.9986	100±3	99.9±0.8	99±2
2-(2-Ethoxyphenyl)-5- methyl-7-propyl-3H- imidazo[5.1- f][1.2.4]triazin-4-one	0.1	0.33	262 449	0.9981	93±2	93±1	92.6±0.2
Scutellarin	4	13.2	5 244	0.9917	105±3	95±2	96±6
Wogonin	4	13.2	23 150	0.9818	99±1	93±2	93±1
Yohimbine	0.1	0.33	136 375	0.9989	98±1	98±1	98.7±0.7

4.4.5 Precision and accuracy

The precision and accuracy of the method were rigorously evaluated for four compounds at three different concentrations: 50, 250 and 1000 ng/mL. Each concentration level was prepared in five replicates by spiking the appropriate amount in an analyte-free matrix. Each sample was then injected five times for intra-assay precision evaluation. The procedure was repeated the following week to determine the inter-assay precision. As shown in Table 4.2, the relative standard deviations were below 10.5 % for both the precision and repeatability. It is important to mention that even though only four compounds are represented in Table 4.2, all

82 compounds were injected numerous times individually and together during the method development with only very small changes in peak areas seen (i.e., within repeatability error) and no significant changes in retention time. The method accuracy was determined by comparing the calculated concentration with the true value spiked into the matrix. As seen in Table 2, the accuracy was within 10 % for all compounds at all concentrations tested.

Table 4.2. Intra-assay precision and accuracy and inter-assay precision for four erectile dysfunction (ED) drugs.

Analytes	Intra-assay (n=5)					
	Precision (% RSD)			Accuracy (% error)		
	50 ng/mL	250 ng/mL	1000 ng/mL	50 ng/mL	250 ng/mL	1000 ng/mL
Norneosildenafil	1.5	1.3	2.8	8.5	1.8	2.9
Tadalafil	2.6	1.0	2.7	6.3	9.1	4.1
Vardenafil HCl	1.2	3.2	2.6	7.4	4.1	5.2
Yohimbine	1.4	1.5	1.4	5.4	9.2	7.0

Analytes	Inter-assay (n=10)		
	Precision (% RSD)		
	50 ng/mL	250 ng/mL	1000 ng/mL
Norneosildenafil	4.1	4.7	6.3
Tadalafil	10.4	9.2	9.4
Vardenafil HCl	5.3	5.8	6.7
Yohimbine	2.2	2.1	2.0

Instrument repeatability was also evaluated. After 25 injections of tadalafil (five replicates for each of five different samples), essentially no change in retention time (intra-assay, 0.04 % RSD; inter-assay, 0.40 % RSD) and only a very small change in peak area (1.0 % RSD) occurred. The same results were observed for all the other compounds.

4.4.6 Analysis of samples

A total of 35 samples were analysed with our LC-MS/MS approach: 3 legal ED tablets of Viagra, Cialis and Levitra, 6 tablets of counterfeit Viagra, 4 tablets of counterfeit Cialis, 3

tablets of counterfeit Levitra, 9 seized tablets from different non-registered sources, 8 herbal samples and 2 gel capsules. Amongst the 82 compounds, sildenafil, tadalafil, vardenafil and icariin were the four most common adulterant drugs found, but in some cases, analogues were detected as well. For example, a counterfeit tablet of Cialis and an illegal product were analysed for tadalafil, the known active ingredient. However, besides the peak for tadalafil, observed at 3.63 min as expected in both cases (Fig. 4.3 and 4.4), sildenafil was also detected at 2.50 min in the counterfeit Cialis tablet (Fig. 4.3). On the other hand, in the illegal product, N-octyl-nortadalafil was identified at 6.48 min (Fig. 4.4).

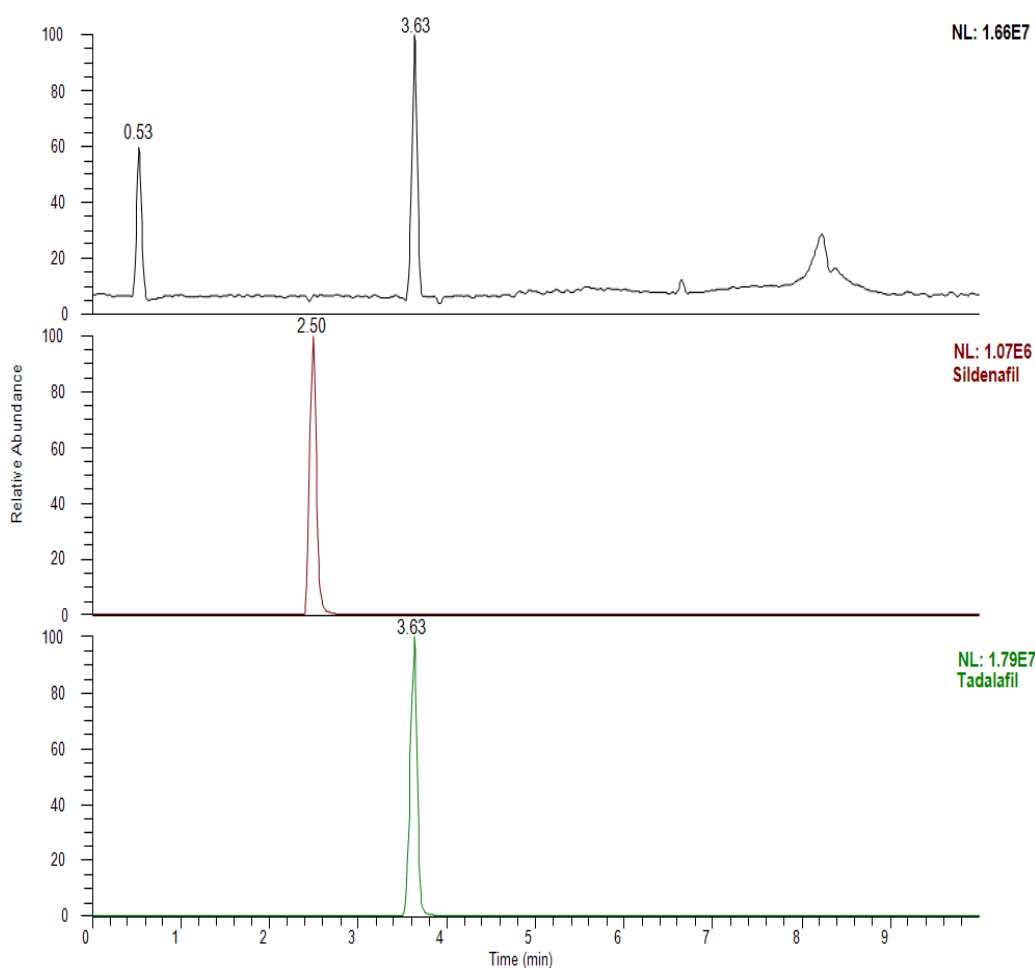


Figure 4.3. Counterfeit sample of Cialis showing the presence of tadalafil and the adulterant sildenafil. The uppermost panel represents the total ion chromatogram [53] and the lower two panels show the extracted ion chromatograms of sildenafil (middle panel) and tadalafil (lower panel). Separation and detection were carried out as described in Section 4.2.3.

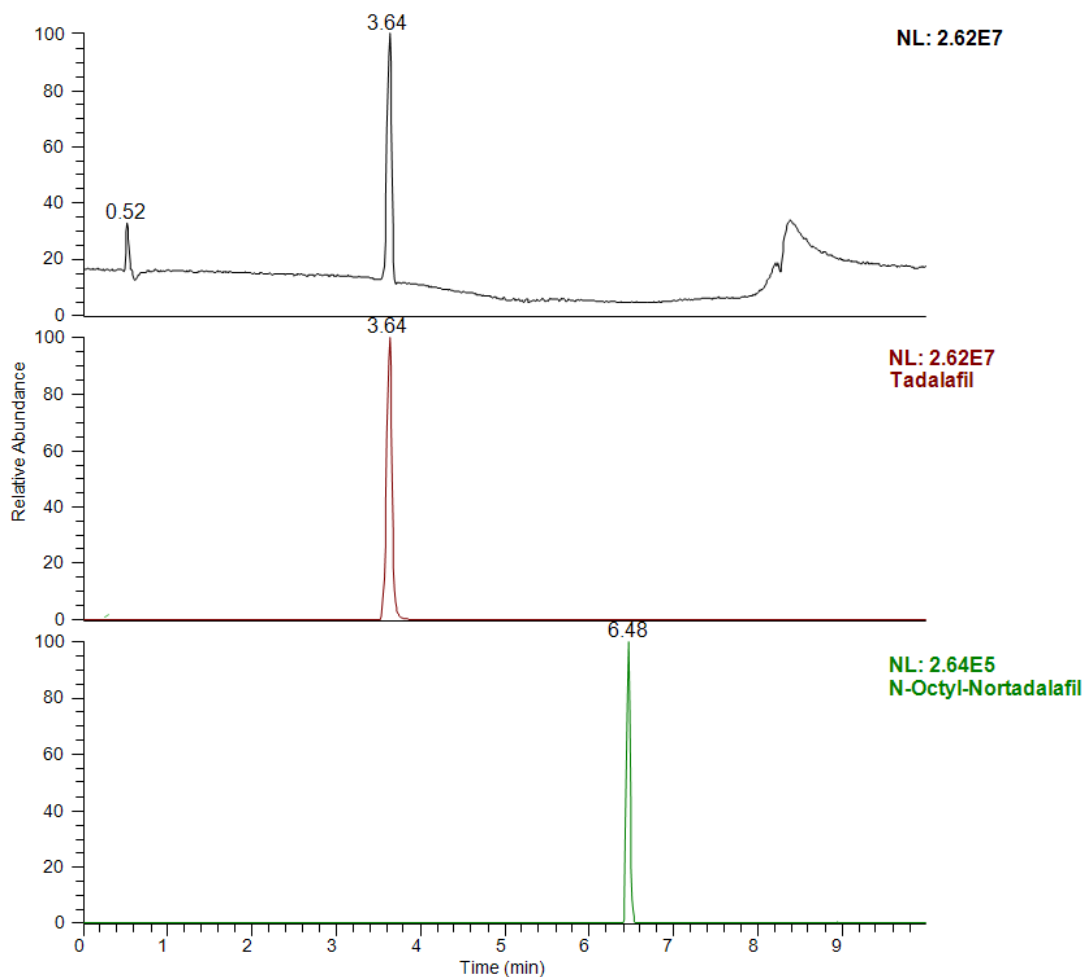


Figure 4.4. Illegal product showing the presence of tadalafil and the adulterant N-octyl-nortadalafil. The uppermost panel represents the TIC and the lower two panels show the extracted ion chromatograms of tadalafil (middle panel) and N-octyl-nortadalafil (lower panel). Separation and detection were carried out as described in Section 4.3.

All samples used in this study had been previously analysed with the two validated HPLC-UV and GC-MS methods routinely used by the Inspectorate Laboratory Programme at Health Canada (standard operating procedure SOP-0440). The results obtained with this new LC-MS/MS approach on the Orbitrap XL fared very well compared with these. For example, the new method was 5 times faster than the validated HPLC method, was 2.5 times more rapid than the validated GC method, and was more sensitive than both due to the LTQ Orbitrap XL.

Moreover, the method did not produce any false positive or false negative results in that the same compounds were found when samples were run using the validated HPLC-UV and GC-MS methods. The new ED drug screening method is now being implemented by Health Canada in the Inspectorate Laboratory Programme as an identification tool.

As mentioned above, most reports describe the separation of only a small number of ED drugs and these required run times between 5 and 20 or even 30 min [1,40-45]. Ren *et al.* [54] were able to separate 18 ED drugs in just under 11 min by ultra-fast liquid chromatography-MS/MS, but their instrumental detection limits were more than 100 times higher than what we report here. In a poster from the Supreme Council of Health, State of Qatar [55], a total of 32 ED compounds were monitored in 15 min with similar detection limits to ours; 42% of the samples they analysed were found to be adulterated with some of these ED drugs. Similar rates of adulteration amongst tested dietary samples were found in the other studies referenced above. An additional challenge in the control and monitoring of adulterated dietary and herbal preparations is the appearance of new PDE-5 analogues, such as the compound propoxyphenyl homohydroxysildenafil whose structure was recently elucidated using an Orbitrap XL mass spectrometer [56]. The power of our reported full-scan method is that acquired data can be re-analysed in the future to see if newly reported compounds were actually present in those samples.

4.5 Conclusion

This paper reports the development of a rapid LC-MS/MS screening method for fast, simultaneous identification of 71 ED active ingredients and 11 natural ingredients present in herbal medicines, dietary supplements, and legitimate or counterfeited trademark products. The novelty of this work lies in the enhanced selectivity of the method, permitting the separation and simultaneous quantification of 82 compounds. This was achieved by the optimized pairing of high-resolution, fused-core particle chromatography with the high mass resolution power of the Orbitrap XL and well selected parent-fragment transitions. An additional advantage is that the full scan event in the acquisition method associated with the high resolution allows post-analysis identification, in an untargeted approach, of additional

species in the complex matrices. Overall, the method offers an indispensable analysis tool since adulterated natural remedies can also contain synthetic drug substances of unknown toxicity and purity with possible unexpected drug-drug interactions [1] that may put consumers' health at risk. After an overview of the current available literature on the subject, to the best of our knowledge this is the first publication that screened such a large number of ED drugs in only 10 min. Following the complete validation of this method, it has been introduced in the current counterfeit identification procedures at Health Canada.

4.5.1 Acknowledgements

This research was funded in part by Health Canada. P. Lebel is grateful for graduate fellowships from Health Canada and University of Montreal. We would like to thank the Inspectorate Laboratory Programme at Health Canada in Longueuil, Quebec, for their support and for access to the standards, commercial and counterfeit samples.

4.6 Supporting information

The following section is adapted from the Supporting Information published with Lebel *et al.* “A rapid, quantitative liquid chromatography-mass spectrometry screening method for 71 active and 11 natural erectile dysfunction ingredients present in potentially adulterated or counterfeit products”., in *J. Chromatogr. A*. In section S4.5.1, the origin and the purity of the 82 standards are presented. In Table S4.3, the accurate mass, MS² and MS³ are presented.

S4.6.1 Reagents and Standards

The names, purities and suppliers of the 82 standards and one internal standard, all used without further purification, are provided here. The following standards were obtained from TLC PharmaChem (Vaughan, Canada): acetyl acid (98.3%), acetildenafil (hongdenafil) (99.2%), acetylwardenafil (98.6%), aminotadalafil (99.8%), avanafil (98.1%) benzyl sildenafil (99.3%), carbodenafil (99.0%), chlorodenafil (98.6%), chloropretadalafil (99.7%), cinnamylildenafil (99.5%), cyclopentynafil (99.1%), dapoxetine (99.9%), demethylpiperazimyl sildenafil (99.9%), desmethyl carbodenafil (99.7%), dimethyl acetildenafil (99.5%), dimethylsildenafil (99.4%), dioxohongdenafil (99.7%), dithio-desmethyl carbodenafil (98.7%), gendenafil (98.8%) homosildenafil (99.6%), hydroxyacetildenafil (99.1%), hydroxychlorodenafil (99.7%), hydroxyhomosildenafil (99.5%), hydroxythiohomosildenafil (99.8%), hydroxythio vardenafil (99.0%), hydroxy vardenafil (99.8%), imidazosagatriazinone (desulfovardenafil) (99.3%), N-butyl tadalafil (99.6%), N-desmethyl acetildenafil (99.6%), N-desmethyl sildenafil (99.9%), N-desmethyl vardenafil (99.6%), N-ethyl tadalafil (99.4%), nitrodenafil (99.0%), N-octyl-nortadalafil (99.5%), nor-acetildenafil (desmethylacetildenafil) (99.6%), norneosildenafil (99.7%), norneovardenafil (99.6%), nortadalafil (100.0%), O-desmethyl sildenafil (sildenafil impurity C) (99.6%), oxohongdenafil (98.9%), piperiacetildenafil (98.9%), propoxyphenyl sildenafil (99.2%), pseudovardenafil (99.8%), pyrazole N-desmethyl sildenafil (99.0%), sildenafil amine HCl (99.1%), sildenafil analogue (propoxyphenyl-aildenafil) (99.5%), sildenafil Analogue I (propoxyphenyl-thiohydroxyhomosildenafil) (99.9%), sildenafil Analogue III (propoxyphenyl-thioaildenafil) (99.7%), sildenafil chlorosulfonyl (99.9%), sildenafil citrate (99.8%), sildenafil coupled (99.3%), sildenafil-d8 (internal standard; 98.8% by isotopic enrichment and 99.7% by

HPLC), sildenafil dimer impurity (99.7%), sildenafil impurity A (isobutyl sildenafil) (99.9%), tadalafil impurity A (99.8%), tadalafil impurity B (99.8%), tadalafil impurity C (99.8%), tadalafil impurity D (98.7%), dimethylthiosildenafil (99.9%), thiohomosildenafil (99.3%), thiosildenafil (98.9%), udenafil (99.1%), vardenafil HCl (99.5%) and 2-(2-ethoxyphenyl)-5-methyl-7-propyl-3H-imidazo[5,1-f][1,2,4]triazin-4-one (99.1%). Tadalafil (99.6%) was obtained from Eli Lilly (Toronto, Canada), thiomethisosildenafil (thioaildenafil; sulfoaildenafil) (98%) was from Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, Canada), and both sildenafil impurity Z (96.2%) and sildenafil 2nd step impurity (100.0%) were obtained from Ratiopharm (Mirabel, Canada). Apixaban (99%) was obtained from Bristol Myers Squibb (Montreal, Canada). Baicalin (97.2%), baohuoside I (93.2%), daidzein (97.5%), epimedin A (89.5%), epimedin B (90.5%), epimedin C (93.6%), genistein (99.1%), icariin (93.3%), scutellarin (88.9%) and wogonin (91.6%) were purchased from ChromaDex (Irvine, CA). Icaritin (100%) and yohimbine (99.0%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Phentolamine mesylate (100%) and papaverine (100%) were obtained from USP (Rockville, MD).

Table S4.3. Accurate mass, MS² and MS³ (arising from MS² transitions shown in bold) of the 71 ED active ingredients and 11 natural ingredients, shown in alphabetical order.

Analyte Standard	[M+H] ⁺ (m/z)	MS ² (m/z)	MS ³ (m/z)	Analyte Standard	[M+H] ⁺ (m/z)	MS ² (m/z)	MS ³ (m/z)
2-(2-Ethoxyphenyl)-5-methyl-7-propyl-3H-imidazo[5.1-f][1.2.4]triazin-4-one (C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₂)	313.1659	151.09 285.14 168.96	151.10 257.31 215.82 169.20 134.93	Baicalin (C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁)	447.09219	271.11	253.97 225.06 168.92
Acetil acid (C ₁₈ H ₂₀ N ₄ O ₄)	357.15573	329.15 285.17 300.11	285.10 311.11 256.08 300.19 166.07	Baohuoside I (C ₂₇ H ₃₀ O ₁₀)	515.19117	369.2	313.1
Acetildenafil (Hongdenafil) (C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₃)	467.27652	449.27 353.16 420.23 439.25 396.20 339.10 325.18 297.25	420.23 297.30 311.32 339.33 363.39	Benzyl sildenafil (C ₂₈ H ₃₄ N ₆ O ₄ S)	551.2435	377.13 508.24 459.18 403.21	331.09 312.16 341.11 349.10 359.12 284.20

Acetylwardenafil (C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₃)	467.27652	341.16 449.27 317.20 355.18 396.20 439.24 325.13	313.13 151.09 285.13 199.03	Carbodenafil (C ₂₄ H ₃₂ N ₆ O ₃)	453.26087	339.25 311.18 382.23 410.24	311.16
Aminotadalafil (C ₂₁ H ₁₈ N ₄ O ₄)	391.14008	269.12 262.09 250.09 135.04 149.02	241.12 169.05 197.04 239.10 224.01 252.18	Chlorodenafil (C ₁₉ H ₂₁ ClN ₄ O ₃)	389.13749	361.14 285.14 313.17 332.13	285.14 297.15 256.10
Apixaban (C ₂₅ H ₂₅ N ₅ O ₄)	460.19793	443.3	199.06 282.15 241.07 183.99 254.16 156.08	Chloropretadalafil (C ₂₂ H ₁₉ ClN ₂ O ₅)	427.10553	395.08 262.09 334.20 305.07 135.04 278.02	135.04 302.08 273.10 377.22 367.21
Avanafil (C ₂₃ H ₂₆ ClN ₇ O ₃)	484.18584	375.14 349.26 221.09 155.99	357.14 233.07 154.95 205.03 343.10 303.10 329.19	Cinnamylidenafil (C ₃₂ H ₃₈ N ₆ O ₃)	555.30782	437.30 355.23 339.23	355.23 339.15 409.26 420.30
Cyclopentynafil (C ₂₆ H ₃₆ N ₆ O ₄ S)	529.25915	461.38	313.20 311.14 377.16 283.11 299.14 329.19 347.11	Dithio-desmethyl- carbodenafil (C ₂₃ H ₃₀ N ₆ OS ₂)	471.19953	371.27 385.13 414.21 343.21	343.25
Daidzein (C ₁₅ H ₁₀ O ₄)	255.06519	199.03 227.11 136.95 214.08 237.10 231.16 181.03	181.01 170.94 157.22 131.04	Epimedin A (C ₃₉ H ₅₀ O ₂₀)	839.29682	677.22 531.17 369.23 313.20	N/A
Dapoxetine (C ₂₁ H ₂₃ NO)	306.18579	261.16 183.05	183.05 117.01 157.02 233.10	Epimedin B (C ₃₈ H ₄₈ O ₁₉)	809.28626	677.22 531.17 369.23 313.20	N/A
Demethylpiperazimyl sildenafil (C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₅ S)	393.12272	365.19 284.12	256.10 285.16 299.12 269.12 323.22 241.08	Epimedin C (C ₃₉ H ₅₀ O ₁₉)	823.30191	677.22 531.17 369.23 313.20	N/A
Desmethyl carbodenafil (C ₂₃ H ₃₀ N ₆ O ₃)	439.24522	339.26 311.13	311.25	Gendenafil (C ₁₉ H ₂₂ N ₄ O ₃)	355.17647	327.21 285.23 313.22 298.11	257.14 268.15 242.15 166.03

							216.07 121.04
Dimethylacetildenafil (C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₃)	467.27652	339.18 410.22 449.27 353.18 408.20 382.23 325.21	311.13 282.12 296.21	Genistein (C ₁₅ H ₁₀ O ₅)	271.0601	153.05 253.04 243.11 215.15 149.05 144.90 187.12	N/A
Dimethylsildenafil (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S)	489.22785	377.13 432.17 311.15 283.12 472.20 329.25 405.28	331.09 312.16 341.11 349.18 359.12 284.24	Homosildenafil (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S)	489.22785	461.20 377.13 311.15 283.10 177.08	331.14 312.22 349.18 341.23 359.33 285.31 299.32 377.51
Dioxohongdenafil (C ₂₅ H ₃₀ N ₆ O ₅)	495.23504	467.22 313.18 452.27 477.29 331.13 285.12 166.10 183.01 154.97	285.20 182.98 439.35 353.26 154.97 424.38	Hydroxyacetildenafil (C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₄)	483.27143	465.26 353.16 339.14 439.37 396.41	437.41 339.27 367.27 447.34 394.29 311.15 297.20 325.33
Hydroxychlorodenafil (C ₁₉ H ₂₃ ClN ₄ O ₃)	391.15314	363.20 285.16 313.23 355.26 148.95 327.23	285.16 327.18 345.16 314.29	N-Butyl tadalafil (C ₂₅ H ₂₅ N ₃ O ₄)	432.19178	310.15 262.11 250.12 135.04	282.16 169.08 197.07
Hydroxyhomosildenafil (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₅ S)	505.22277	487.29 461.22 377.29	377.13 423.25 423.36 392.20 311.22 283.23 444.30 418.36	N-Desmethyl acetildenafil (C ₂₃ H ₃₀ N ₆ O ₃)	439.24522	339.21 353.17 355.20 421.29 396.25 325.13 313.34 297.19	311.23 296.25 282.26
Hydroxythiohomosildenafil (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S ₂)	521.19992	503.19 461.20 477.17	354.24 419.25 324.24 341.14 291.18 309.20 393.26	N-Desmethyl sildenafil (C ₂₁ H ₂₈ N ₆ O ₄ S)	461.19655	313.17 377.13 283.12 299.19 329.25 347.19	285.13 270.21 256.09
Hydroxythiovaridenafil (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S ₂)	521.19992	503.26 477.22 393.16 315.10 461.29	393.15 354.23 328.22 408.20	N-Desethyl varidenafil (C ₂₁ H ₂₈ N ₆ O ₄ S)	461.19655	299.11 312.16 151.09 376.11 284.13	299.18 230.09 269.99 150.89

		299.08 328.26 491.30				329.28	
Hydroxy vardenafil (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₅ S)	505.22277	487.21 377.13 299.15 312.16 461.42 418.25 151.09	377.24 312.24 392.20 404.21 151.02 418.27	N-Ethyl tadalafil (C ₂₃ H ₂₁ N ₃ O ₄)	404.16048	282.16 262.12 250.11 135.00 302.13	254.10 169.00 197.01
Icariin (C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅)	677.244	531.20 369.14 313.03	369.14 313.03	Nitrodenafil (C ₁₇ H ₁₉ N ₅ O ₄)	358.15098	330.26 284.15 256.15 312.22	284.15 313.13 256.12
Icaritin (C ₂₁ H ₂₀ O ₆)	369.13326	313.12	243.06 298.13 187.02 215.10 134.96	N-Octyl-nortadalafil (C ₂₉ H ₃₃ N ₃ O ₄)	488.25438	366.22 262.09 250.08 302.07	338.22 169.08 197.08
Imidazosagatriazinone (Desulfovardenafil) (C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₂)	313.1659	285.24 256.19	256.13 268.13 241.15 216.04 166.01	Nor-acetildenafil (C ₂₄ H ₃₂ N ₆ O ₃)	453.26087	353.16 435.25 396.20 325.13 341.26 297.22	325.13 296.10
Norneosildenafil (C ₂₂ H ₂₉ N ₅ O ₄ S)	460.2013	311.15 283.12 329.16 377.13 432.17 299.11	283.12 269.14	Piperiacetildenafil (C ₂₄ H ₃₁ N ₅ O ₃)	438.24997	353.20 408.30 420.40 325.15 341.27 297.14 251.26	325.08 309.29 281.41
Norneovardenafil (C ₁₈ H ₂₀ N ₄ O ₄)	357.15573	329.13 151.09 285.14 169.12 189.12 300.09	285.19 151.03 301.19 311.25 260.17 169.14	Propoxyphenyl sildenafil (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S)	489.22785	283.14 447.21 299.11 347.02 325.15 391.18 163.01	255.24 241.25 228.26
Nortadalafil (C ₂₁ H ₁₇ N ₃ O ₄)	376.12918	254.08 262.22 250.21	226.10 169.08 197.07	Pseudovardenafil (C ₂₂ H ₂₉ N ₅ O ₄ S)	460.2013	151.09 299.11 312.16 284.13 329.16 432.17 377.13 349.22 256.17 169.12	230.06 199.03 88.01 270.07
O-Desethyl sildenafil (sildenafil impurity C)	447.1809	347.00 299.11	299.11 283.15	Pyrazole N- Desmethyl sildenafil	461.19655	297.14 363.11	269.10 255.16

(C ₂₀ H ₂₆ N ₆ O ₄ S)		283.15 383.37		(C ₂₁ H ₂₈ N ₆ O ₄ S)		269.10 163.05 285.24	241.22
Oxohongdenafil (C ₂₅ H ₃₂ N ₆ O ₄)	481.25578	453.30 410.22 355.19 396.26 382.27 435.43	410.18 435.33 396.24 382.19 355.19 425.37	Scutellarin (C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂)	463.0871	287.02	269.18 241.16
Papaverine (C ₂₀ H ₂₁ NO ₄ • HCl)	340.15433	202.08 325.18 171.06 296.28 310.20	171.06 187.14 175.08 142.07 147.15 161.00	Sildenafil Amine HCl (C ₈ H ₁₄ N ₄ O • HCl)	183.12404	166.1	N/A
Phentolamine mesylate (C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O • CH ₃ SO ₃ H)	282.16009	212.14 239.17 265.25	118.01 120.05 184.15 197.11 90.98 93.00 210.24	Sildenafil analogue (Propoxyphenyl- aildenafil) (C ₂₄ H ₃₄ N ₆ O ₄ S)	503.2435	391.19 283.16 299.14 347.03 461.29 446.27 325.20 446.23 486.21	349.09 331.07 326.22 284.15
Sildenafil analogue I (Propoxyphenyl- thiohydroxyhomosildenafil) (C ₂₄ H ₃₄ N ₆ O ₄ S ₂)	535.21557	517.33 475.32 491.30 359.21 343.21	341.17 325.14 368.23 475.19 433.28 309.23 389.15 407.30	Sildenafil dimer impurity [M+H] ⁺ (C ₃₈ H ₄₆ N ₁₀ O ₈ S ₂)	835.30143	489.26 461.32 807.33 671.32 327.17 377.25 283.23	461.32 311.18 377.25 407.17 341.32
Sildenafil analogue III (Propoxyphenyl- thioaildenafil) (C ₂₄ H ₃₄ N ₆ O ₃ S ₂)	519.22066	407.18 299.11 341.16 363.10 477.20 462.25 315.17	365.11 347.11 389.14 300.09 342.19	Sildenafil 2nd Step impurity (C ₂₁ H ₂₉ N ₅ O ₆ S)	480.19113	393.12 462.18 311.15 418.15	365.09 284.13 256.09
Sildenafil chlorosulfonyl ^a (C ₁₇ H ₁₉ ClN ₄ O ₄ S)	411.08883	311.15 383.06 283.12	199.06	Sildenafil impurity A (isobutyl sildenafil) (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S)	489.22785	325.20 391.30 297.25 343.23 163.98 311.31 405.33 461.25	297.14 283.16 310.19
Sildenafil citrate (C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₄ S • C ₆ H ₅ O ₇)	475.2122	311.12 377.15 283.12 299.22 162.96 447.25 329.29	283.18 269.28	Tadalafil (C ₂₂ H ₁₉ N ₃ O ₄)	390.14483	268.09 262.07 250.14 134.90 240.16	240.11 169.08 197.07

Sildenafil coupled (C ₁₇ H ₂₂ N ₄ O ₃)	331.17647	314.15 149.06 288.17 120.86 130.96 302.22	131.05 286.12 149.06 296.26 192.08 121.06	Tadalafil impurity A (C ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₃)	350.14992	264.10 333.12 321.07 290.08 250.09 276.19 302.24 201.19	234.09 206.10 179.99
Sildenafil-d ₈ (internal standard) (C ₂₂ H ₂₂ D ₈ N ₆ O ₄ S)	483.26241	311.15 378.13 283.12 171.10 455.23 482.32 330.25	283.12 199.05	Tadalafil impurity B (C ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₃)	350.14992	264.10 333.12 321.07 290.08 250.09 276.19 302.24 201.19	234.09 206.10 179.99
Sildenafil dimer impurity [M+2H] ²⁺ (C ₃₈ H ₄₆ N ₁₀ O ₈ S ₂)	418.15435	404.39 311.23 390.45 283.17 390.45	390.22 283.28 299.15 311.24 347.04 367.40 256.28	Tadalafil impurity C (C ₂₂ H ₂₀ ClN ₃ O ₄)	426.12151	395.08 276.10 333.12 369.09 262.14 252.18	135.04 245.05 302.08 367.21 377.28 273.10 169.08
Tadalafil impurity D (C ₂₂ H ₂₀ ClN ₃ O ₄)	426.12151	395.08 333.12 276.10 262.14 369.09	135.04 245.05 302.11 367.26 273.14 377.16 169.08	Udenafil (C ₂₅ H ₃₆ N ₆ O ₄ S)	517.25915	474.22 418.16 325.17 283.12 486.21 406.18 432.22 191.06 500.33	432.17 283.12 299.21 347.08 325.25 191.17 406.24 391.24
Thiodimethyl sildenafil (Dimethylthiosildenafil) (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₃ S ₂)	505.20501	393.10 327.14 448.13 299.12 488.17 471.30	347.06 357.08 328.13 375.09 365.20 301.28	Vardenafil HCL (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S • HCl)	489.22785	299.09 377.15 312.15 150.96 461.28 329.17 339.21 284.12	299.22 230.20 270.13 149.12 169.06
Thiohomosildenafil (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₃ S ₂)	505.20501	355.21 327.14 421.15 477.24 343.08 373.24 299.18 393.25	327.28 299.18 293.24 322.34	Wogonin (C ₁₆ H ₁₂ O ₅)	285.07575	270.09	252.04 242.12 224.09 182.24

Thiomethisosildenafil (Thioildenafil) (Sulfoildenafil) (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₃ S ₂)	505.20501	393.11 327.13 299.10 448.15 488.17 357.06	347.06 357.08 375.09 328.13 199.06	Yohimbine (C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₃ • HCl)	355.20217	212.08 143.98 224.10 294.15 313.94 134.14 338.30	194.09 133.96 162.00 180.00
Thiosildenafil (C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₃ S ₂)	491.18936	341.14 407.12 313.11 329.15 377.07	313.11 285.12				

^a Prepared in acetonitrile instead of methanol (see section 4.3.2 of publication).

5. Analyse des cannabinoïdes

L'étude présentée dans le chapitre 5, qui sera publié en Mars 2015 dans *LCGC & Spectroscopy-Current Trends in Mass Spectrometry*, portes sur le développement d'une méthode étant en mesure de simultanément analyser 20 cannabinoïdes synthétiques et 4 cannabinoïdes naturels qui sont suspectés d'être présent dans des échantillons illégaux.

Le rôle des auteurs est le même que pour le 1^{er} article du chapitre 4.

Rapid determination of 24 synthetic and natural cannabinoids for LC-MS/MS screening in natural products and drug inspection applications

Philippe Lebel, Karen C. Waldron, Alexandra Furtos

Department of Chemistry, Université de Montréal, C.P. 6128, succ. Centre-ville, Montréal QC H3C 3J7 Canada

P. Lebel, A. Furtos, K.C. Waldron, *LCGC & Spectroscopy-Current Trends in Mass Spectrometry*. in press (2015)

Correspondence author:

Alexandra Furtos

Department of Chemistry

Université de Montréal

C.P. 6128, succ. Centre-ville

Montréal, QC, H3C 3J7 Canada

Keywords: Synthetic cannabinoids; LC-MS; adulterated samples; illicit drugs; Spice

5.1 Abstract

Marijuana, the common or slang term for cannabis in its herbal form, is one of the most widely used illicit drugs in the world. Synthetic cannabinoids have similar psychotropic effects to the natural ones and are rapidly integrated by the illicit market. To deal with their expanding number and diversity, a targeted/untargeted LC-MS/MS screening method was developed allowing simultaneous analysis of 24 synthetic and natural cannabinoids in 8 min for a wide variety of samples such as herbal smoking mixtures, incense sticks, serums and Cannabis plant material. The separation was achieved using 2.6 μm diameter fused-core C_{18} particles in a 100×2.1 mm column coupled to an orbitrap mass spectrometer. Detection limits were in the sub ng/mL range and intra- and inter-assay precisions were below 10%. Recovery from real samples ranged from 92 to 110%. Our approach was applied to 11 seized samples and the results were in perfect agreement with those obtained by conventional methods. The particular advantage of our LC-MS/MS method is that the full scan event in the mass spectrometric acquisition provides accurate masses for all detected species and thus allows post-analysis identification of initially untargeted compounds.

5.2 Introduction

The primary psychoactive compound in cannabis is Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), which exerts its activity by interacting with the CB1 and CB2 cannabinoid receptors in the brain. Synthetic analogs of THC, when smoked or orally ingested, can mimic the psychotropic effects of cannabis by binding the same receptors [57]. Cannabimimetic compounds can be found in herbal mixtures (incense stick, cigarette, Spice, K2, etc.), serums and other matrices, often with no indication of their presence. The European monitoring center for drugs and drug addiction reported in 2009 [18] that Spice products [58] were generally used by teenagers and young adults because it enabled them to pass drug-screening tests. Many governments have taken legal action to control specific synthetic cannabinoids. In the United States, they have been listed as Schedule I drugs on the Controlled Substances Act, and in Canada as Schedule II drugs. However, small structural modifications from the controlled substance result in new analogs being legal. Therefore, in May 2012 the US amended the Act and proposed a bill to place all cannabimimetic agents on Schedule I [59,60].

Given the structural similarities between THC and its synthetic analogs, identification of the compounds in seized samples is a continuous challenge for government agencies. As quickly as analogs are added to controlled substance lists, new ones are synthesized making their monitoring a moving target [20,61-63]. These new generation analogs are obviously not present in mass spectrometry or/and UV spectra libraries, therefore, routine methods for screening cannabimimetics in both products and biofluids rapidly become less effective.

The most common methods of cannabinoid analysis use GC-MS [64,65] and LC-MS [63,66-68]. GC-MS approaches use MS spectra of known cannabinoids for identification while most LC-MS approaches are employed in MRM mode. Both are targeted methods, limited to screening known species and therefore always one step behind in the monitoring of this dynamic designer drug market. To address this shortcoming, we report here a targeted/untargeted high resolution MS approach to screen a variety of samples for cannabinoid-like compounds. The current method includes a high resolution, non-target scan

that allows identification of all species if present in the sample and targets a selection of 20 synthetic and 4 natural cannabinoids (Figure 5.1).

5.3 Experimental

5.3.1 Reagents and Standards

LC-MS grade methanol and acetonitrile were from J.T. Baker (TekniScience, Canada) and LC-MS grade formic acid (98%) was from Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). HPLC grade water from a Milli-Q Reference A+ system (Fisher Scientific, Canada) was used to prepare all aqueous solutions and mobile phases.

A total of 24 standards were investigated. JWH-018 and JWH-210 were obtained from Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, Canada). AKB48 N-(5-Fluoropentyl) analog, AM-694 , AM-694 3-iodo isomer , AM-1220 , AM-2201 , AM-2201 2'-naphthyl isomer, AM-2201 N-(4-fluoropentyl) isomer, CP 47,497 , (±)-CP 47,497-C8-homolog, (±)-epi CP 47,497-C8-homolog, (±) 3- epi CP 47,497-C8-homolog, JWH-019, JWH-073, JWH-081, JWH-122, JWH-200, JWH-250 and STS-135 were obtained from Cayman chemical (Burlington, Canada). Delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabinal were purchased from Alltech (Deerfield, IL). Cannabidiol was purchased from Lipomed (Cambridge, MA) and cannabigerol was purchased from THC PHARM (Frankfurt, Germany).

Stock solutions of individual standards were prepared separately in 10 mL volumetric flasks at an approximate concentration of 100 µg/mL in methanol. Diluted stock solutions (100 ng/mL to 1 µg/mL) were directly infused into the mass spectrometer for adjustment of the experimental parameters for each analyte. A standard mixture of the 24 components was also prepared and injected in order to adjust the chromatographic separation of all analogs.

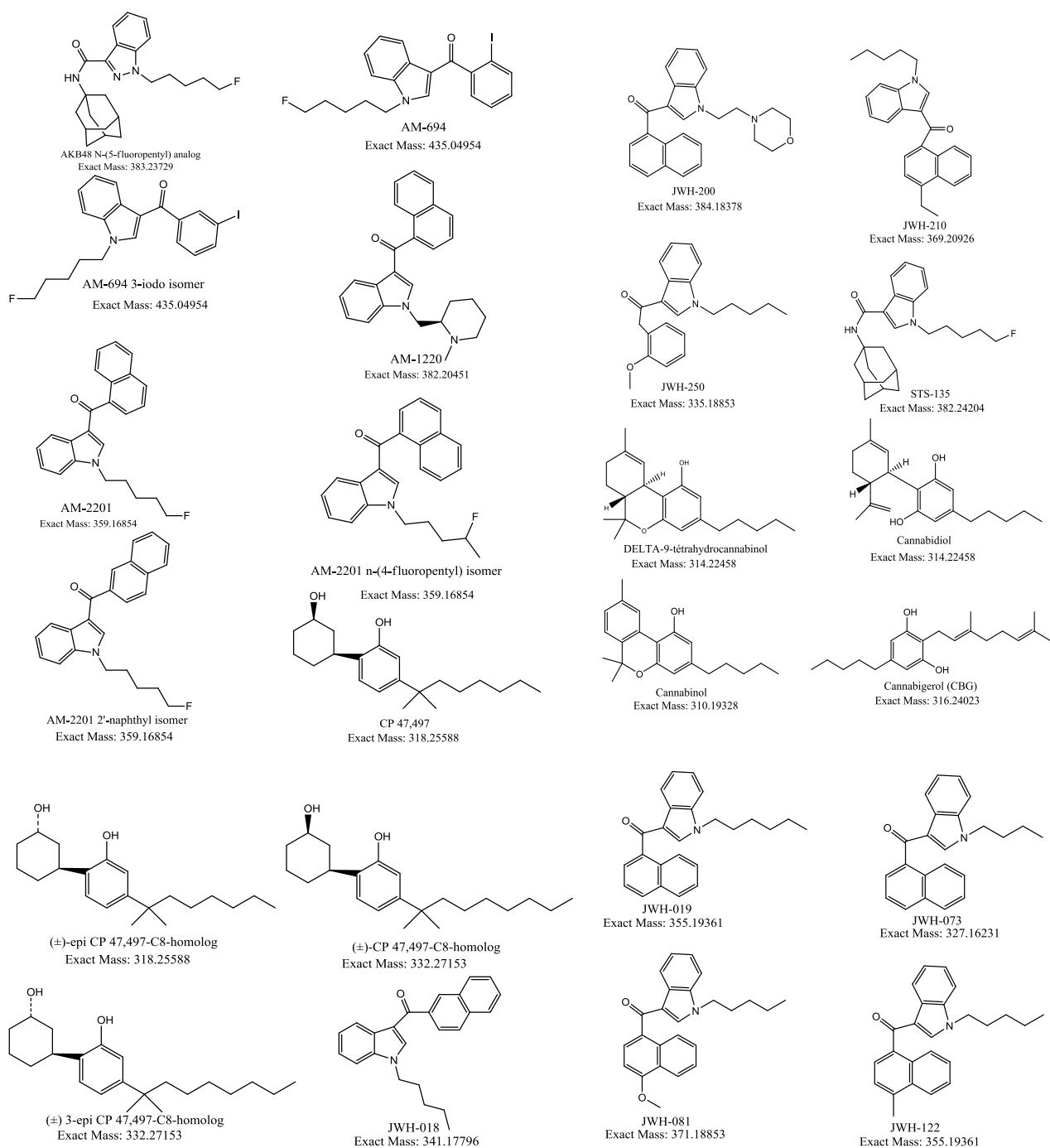


Figure 5.1. Chemical structures and accurate masses of the 24 synthetic and natural cannabinoids investigated.

5.3.2 Sample preparation

Ten seized samples and a cannabis sample were analysed to determine the effectiveness and robustness of the LC-MS/MS method. The samples were present in two forms: tablets and herbal products (incense stick, cigarette and a cannabis plant). They were finely ground then aliquots of 5 to 10 mg of the resulting powder were transferred to 10 mL volumetric flasks and dissolved in a mixture methanol:water:acetonitrile (70:20:10) containing 1% formic acid. Following this, the solutions were vortexed for 2 min, sonicated for 10 min and vortexed again for 3 min. The supernatant was filtered through a 0.45 μm pore polytetrafluoroethylene (PTFE) syringe filter (Phenomenex, Torrance, CA). Herbal samples required an additional centrifugation step at 3500 rpm for 10 min to avoid mass overloading of the syringe filter. Filtrates were diluted 10 to 100-fold in water:acetonitrile (80:20), the initial mobile phase, before injection.

5.3.3 LC-MS/MS operating conditions

Data were acquired on an LTQ Orbitrap XL coupled to an Acella HPLC system (Thermo Scientific, San Jose, CA). Xcalibur 2.1 and Thermo LTQ Tune Plus 2.5.5 software [51] were used to control the system and process the data. External mass calibration was used throughout the project. Four different analytical columns were initially tested for their chromatographic performance: an XTerra C₁₈ (100 \times 2.1 mm, 3.5 μm particles) and an Acquity BEH C₁₈ (100 \times 2.1 mm, 1.7 μm), both from Waters (Mississauga, Canada), a Kinetex C₁₈ (75 \times 2.1 mm, 2.6 μm) from Phenomenex (Torrance, CA), and an Accucore aQ C₁₈ (100 \times 2.1 mm, 2.6 μm) from Thermo Scientific (San Jose, CA). Two eluent systems were tested during method development, water-methanol and water-acetonitrile, both containing 0.1% formic acid, under generic gradient conditions (5 to 95% organic).

Optimized separations were carried out using the Accucore aQ column coupled to a Phenomenex C₁₈ guard column (4 mm \times 2.0 mm), both maintained at 40°C, and the water-acetonitrile gradient. The auto-sampler temperature was set at 10°C to avoid sample degradation. Eluents consisted of 0.1% formic acid in water (eluent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (eluent B), and the initial mobile phase contained 20% B. The following

gradient elution was applied at a flow rate of 350 $\mu\text{L}/\text{min}$: 20 to 58% B over 1 min, held at 58% B for 1 min, increased to 85% B over 1 min, then held at 85% B for 2 min. Eluent B was then returned to 20% B over 0.2 min. The system was allowed to re-equilibrate for 2.8 min, giving a total cycle time of 8.0 min. The injection volume was 3 to 5 μL . A needle wash step using methanol:water:acetonitrile (70:20:10) was included in the method. A 5 μL blank, consisting of the initial mobile phase, was injected after each sample to monitor and reduce any potential carryover.

The electrospray interface was operated in positive ion mode. Nitrogen was used as both sheath gas and auxiliary gas while helium was used as collision gas. Using direct infusion, instrumental parameters were adjusted semi-automatically for every analyte using the tune tool in the LTQ Tune Plus software. All analytes generally behaved the same for their parent ion due to the similar structures and polarities. After screening every compound individually, the experimental parameters of the full scan event found to be suitable for all of them were set to the following values: sheath and auxiliary gas at flow rates of 44 and 17 (instrument units) respectively; spray voltage, +3500 V; capillary temperature, 310°C; capillary voltage, 28 V; tube lens, 101. The MS^2 and MS^3 transitions for every compound were also determined using the tune tool by varying the normalised collision energy. They ranged between 25 and 33% once optimized. Therefore, a three-step collision energy function set at 25, 30 and 35% was used to perform average fragmentation on every compound. The ion transitions MS^2 and MS^3 for each standard are shown in Table 5.1, where the MS^3 transitions arise from the MS^2 value shown in boldface type. Mass spectra were acquired from m/z 50 to 1000 using two scan events: the first was an FTMS full scan for accurate mass detection and the second was a data dependent step with MS/MS acquired only for precursors from the parent mass list with a dynamic exclusion of 10 s. Every standard was then injected onto the column individually to determine its retention time and confirm the parent ion accurate mass, MS^2 and MS^3 . To determine if there were any interactions between the compounds, a mixture of the 24 standards was injected.

Table 5.1: Accurate mass, MS2 and MS3 (arising from MS2 in boldface type) of the 24 synthetic and natural cannabinoids

Standard name (molecular formula)	[M+H]⁺ (m/z)	MS² (m/z)	MS³ (m/z)
AKB48 N-(5-fluoropentyl) analog (C ₂₃ H ₃₀ FN ₃ O)	384.245	134.97	N/A
AM-694 (C ₂₀ H ₁₉ FINO)	436.057	230.93 309.25 234.11	202.99 93.96
AM-694 3-iodo isomer (C ₂₀ H ₁₉ FINO)	436.057	230.95 202.96	202.96 220.89 94.06
AM-1220 (C ₂₆ H ₂₆ N ₂ O)	383.212	286.20 154.99 112.00	154.96 157.97 127.00
AM-2201 (C ₂₄ H ₂₂ FNO)	360.176	155.00 232.12 126.92	144.05 212.11 176.16
AM-2201 2'naphthyl isomer (C ₂₄ H ₂₂ FNO)	360.176	154.98 232.18 126.87	143.93 176.28
AM-2201 N-(4-fluoropentyl) isomer (C ₂₄ H ₂₂ FNO)	360.176	155.01 232.15 340.27	212.12 144.05 176.01
CP 47,497 – H ₂ O (C ₂₁ H ₃₂ O)	301.253	175.07 261.23	233.21
(±)-CP 47, 497-C8-homolog – H ₂ O (C ₂₂ H ₃₄ O)	315.268	175.11 241.23	N/A
(±)-epi CP 47, 497-C8-homolog – H ₂ O (C ₂₁ H ₃₂ O)	301.253	175.06 261.22	N/A

(±) 3-epi CP 47, 497-C8-homolog – H ₂ O (C ₂₂ H ₃₄ O)	315.268	175.11 241.23	N/A
JWH-018 (C ₂₄ H ₂₃ NO)	342.185	154.89 214.08 126.92	143.89 157.98
JWH-019 (C ₂₅ H ₂₅ NO)	356.201	154.91 228.10 126.94	143.92 157.93 129.96
JWH-073 (C ₂₃ H ₂₁ NO)	328.17	154.92 200.05 126.91	143.92 158.04
JWH-081 (C ₂₅ H ₂₅ NO ₂)	372.196	185.06 214.12 157.06	144.04 158.06 200.07
JWH-122 (C ₂₅ H ₂₅ NO)	356.201	168.98 214.07 140.95	143.88 158.00
JWH-200 (C ₂₅ H ₂₄ N ₂ O ₂)	385.191	155.05 298.12 127.05	268.11 283.10 200.08
JWH-210 (C ₂₆ H ₂₇ NO)	370.217	182.99 214.09 155.00	143.93 158.01 116.01
JWH-250 (C ₂₂ H ₂₅ NO ₂)	336.196	120.91 188.06 131.87	131.99 117.91
STS-135 (C ₂₄ H ₃₁ FN ₂ O)	383.249	232.12 135.02 206.12	143.94 212.13 158.07

Cannabidiol (CBD) (C ₂₁ H ₃₀ O ₂)	315.232	259.21	231.12
		193.06	217.06
		233.15	189.06
Cannabigerol (CBG) (C ₂₁ H ₃₂ O ₂)	317.248	193.10	122.90
		207.09	136.89
		261.24	
Cannabinol (CBN) (C ₂₁ H ₂₆ O ₂)	311.201	293.19	195.03
		223.10	208.02
		241.12	205.04
Delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ -9-THC) (C ₂₁ H ₃₀ O ₂)	315.232	259.18	231.08
		193.07	217.16
		233.13	189.00

5.4 Results and Discussion

5.4.1 Method development and validation

As seen in Figure 5.1, many of the 24 compounds have similar structures and this makes the chromatographic separation challenging. Between the mobile phases tested, the acetonitrile gradient gave better selectivity. Amongst the four columns, the Accucore aQ and Acquity BEH C₁₈ generated similar results and exhibited high efficiency and selectivity for the 24 compounds of interest. The Accucore aQ showed a slightly stronger retention of early eluting analytes and was therefore chosen.

Selectivity was further enhanced by coupling the optimized chromatographic method to the high mass resolution Orbitrap XL mass spectrometer. By individual direct infusion of the standards, the final optimized parameters for full scan detection (values presented in the LC-MS/MS operating conditions section) were selected to provide appropriate sensitivity for all 24 components in a single analysis. The mass accuracy across the whole study was within 3 ppm.

When operating the Orbitrap at a resolution of 30,000, approximately 1.5 scans (points) per second were obtained for the mixture containing 24 standards analysed simultaneously. This acquisition scan speed was well suited for the narrow peaks (5-8 s wide) produced by the fused-core particle chromatography and allowed a very reliable quantification and improved method sensitivity. The well selected parent-fragment transitions helped to enhance the method selectivity. As seen in Figure 5.2 (spread across 3 panels for ease of peak identification), it was possible to positively identify 24 cannabinoids by differentiating them with a combination of accurate mass, retention time and fragmentation pattern (MS^2). For example, AM-2201 and AM-2201 N-(4-fluoropentyl) have the same accurate mass and retention time and very similar fragmentation patterns, as shown in Figure 5.3. However, a signal at m/z 340, generated by the loss of fluorine from a secondary carbon, is only present in the MS^2 of AM-2201 N-(4-fluoropentyl) and allows distinction between the two. Similarly, JWH-019 and JWH-122 elute within 0.05 min of each other and have the same accurate mass. Without re-injecting, they could be identified by their completely different MS^2 fragmentation patterns (Figure 5.4). The MS^3 data were acquired but not actually needed for the screening method. In the eventuality of samples with a new analog of identical parent ion mass, retention time and MS^2 , the MS^3 data are available for identification.

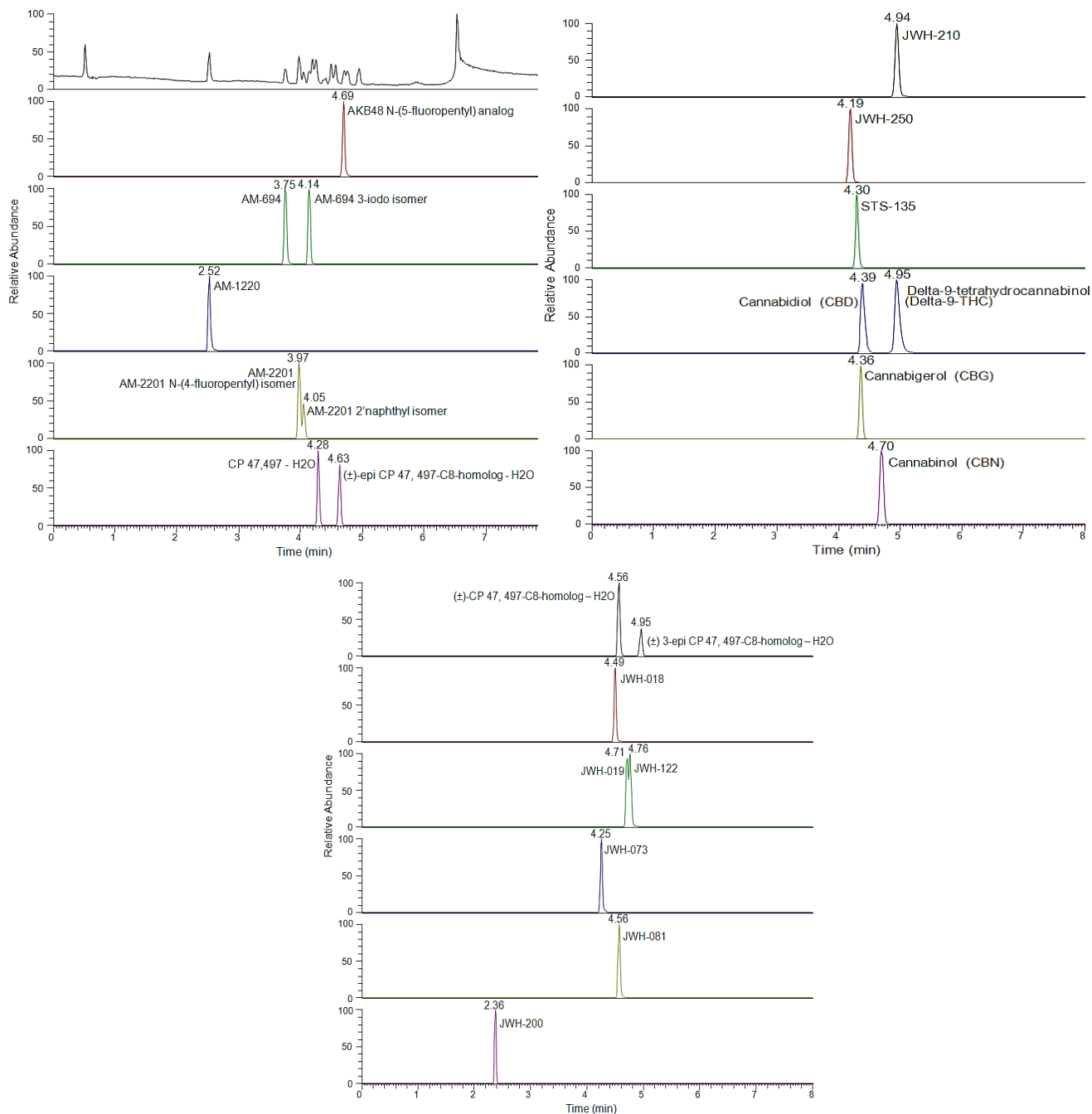


Figure 5.2. Typical chromatograms obtained by LC-MS/MS in positive electrospray mode for a mixture containing all 24 analytes. The upper trace of the first panel represents the total ion chromatogram [53], followed by the extracted ion chromatograms of all the compounds spread over 3 panels for ease of presentation (parent ions shown).

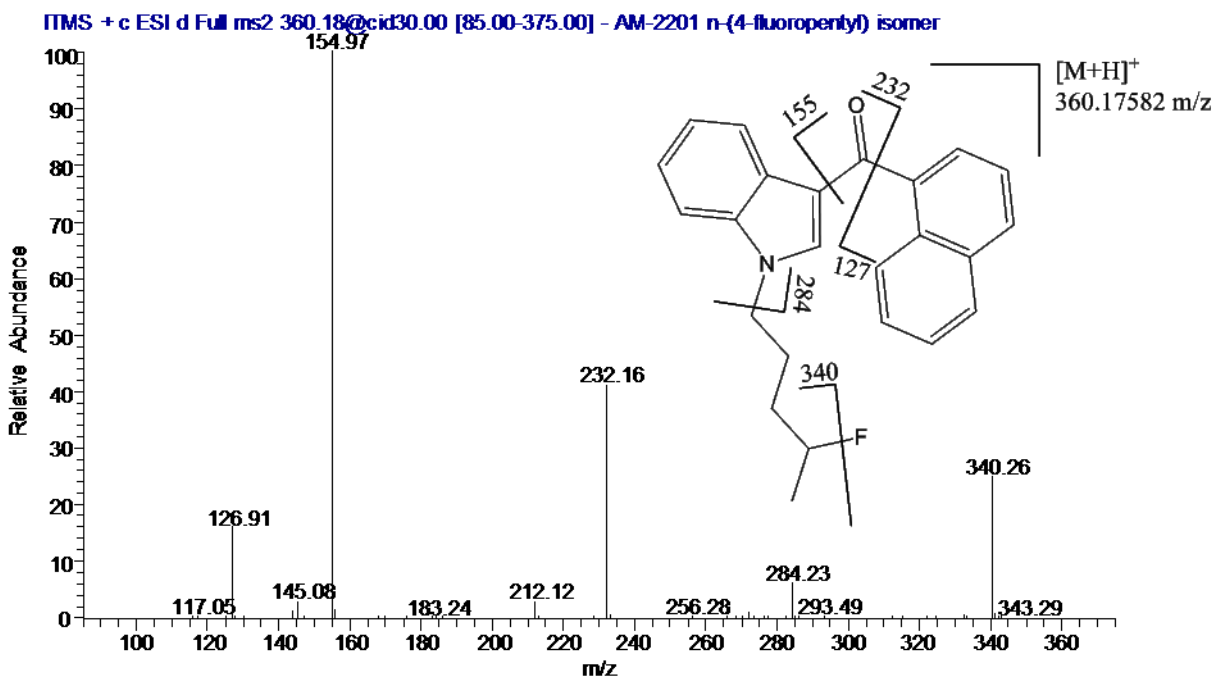
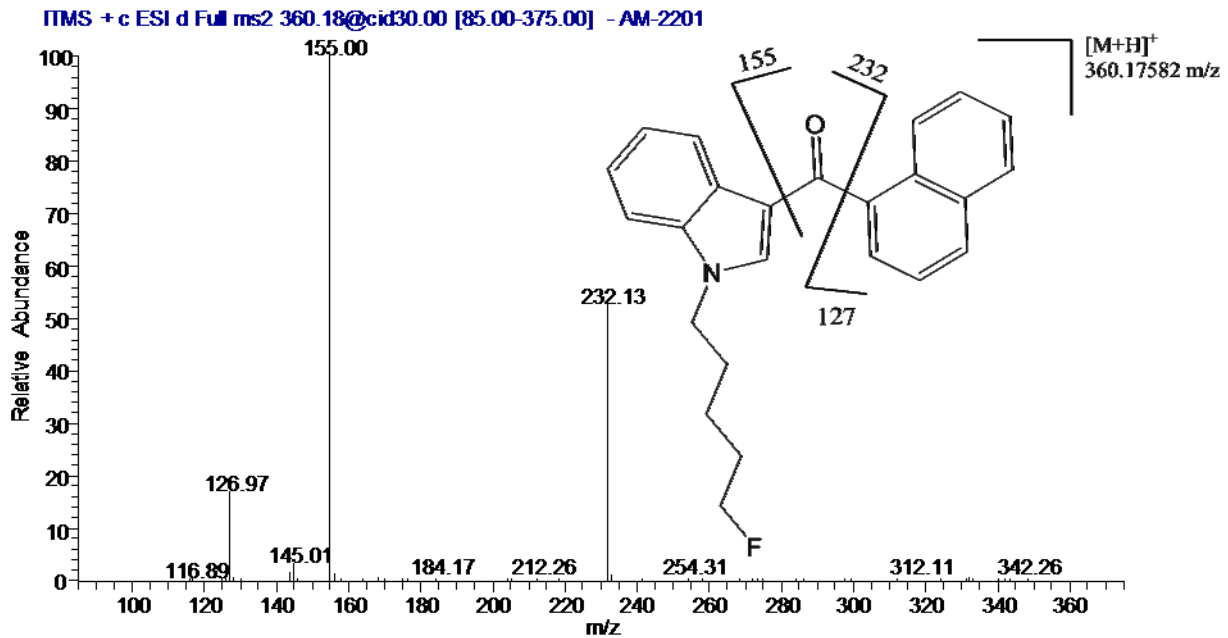


Figure 5.3. Fragmentation pattern of two isomers: AM-2201 (upper pane) and AM-2201 N-(4-fluoropentyl) isomer (lower pane).

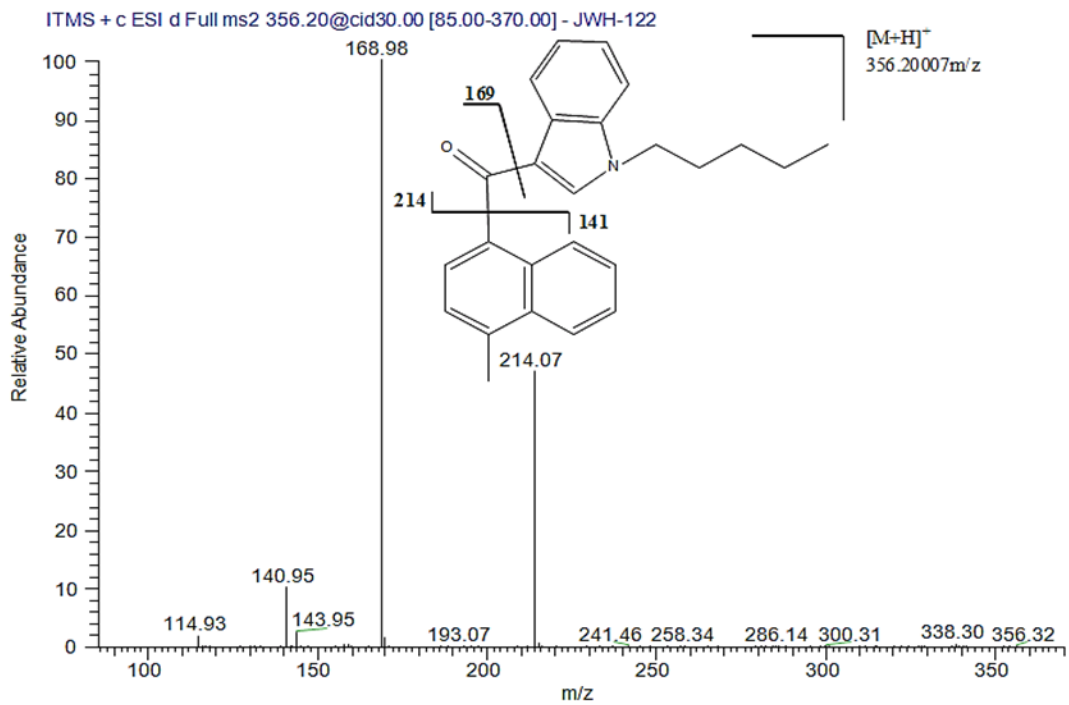
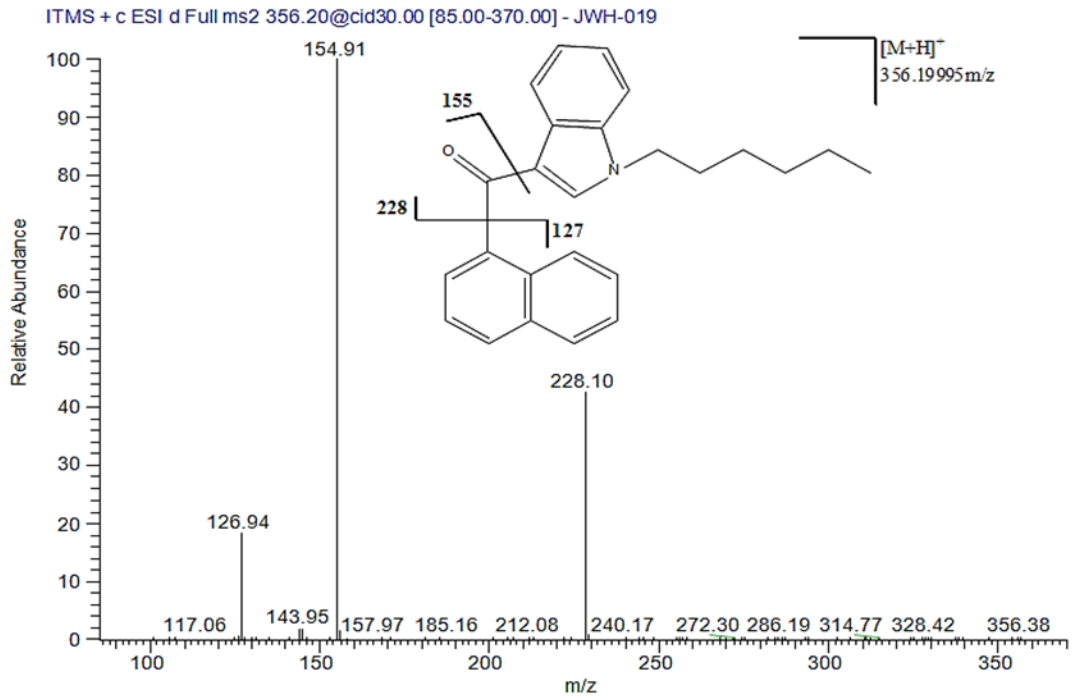


Figure 5.4. Fragmentation pattern of two isomers: JWH-019 (upper pane) and JWH-122 (lower pane).

Matrix effects were evaluated in four samples (tablet and herbal based) spiked with the 24 analytes prior to extraction. A comparison of the chromatograms to that of the standard mixture revealed no difference in peak areas for the 24 analytes. To evaluate carry-over, blanks injected after samples were used. No carry-over was detected at analyte concentrations below 50 ng/mL whereas most compounds presented 0.1-0.3% carry-over at 250 ng/mL and 0.4-1.0% at 1000 ng/mL. Therefore, we suggest that two blank injections be used between samples at high concentration. The linearity of 15 compounds, selected to be representative of the 24, spiked into an herbal matrix, was evaluated across a concentration range of 0.01 to 1000 ng/mL (n=21)¹. Linear regression was applied by plotting the peak area responses of each compound as a function of its respective concentration and applying a 1/X weighting factor. Calibration curve correlation coefficients (r^2) ranged between 0.996 and 0.999. Detection limits (calculated at signal/noise ratio of 3) were between 0.03 and 0.61 ng/mL for all but one compound regardless of the presence of matrix; the LOD for (\pm) 3-epi-CP 47,497-C8-homolog was 1.52 ng/mL.

It was important to develop a simple and economical extraction method that was also fast and effective with good recovery to complement the rapid LC-MS/MS separation. For 12 cannabinoids, selected to be representative of the 24, recoveries ranged between 92-110% across three concentrations (50, 250 and 1000 ng/mL)¹.

The precision and accuracy of the method were evaluated for 10 representative compounds at 50, 250 and 1000 ng/mL². Each concentration level was prepared in five replicates by spiking the appropriate amount of analyte standard into a matrix (tablet or herbal based) and each sample was injected five times. Intra-assay precision ranged from 1.2 - 4.0 % RSD across the three concentration levels. The procedure was repeated the following week to determine the inter-assay precision, which ranged from 2.9 – 9.7 % RSD. Even though only ten compounds

¹ Results are shown in Table 5.2 of the supporting information.

² Results are shown in Table 5.3 of the supporting information.

were spiked for method validation, all 24 were injected numerous times individually, and together, during the method development with no significant changes (i.e., within repeatability error) in peak areas and retention times. For example, after 25 injections of standard AM-694 (five replicates for each of five different samples), essentially no change in retention time (0.09 % RSD intra-assay and inter-assay,) and only a very small change in peak area (1.7 % RSD) was observed. The same results were obtained for the other compounds (data not shown). The method accuracy, determined by comparing the calculated concentration with the true value spiked into the matrix was within 10% for all 10 compounds at all concentrations tested.

5.4.2 Application to the analysis of seized samples

A total of 11 seized samples (four incense sticks, two cigarettes, three herbal samples, one cannabis sample and one tablet), all from non-registered sources, were analysed with our rapid LC-MS/MS screening method. Seven were found to be positive for cannabinoids. In one of the incense sticks, two synthetic cannabinoids were detected: JWH-018 at 4.48 min and JWH-073 at 4.24 min, as shown in Figure 5.5. These two synthetic analogs are controlled substances and, as highlighted in the introduction, their presence in these products is illegal. The incense sticks were therefore designated for withdrawal from distribution.

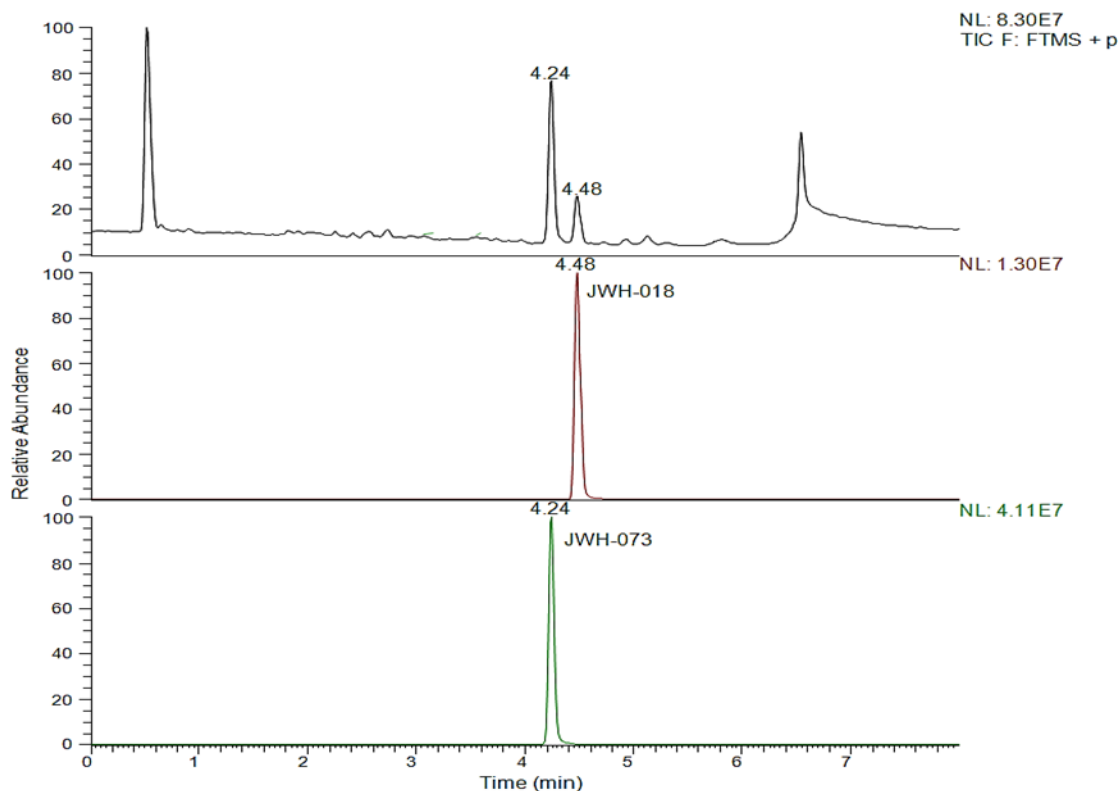


Figure 5.5. Illegal product (incense stick) showing the presence of controlled synthetic cannabinoids: JWH-018 and JWH-073. The uppermost panel represents the TIC and the lower two extracted chromatograms showing detection of JWH-018 (middle panel) and JWH-073 (lower panel).

In the chromatographic separation of the cannabis plant sample (Figure 5.6), a number of endogenous cannabinoids were detected. THC, the main psychoactive compound, eluted at 4.93 min. Cannabigerol was detected at 4.36 min, and unlike THC, it does not mimic psychosis symptoms even though it interacts with the CB2 receptor in the brain [57]. Cannabidiol, identified at 4.48 min, is another natural cannabinoid that is highly abundant in cannabis, up to 40% in the plant extract; however, it is not psychoactive. Cannabinol, which also interacts with the CB2 receptor, is usually present at low concentrations in fresh cannabis samples but its abundance increases as it is formed by THC oxidative degradation by exposure to light and/or air [67]. It was identified at 4.69 min with an *ca.* 5-fold higher signal compared

to THC (Figure 5.6), which suggests that the cannabis sample had undergone extensive oxidation.

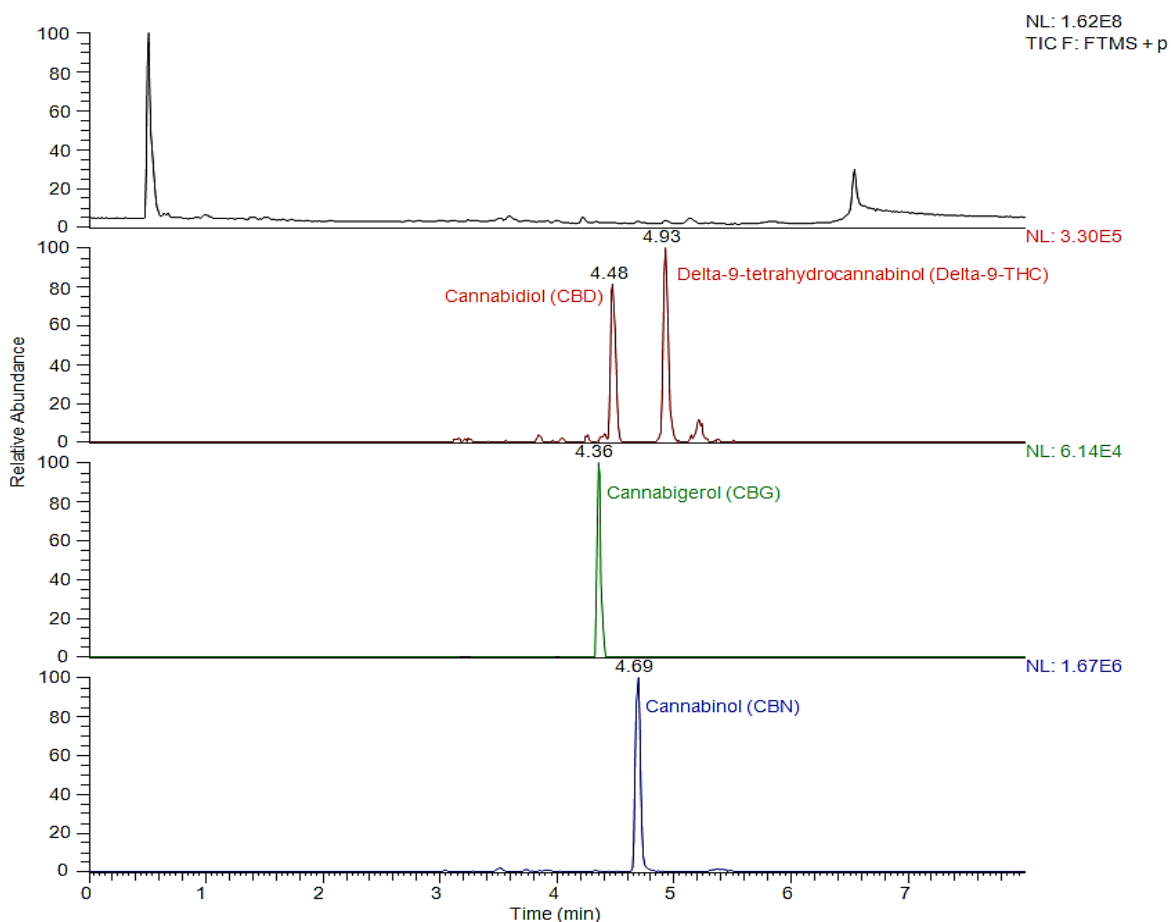


Figure 5.6. Cannabis sample showing the presence of THC, cannabidiol, cannabigerol and cannabinol. The uppermost panel represents the TIC. Extracted ion chromatograms (lower three panels) show detection of the four cannabinoid compounds.

The cannabis plant sample was previously analysed by validated TLC and GC-MS methods in a local government laboratory. The other samples in this study were previously analysed by two validated HPLC-PDA and GC-MS routine methods from the same government laboratory. The results obtained with the current rapid LC-MS/MS approach were in perfect agreement with the routine methods in that there were no false positive or false negative results; however, the new approach was 4 times faster than the validated HPLC-PDA method, was 6 times more rapid than the validated GC-MS method, and was more sensitive than both. Most cannabinoid

analysis methods screen for metabolites in biological samples (urine, blood, hair, etc.) because the parent compounds are rapidly metabolized. [65,69] For screening suspected adulterated herbal mixtures, identification of the parent drug is required. Several rapid LC-MS/MS methods for cannabinoid screening have been recently reported in which 15 to 20 parent compounds and, in some cases, over 20 metabolites have been separated in times ranging from 8 to 20 min [66,68,70]. The large majority of these are MRM (multiple reaction monitoring) based approaches, which means they are targeted and thus monitor only analogs predefined in the method; they are entirely inefficient for detecting new generation cannabinoid analogs.

5.5 Conclusion

The development of a rapid, selective and sensitive LC-MS/MS screening method for simultaneous identification of 24 synthetic and natural cannabinoids present in herbal smoking mixtures, incense sticks, and tablets matrices has been described. The high mass-resolution power of the Orbitrap XL and its compatibility with the high peak efficiency provided by fused-core particle chromatography contributed to the excellent selectivity of the method. Additional confidence in analyte identification for the 24 compounds targeted was provided by the fragmentation patterns. The novelty of this work lies in the high resolution full scan event in the acquisition method that allows post-analysis identification, in an untargeted approach, of additional species in the complex matrices. This is highly relevant to the current application because of the emergence of new generation cannabinoid analogs that try to be one step ahead of the controlled substances act. The need for such untargeted screening approaches is starting to be recognized by the analytical community as shown in recent reports by Scheidweiler et al. [69] and Shanks et al. [62]. Our rapid LC-MS/MS screening method has the potential to be an indispensable forensic analysis tool for identifying illegal drug substances and adulterated products.

5.6 Supporting information

In this section, supporting information is presented for Lebel *et al.* “Rapid determination of 24 synthetic and natural cannabinoids for LC-MS/MS screening in natural products and drug inspection applications”, to be published in *LCGC and Spectroscopy/ Current Trends in Mass*

Spectrometry. Quantitative method performance (LOD, LOQ, r^2 and recovery) was evaluated for this study and the results are shown in Table 5.2. Given the similarity in the structures of the 24 standards, a subset of 15, representative of the 24 masses and retention times, were chosen for the linearity, LOD and LOQ determinations across a concentration range of 0.01 to 1000 ng/mL spiked into real herbal or tablet matrix-blank samples. To evaluate recovery, three different concentrations (50, 250 and 1000 ng/mL) of the 12 standards present in Table 5.2 were spiked into the herbal, or tablet, matrix-blank samples in triplicate, before or after extraction. Next, the precision and accuracy of the LC-MS/MS method were evaluated rigorously for 10 standards (representative of the classes of compounds) spiked at three different levels (50, 250 and 1000 ng/mL) into herbal or tablet matrix-blank samples (Table 5.3). All quantification and recovery studies described in this section were repeated, at minimum, in triplicate.

Table 5.2. Quantitative method performance values for 15 synthetic and natural cannabinoids in an incense stick.

Analytes	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Correlation coefficient (r^2)	Sensitivity (mL/ng)	Mean Recovery (%)		
					50 ng/mL	250 ng/mL	1000 ng/mL
JWH-018	0.075	0.25	0.9976	177,662	94±6	104±6	102±2
JWH-019	0.030	0.10	0.9962	171,376	96±5	108±4	99.1±0.7
JWH-073	0.060	0.20	0.9964	90,728	104±5	101±3	101±2
JWH-081	0.075	0.25	0.9968	191,938	98±2	104±4	98±2
JWH-210	0.030	0.10	0.9985	199,643	97±3	104±4	100±1
JWH-250	0.075	0.25	0.9981	216,091	101±2	104.0±0.3	101±3
AM-694	0.060	0.20	0.9979	76,003	110±3	111±4	109±2
AM-1220	0.045	0.15	0.9990	116,733	110±3	102±2	100.5±0.7
AM-2201	0.060	0.20	0.9983	75,770	105±3	99±1	97±2
CP 47,497 (±) 3-epi	0.610	2.00	0.9980	3,955	99±2	102±5	102±2
CP 47,497- C8- homolog	1.520	5.00	0.9961	2,161	102±4	100±4	108±5
Cannabidio l	0.150	0.50	0.9989	24,737	N/D	N/D	N/D
Cannabinol	0.300	1.00	0.9980	17,170	N/D	N/D	N/D
CBG	0.450	1.50	0.9985	9,109	N/D	N/D	N/D
Δ9-THC	0.150	0.50	0.9990	33,985	92±3	97±1	92.7±0.2

Table 5.3. Intra-assay (n=5) precision and accuracy and inter-assay (n=10) precision for ten synthetic cannabinoids.

Analytes	Intra-assay (n=5)					
	Precision (% RSD)			Accuracy (% error)		
	50ng/ml	250ng/ml	1000ng/ml	50ng/ml	250ng/ml	1000ng/ml
JWH-018	3.2	1.9	4.0	6.0	7.6	6.6
JWH-081	3.7	2.2	3.7	8.4	8.0	5.5
JWH-019	3.8	1.2	3.3	10.0	9.0	4.2
JWH-210	2.1	2.2	3.6	9.8	6.8	4.7
AM-694	2.6	1.7	2.4	4.6	7.4	3.8
AM-1220	3.1	2.8	1.7	3.6	7.1	5.0
AM-2201	3.0	2.8	1.2	2.1	4.4	1.2
CP 47,497	2.9	1.3	2.9	6.3	9.5	5.0
(±) 3-epi CP 47,497-C8- homolog	2.6	2.5	2.7	6.6	3.6	3.0
Δ9-THC	2.6	2.3	2.4	6.0	3.1	2.4

Analytes	Inter-assay (n=10)		
	Precision (% RSD)		
	50ng/ml	250ng/ml	1000ng/ml
JWH-018	9.5	6.9	7.0
JWH-081	8.7	6.7	5.5
JWH-019	9.2	5.2	9.0
JWH-210	9.1	7.7	9.7
AM-694	6.6	2.6	3.1
AM-1220	5.2	3.4	2.9
AM-2201	8.1	4.8	3.1
CP 47,497	7.7	9.2	3.7
(±) 3-epi CP 47,497-C8- homolog	7.0	4.0	5.7
Δ9-THC	9.1	4.8	6.2

6. Conclusions

Les comprimés de médicaments illégaux contiennent parfois plus d'un ingrédient actif, des concentrations non contrôlées du/ou des ingrédients actifs et sont souvent conçus dans des environnements insalubres. Ainsi, ces médicaments lorsque consommés peuvent présenter un danger pour le consommateur. Comme mentionné dans l'introduction, l'avenue de la vente de médicaments par l'entremise de l'internet a été un point tournant dans la facilité de se procurer ces médicaments contrefaits. En effet, il est maintenant simple de commander des comprimés pour le dixième du prix et cela sans prescription. Les agences gouvernementales doivent donc analyser les comprimés saisis dans les aéroports, aux douanes ou par la poste qui sont suspectés. En 2009, les ventes de médicaments illégaux dépassaient les 34 millions de comprimés en deux mois. Or, il est bien évident qu'il est impossible d'analyser et de retirer tous ces comprimés du marché. Une grande quantité est tout de même analysée chaque année par les différentes agences gouvernementales. Le but principal des deux différents projets présentés dans ce travail était le développement de méthodes rapides, sensibles et sélectives pouvant analyser un nombre élevé de drogues contre la dysfonction érectile et de cannabinoïdes synthétiques et naturels et il a été atteint. En effet, deux différentes méthodes, soit une étant en mesure de distinguer 82 composés contre la dysfonction érectile en 10 min et la deuxième méthode étant en mesure de distinguer 24 cannabinoïdes en 8 min ont été développées. Le suivi de ces composés a été possible en raison de la séparation chromatographique à haute performance, mais aussi de la haute spécificité du spectromètre de masse et de la fragmentation en tandem. D'autres méthodes sont présentement utilisées pour l'analyse de ces médicaments, mais ces méthodes demandent un temps d'analyse plus long et ne couvrent pas un nombre aussi élevé d'analogues. En effet, les méthodes développées au cours de ces deux différents projets étaient deux à cinq fois plus rapides que les méthodes couramment utilisées. Par exemple, pour les médicaments traitant la dysfonction érectiles, Ren *et al.* [54] ont été en mesure de séparer 18 analytes ED et cela en 11 min. Par contre, leur limite de détection instrumentale était 100 fois supérieure à ce qui a été obtenue au cours de ce projet. Des limites de détection instrumentale équivalente à ceux obtenues dans les projets de ce mémoire ont été obtenues par le Conseil suprême de la santé du Qatar [55]. Par contre, leur méthode demandait plus de temps et analysait un nombre inférieur d'analytes ED, soit 32 composés en 15 min. Les méthodes d'extraction développées sont spécifiques au type de matrice analysé. En effet, différentes matrices ont été analysées au cours des projets présentés

dans ce mémoire, soit des tablettes, des préparations herbales, des gélules et des liquides. La quantification des drogues dans les échantillons n'était pas l'objectif principale, car lorsqu'un échantillon saisi contient soit un ED différent que celui réglementé ou un cannabinoïde contrôlé, il est considéré comme illégal. Selon les courbes d'étalonnage (tableaux 4.1, 5.2 et figure 3.6), la quantification des différents composés analysés au cours des deux projets est possible avec exactitude et précision.

Le couplage de la chromatographie liquide avec un spectromètre de masse en tandem a été en mesure d'analyser et de séparer tous les composés voulus au cours des différents projets et même d'identifier d'autres composés qui n'étaient pas initialement ciblés. La difficulté principale avec les composés contrefaits, comme mentionné précédemment, est la possibilité d'avoir la présence d'ingrédients actifs de différentes familles ou des nouveaux isomères rendant leur identification très fastidieuse, voir même impossible avec des détecteurs qui effectuent des analyses ciblées. Par contre, l'avantage principal et l'aspect innovateur de ces projets étaient de développer, avec la trappe ionique orbitale, des méthodes permettant des analyses à haute résolution non ciblées pour déterminer la présence de ces ingrédients actifs de différentes familles ou des nouveaux isomères présents. Cette innovation amène une dimension supplémentaire aux méthodes traditionnellement utilisées, en permettant une analyse à haute résolution sur la masse de composés non-ciblés.

Les méthodes ont été développées sur une colonne C₁₈ en phase inverse, mais qui contient un recouvrement des silanols de nature polaire. Cela offre à la méthode chromatographique une grande polyvalence et permet la rétention des composés polaires et apolaires à la fois. Il en demeure que sans le spectromètre de masse en tandem utilisé, il n'aurait pas été possible de distinguer tous les composés analysés au cours de ces projets. En effet, dans certains cas, la masse exacte et la fragmentation de certains isomères était similaires, mais leur séparation chromatographique étaient différentes. Donc, il était possible de les distinguer par l'ordre d'élution. Par contre, pour une grande quantité de composés, leur masse exacte et leur patron de fragmentation étaient différents, ce qui nous a permis d'identifier les composés présents, même sans séparation chromatographique parfaite. Somme toute, la LC-MS/MS a été un bon choix pour l'analyse des médicaments contre la dysfonction érectile et des cannabinoïdes.

6.1 Travaux futurs

Les différentes méthodes développées permettent l'analyse simultanée d'un grand nombre de composés et cela en un court laps de temps. Cependant, de nouveaux produits de synthèse s'ajoutent continuellement à la liste des analytes avec potentiel d'être des substances contrôlées par les gouvernements. Il sera donc nécessaire de continuer à ajouter des composés à la méthode pour qu'elle reste adéquate pour l'identification de ce qui peut être présent dans les composés saisis.

Il sera aussi nécessaire d'être à l'affût des différentes matrices pouvant être utilisées par les laboratoires illicites dans leur essais de passer les points de saisies sans problème. En effet, différentes matrices que celles analysées au cours de ces projets ont aussi été analysées, soit des timbres (« *patches* ») et des capsules contenant l'ingrédient actif (la poudre présente dans la capsule ne contenait aucun ingrédient actif). Ces deux types de matrices n'ont pas été ajoutés à la méthode d'extraction, car ces composés ont été reçus trop tard, vers la fin du projet de recherche.

Ce type de méthode, c'est-à-dire non-ciblée, pourrait aussi être transférée pour le dépistage anti-dopage, les analyses vétérinaires, le contrôle des aliments, les analyses environnementales ou bien d'autres où la nature des analytes à surveiller n'est pas toujours connue d'avance.

7. Bibliographie

- [1] B.J. Venhuis, G. Zomer, D. de Kaste, Structure elucidation of a novel synthetic thiono analogue of sildenafil detected in an alleged herbal aphrodisiac, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **46** (2008) 814-817.
- [2] B.J. Venhuis, G. Zomer, M. Hamzink, H.D. Meiring, Y. Aubin, D. de Kaste, The identification of a nitrosated prodrug of the PDE-5 inhibitor aildenafil in a dietary supplement: A Viagra with a pop, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **54** (2011) 735-741.
- [3] L. Blok-Tip, B. Zomer, F. Bakker, K.D. Hartog, M. Hamzink, J. ten Hove, M. Vredenbregt, D. de Kaste, Structure elucidation of sildenafil analogues in herbal products, *Food Addit. Contam.* **21** (2004) 737-748.
- [4] Q. Liang, J. Qu, G. Luo, Y. Wang, Rapid and reliable determination of illegal adulterant in herbal medicines and dietary supplements by LC/MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40** (2006) 305-311.
- [5] P. Lebel, J. Gagnon, A. Furtos, K.C. Waldron, A rapid, quantitative liquid chromatography-mass spectrometry screening method for 71 active and 11 natural erectile dysfunction ingredients present in potentially adulterated or counterfeit products, *J. Chromatogr. A* **1343** (2014) 143-151.
- [6] J. Wilson, *Viagra: The little blue pill that could*, (CNN Health), 2013, <http://www.cnn.com/2013/03/27/health/viagra-anniversary-timeline/index.html> consulted 2014/11/20
- [7] G. Jackson, P. Montorsi, M.D. Cheitlin, Cardiovascular safety of sildenafil citrate (Viagra®): An updated perspective, *Urology* **68** (2006) 47-60.
- [8] K. Shinlapawittayatorn, S. Chattipakorn, N. Chattipakorn, Effect of sildenafil citrate on the cardiovascular system, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **38** (2005) 1303-1311.
- [9] M.D. Cheitlin, A.M. Hutter Jr, R.G. Brindis, P. Ganz, S. Kaul, R.O. Russell Jr, R.M. Zusman, *Use of Sildenafil (Viagra) in Patients With Cardiovascular Disease*, (American Heart Association), 1999, <http://circ.ahajournals.org/content/99/1/168.full> consulted 2014/11/20
- [10] P. Mercure, *Pfizer perd son brevet sur le Viagra*, (La Presse, LaPresse.ca), 2012, <http://www.lapresse.ca/actualites/justice-et-affaires-criminelles/201211/08/01-4591707-pfizer-perd-son-brevet-sur-le-viagra.php> consulted 2013/09/10.
- [11] WorldHealthOrganization, *Growing threat from counterfeit medicines*, (World Health Organization), 2010, <http://www.who.int/bulletin/volumes/88/4/10-020410/en/> consulted 2012/09/25.
- [12] LeMonde, *Coup de filet européen contre des vendeurs de faux Viagra* (Le Monde, Le Monde.fr Économie), 2014, http://www.lemonde.fr/economie/article/2014/09/01/coup-de-filet-europeen-contre-des-faux-vendeurs-de-viagra_4480103_3234.html consulted 2014/11/20.
- [13] S.R. Gratz, C.L. Flurer, K.A. Wolnik, Analysis of undeclared synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors in dietary supplements and herbal matrices by LC-ESI-MS and LC-UV, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **36** (2004) 525-533.
- [14] B.J. Venhuis, D. de Kaste, Towards a decade of detecting new analogues of sildenafil, tadalafil and vardenafil in food supplements: A history, analytical aspects and health risks, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **69** (2012) 196-208.
- [15] G.A. Cabral, Marijuana and Cannabinoids : Effects on Infections, Immunity and AIDS, *J. Cannabis Ther.* **1** (2001) 61-85.

- [16] L. Degenhardt, W.D. Hall, The adverse effects of cannabinoids: implications for use of medical marijuana, *Can. Med. Assoc. licensors* **178** (2008) 1685-1686.
- [17] A.L. Hughes, D. Nutt, Neurobiology of addiction and implications for treatment, *The British J. Psychiat.* **182** (2002) 97-100.
- [18] *Understanding the 'Spice' phenomenon*, Lisbon, 2014, <http://www.emcdda.europa.eu/publications/thematic-papers/spice> consulted 2014/09/22.
- [19] A. Grigoryev, A. Melnik, S. Saychuk, A. Simonov, V. Rozhanets, Gas and liquid chromatography–mass spectrometry studies on the metabolism of the synthetic phenylacetylindole cannabimimetic JWH-250, the psychoactive component of smoking mixtures, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **879** (2011) 2519-2526.
- [20] A.D. de Jager, J.V. Warner, M. Henman, W. Ferguson, A. Hall, LC-MS/MS method for the quantitation of metabolites of eight commonly-used synthetic cannabinoids in human urine - An Australian perspective, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **897** (2012) 22-31.
- [21] L. Mercolini, R. Mandrioli, M. Protti, M. Conti, G. Serpelloni, M.A. Raggi, Monitoring of chronic Cannabis abuse: An LC-MS/MS method for hair analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **76** (2013) 119-125.
- [22] G. Merola, Z. Aturki, G. D'Orazio, R. Gottardo, T. Macchia, F. Tagliaro, S. Fanali, Analysis of synthetic cannabinoids in herbal blends by means of nano-liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **71** (2012) 45-53.
- [23] A. Mahadevan, C. Siegel, B.R. Martin, M.E. Abood, I. Beletskaya, R.K. Razdan, Novel cannabinol probes for CB1 and CB2 cannabinoid receptors., *J. Med. Chem.* **43** (2000) 3778-3785.
- [24] N. Roth, B. Moosmann, V. Auwarter, Development and validation of an LC-MS/MS method for quantification of Delta 9-tetrahydrocannabinolic acid A (THCA-A), THC, CBN and CBD in hair, *J. Mass Spectrom.* **48** (2013) 227-233.
- [25] S.B. Grauwiler, A. Scholer, J. Drewe, Development of a LC/MS/MS method for the analysis of cannabinoids in human EDTA-plasma and urine after small doses of Cannabis sativa extracts, *J. Chromatogr. B* **850** (2007) 515–522.
- [26] Z. Bruci, I. Papoutsis, S. Athanaselis, P. Nikolaou, E. Pazari, C. Spiliopoulou, G. Vyshka, First systematic evaluation of the potency of Cannabis sativa plants grown in Albania., *Forensic Sci. Int.* **222** (2012) 40-46.
- [27] A. Rigdon, P. Kennedy, T. Kahler, *LC/MS/MS Analysis of Metabolites of Synthetic Cannabinoids JWH-018 and JWH-073 in Urine*, (Restek Corporation), 2011, http://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/Clinical-Forensic-Toxicology/cf_an1383 consulted 2014/09/22.
- [28] P. Lebel, A. Furtos, K.C. Waldron, Rapid determination of 24 synthetic and natural cannabinoids for LC-MS/MS screening in natural products and drug inspection applications, *Current Trends in Mass Spectrometry in press* (2015).
- [29] Crawford scientific, Thermo Scientific, *Thermo Scientific Accucore XL HPLC Columns*, (Crawford Scientific), S.D., http://www.crawfordscientific.com/downloads/pdf_new/thermoscientific/accucore-brochure.pdf consulted 2013/06/21.

- [30] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, Wiley-Interscience United States of America, 1997, p. 765.
- [31] D.C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, Craig Bleyer, United States of America, 2007, p. 828.
- [32] J.W. Dolan, Transferring HPLC Methods to UPLC, Canadian Life Science (LC Workshops), 2013.
- [33] Thermo Scientific, *LTQ Orbitrap Operations Course*, Thermo Scientific Training Institute, 2012.
- [34] J.H. Gross, *Mass Spectrometry*, Springer, Netherland, 2011, p. 753.
- [35] Waters, *Common Ionization, How Do We Make Ions?*, (Waters), 2014, http://www.waters.com/waters/en_US/Common-Ionization/nav.htm?cid=10073251 consulted 2014/11/20.
- [36] E. De Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry Principles and Applications*, WILEY, United States of America, 2007, p. 502.
- [37] M. Magee, P. Boswell, J. Schellinger, P. Carr, A. Hegeman, J. Cohen, *Measure your gradient*, University of Minnesota), N.D., <http://www.measureyourgradient.org/> consulted 2014/11/05.
- [38] *Guideline on bioanalytical method validation*, European Medicines Agency, 2011, consulted
- [39] M.H. Shin, M.K. Hong, W.S. Kim, Y.J. Lee, Y.C. Jeoung, Identification of a new analogue of sildenafil added illegally to a functional food marketed for penile erectile dysfunction, *Food Addit. Contam.* **20** (2003) 793-796.
- [40] P. Zou, P. Hou, S.S.-Y. Oh, X. Ge, B.C. Bloodworth, M.-Y. Low, H.-L. Koh, Identification of benzamidenafil, a new class of phosphodiesterase-5 inhibitor, as an adulterant in a dietary supplement, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **47** (2008) 255-259.
- [41] H.-M. Lee, C.S. Kim, Y.M. Jang, S.W. Kwon, B.-J. Lee, Separation and structural elucidation of a novel analogue of vardenafil included as an adulterant in a dietary supplement by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **54** (2011) 491-496.
- [42] J.C. Reepmeyer, J.T. Woodruff, Use of liquid chromatography–mass spectrometry and a chemical cleavage reaction for the structure elucidation of a new sildenafil analogue detected as an adulterant in an herbal dietary supplement, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **44** (2007) 887-893.
- [43] B.J. Venhuis, D.M. Barends, M.E. Zwaagstra, D. de Kaste, *Recent developments in counterfeits and imitations of Viagra, Cialis and Levitra*, Report # 370030001, (National Institute for Public Health and the Environment), 2007.
- [44] R. Yuana, Y. Lin, Traditional Chinese medicine: an approach to scientific proof and clinical validation, *Pharmacol. Ther.* **86** (2000) 191-198.
- [45] Y.-H. Lam, W.-T. Poon, C.-K. Lai, A.Y.-W. Chan, T.W.-L. Mak, Identification of a novel vardenafil analogue in herbal product, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **46** (2008) 804-807.
- [46] T. Liu, H. Xin, W.R. Li, F. Zhou, G.Y. Li, Y.Q. Gong, Z.Z. Gao, X.C. Qin, W.S. Cui, A.W. Shindel, Z.C. Xin, Effects of Icariin on Improving Erectile Function in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, *J. Sex. Med.* **8** (2011) 2761-2772.

- [47] J. Zhang, Y.B. Wang, C.G. Ma, T. Liu, W.R. Li, Y.Q. Gong, Z.C. Xin, Icarisid II, a PDE5 inhibitor from *Epimedium wanshanense*, increases cellular cGMP by enhancing NOS in diabetic ED rats corpus cavernosum tissue, *Andrologia* **44** (2012) 87-93.
- [48] M.N. Islam, F. Downey, C.K.Y. Ng, Comparative analysis of bioactive phytochemicals from *Scutellaria baicalensis*, *Scutellaria lateriflora*, *Scutellaria racemosa*, *Scutellaria tomentosa* and *Scutellaria wrightii* by LC-DAD-MS, *Metabolomics* **7** (2011) 446-453
- [49] C.G. McMahon, Dapoxetine: a new option in the medical management of premature ejaculation, *Ther. Adv. Urol.* **4** (2012) 233-251.
- [50] L. Li, M.Y. Low, X.W. Ge, B.C. Bloodworth, H.L. Koh, Isolation and structural elucidation of dapoxetine as an adulterant in a health supplement used for sexual performance enhancement, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **50** (2009) 724-728.
- [51] Crawford scientific, Thermo Scientific, *Thermo Scientific Accucore HPLC Columns*, (Crawford Scientific), S.D., http://www.crawfordscientific.com/downloads/pdf_new/thermoscientific/accucore-brochure.pdf consulted 2013/06/21.
- [52] B. Davani, *US Pharmacopeia short course on validation and verification of analytical procedures*, Montreal, Canada), 2012.
- [53] US-Dept-of-Justice, *Scheduling Actions Controlled Substances Regulated Chemicals*, (U.S. Department of Justice), 2013.
- [54] Y. Ren, C. Wu, J. Zhang, Simultaneous screening and determination of 18 illegal adulterants in herbal medicines and health foods for male sexual potency by ultra-fast liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* **35** (2012) 2847-2857.
- [55] S. Azimi, N. Mistry, M. Wood, *UPLC-MS/MS for the screening, Confirmation and Quantification of 32 Drugs illegally added to Herbal/Dietary Supplements for the Enhancement of Male Sexual Performance*, (Supreme Council of Health, State of Qatar), 2012, http://www.sch.gov.qa/sch/UserFiles/File/pdf/POSTER_ED_analogues_analysis_SCH_Qatar.pdf consulted 2013/06/21.
- [56] C.-L. Kee, X. Ge, M.-Y. Low, H.-L. Koh, Structural elucidation of a new sildenafil analogue using high-resolution Orbitrap mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **27** (2013) 1380-1384.
- [57] L. Console-Bram, J. Marcu, M.E. Abood, Cannabinoid receptors: nomenclature and pharmacological principles, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **38** (2012) 4-15.
- [58] K.A. Seely, J. Lapoint, J.H. Moran, L. Fattore, Spice drugs are more than harmless herbal blends: A review of the pharmacology and toxicology of synthetic cannabinoids, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **39** (2012) 234-243.
- [59] *Synthetic Drug Abuse Prevention Act of 2012*, 2014, <https://www.govtrack.us/congress/bills/112/s3190/text> consulted 2014/09/22.
- [60] L.N. Sacco, K. Finklea, *Synthetic Drugs: Overview and Issues for Congress, 2014*, 2014, <https://www.hsdl.org/?view&did=757033> consulted 2014/09/22.
- [61] S. Dresen, N. Ferreirós, M. Pütz, F. Westphal, R. Zimmermann, V. Auwärter, Monitoring of herbal mixtures potentially containing synthetic cannabinoids as psychoactive compounds, *J. Mass Spectrom.* **45** (2010) 1186-1194.

- [62] K.G. Shanks, G.S. Behonick, T. Dahn, A. Terrell, Identification of Novel Third-Generation Synthetic Cannabinoids in Products by Ultra-Performance Liquid Chromatography and Time-of-Flight Mass Spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* **37** (2013) 517-525.
- [63] N. Uchiyama, M. Kawamura, R. Kikura-Hanajiri, Y. Goda, URB-754: A new class of designer drug and 12 synthetic cannabinoids detected in illegal products, *Forensic Sci. Int.* **227** (2013) 21-32.
- [64] T. Sobolevsky, I. Prasolov, G. Rodchenkov, Detection of JWH-018 metabolites in smoking mixture post-administration urine, *Forensic Sci. Int.* **200** (2010) 141-147.
- [65] A. Grigoryev, S. Saychuk, A. Melnik, N. Moskaleva, J. Dzhurko, M. Ershov, A. Nosyrev, A. Vedenin, B. Izotov, I. Zabirowa, V. Rozhanets, Chromatography-mass spectrometry studies on the metabolism of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073, psychoactive components of smoking mixtures, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **879** (2011) 1126-1136.
- [66] K.B. Scheidweiler, M.A. Huestis, Simultaneous quantification of 20 synthetic cannabinoids and 21 metabolites, and semi-quantification of 12 alkyl hydroxy metabolites in human urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **1327** (2014) 105-117.
- [67] A.A.M. Stolker, J. van Schoonhoven, A.J. de Vries, I. Bobeldijk-Pastorova, W.H.J. Vaes, R. van den Berg, Determination of cannabinoids in cannabis products using liquid chromatography–ion trap mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **1058** (2004) 143-151.
- [68] S. Kneisel, M. Speck, B. Moosmann, T.M. Corneillie, N.G. Butlin, V. Auwarter, LC/ESI-MS/MS method for quantification of 28 synthetic cannabinoids in neat oral fluid and its application to preliminary studies on their detection windows, *Anal. Bioanal. Chem.* **405** (2013) 4691-4706.
- [69] K. Scheidweiler, M.Y. Jarvis, M. Huestis, Nontargeted SWATH acquisition for identifying 47 synthetic cannabinoid metabolites in human urine by liquid chromatography-high-resolution tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* Published online: 16 September 2014 (2014) 1-15.
- [70] J.P. Danaceau, E.E. Chambers, K.J. Fountain, *Analysis of Synthetic Cannabinoids from Urine for Forensic Toxicology using Oasis HLB μ Elution plates and CORTECS UPLC Columns*, Waters Corporation, Milford MA, 01757 USA, 2013, http://www.waters.com/waters/library.htm?lid=134763848&lset=1&locale=en_CA consulted 2014/09/22