

# Identification dosage des cannabinoïdes dans le sang total

## Identification and quantification of cannabinoids in whole blood

P. KINTZ \*(1), V. CIRIMELE (1), G. PEPIN (2), P. MARQUET (3), M. DEVEAUX (4), P. MURA (5)

TOXICORAMA 1996, n°2

(1) Institut de Médecine Légale, STRASBOURG

(2) Laboratoire d'expertises Toxlab, PARIS

(3) Service de Pharmacologie et Toxicologie, CHRU Dupuytren, LIMOGES

(4) Institut de Médecine Légale, LILLE

(5) Laboratoire de Biochimie et Toxicologie, CHU POITIERS

\*Auteur à qui adresser la correspondance: P. KINTZ

Institut de Médecine Légale - 11, rue Humann - 67000 STRASBOURG

### RÉSUMÉ

Cet article présente une méthode de chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse pour l'identification et la quantification du delta9-THC et de son métabolite principal l'acide 11-nor delta 9 THC-COOH dans le sang total, 2 ml de sang sont extraits dans une verrerie préalablement silanisée, par le mélange hexane-acétate d'éthyle (9: 1, v/v) en milieu acide (acide acétique 10 %) en présence de standards internes deutérés. Après évaporation, l'extrait est méthylé, puis injecté dans une colonne capillaire HP5 MS. Les ions m/z 285, 313 et 328 sont utilisés pour l'identification et la quantification du THC et les ions m/z 313, 357 et 372 pour celles du THC-COOH. Les limites de quantification sont respectivement de 1.0 et 0,5 ng/ml pour le THC et le THC-COOH.

Mots clés: Cannabis, dosage, sang, GC/MS.

### SUMMARY

A method for cannabis testing in human whole blood is presented. The procedure involves acid extraction of 2 ml specimen in a silanized vial in presence of deuterated internal standards into hexane-ethyl acetate. Limit of quantification is 1.0 and 0.5 ng/ml for THC and THC-COOH, respectively

**Key-words:** Cannabis, assay blood, GC/MS

### Introduction

Le delta 9-tétrahydrocannabinol (THC) est le principe psychoactif extrait des plants femelles de Cannabis sativa. Hormis l'alcool et le tabac, c'est la drogue la plus largement consommée au monde. Trois formes sont disponibles sur le marché avec des concentrations en THC très variables: l'herbe (0,2 - 10 %), la résine (5 - 20 %) et l'huile (40 - 80 %). Le THC n'est pas un alcaloïde, puisque la molécule ne contient pas d'atome d'azote. Dans le cadre des réflexions sur la dépénalisation, les effets pharmacologiques du THC sont largement discutés, mais il semble qu'une seule cigarette soit capable de modifier la vigilance d'un sujet pendant 24 heures (1). La voie principale de métabolisation est la formation de dérivés hydroxylés polaires, comme le 11-OH-THC ou l'acide 11-nor-delta9-THC-carboxylique (THC-COOH), la plupart des métabolites urinaires sont sous forme glucuronoconjuguée (60 à 80 %). Au contraire, dans le sang, les formes circulantes sont essentiellement libres. Dans ces conditions, il ne sera pas nécessaire d'hydrolyser les échantillons plasmatiques ou sanguins.

Plusieurs études, tant en France (2) qu'à l'étranger (3) ont montré la prévalence du THC chez les conducteurs impliqués dans des accidents de la route. Afin de répondre aux préoccupations des Forces de l'Ordre et de la

Justice, le laboratoire de Toxicologie à Strasbourg a développé une procédure analytique permettant l'identification et le dosage simultané dans le sang total (à partir des échantillons pour la détermination de l'alcoolémie) du THC, du THC-COOH et du 11-OH-THC.

## Matériel et méthode

### Réactifs

L'hexane, le toluène, l'isooctane, le méthanol et l'acétate d'éthyle sont de qualité HPLC. Tous les autres réactifs sont de qualité pour analyse. Le THC, le THCd3, le THC-COOH et le THC-COOH-d3 ont été obtenus auprès de la société Promochem (Molsheim, France). Le 11OH-THC a été acheté chez Sigma. La solution d'hydroxyde de tétraméthylammonium (TMAH, Fluka 87741) est préparée par solubilisation de 2,49 g de la forme pentahydratée dans 5 ml d'eau.

**Silanisation de la verrerie:** Afin d'éviter l'absorption des cannabinoïdes sur la verrerie, il convient de masquer les sites actifs par silanisation. Préparer une solution de diméthylchlorosilane (Sigma D-3879) à 5 % dans du toluène. Dans les flacons à extraction ou dérivation, introduire 1 à 3 ml (selon la taille) de cette solution. Agiter pendant 10 min. Rincer en séquence par 5 ml de toluène, puis méthanol, toluène et enfin méthanol. Sécher 20 min. à 80°C.

**Extraction:** Dans un tube à extraction préalablement silanisé, ajouter successivement 2 ml de sang, 20 ng de THC-d3 et THCCOOH-d3, 0,2 ml d'acide acétique à 10 % et 5 ml d'hexane-acétate d'éthyle (9: 1, v/v). Après agitation pendant 10 mn et centrifugation, la phase organique est recueillie dans un tube silanisé et évaporée à sec. Les cannabinoïdes sont alors dérivés par méthylation. L'extrait sec est repris par 200 µl du mélange: solution de TMAH - diméthylsulfoxyde (DMSO) (1: 20, v/v) préparé extemporanément, pendant 2 mn à température ambiante. 50 µl d'iodure de méthyle sont alors ajoutés, et incubés 15 mn à température ambiante, la réaction est arrêtée par ajout de 200 µl HCl 0,1 N puis les cannabinoïdes sont extraits dans 1 ml d'isooctane. Après agitation et centrifugation, la phase organique est évaporée à sec. L'extrait est repris par 25 µl d'isooctane et 2 µl injectés dans la colonne.

**Instrumentation:** Le système de chromatographie consiste en un injecteur automatique HP 6890, un chromatographe en phase gazeuse HP 5890 et un détecteur de masse HP 5972. La colonne capillaire, de type HP 5MS (30 m x 0,25 mm) est traversée par de l'hélium ultrapur (N 55) à débit contrôlé de 1 ml/min., avec une rampe de température allant de 60 °C (1 min.) à 295°C (5 min) par 30°C/min. L'injecteur, en mode splitless est chauffé à 270 °C. L'acquisition des données se fait en mode Single Ion Monitoring sur les ions qualifiants des 3 composés et des standards deutérés (tableau 1).

### Résultats

L'ensemble des paramètres de validation est présenté dans le tableau 11. La limite de quantification du THC à 1 ng/ml semble raisonnable et suffisante compte tenu des études antérieures. La quantification simultanée du THC et du THC-COOH permet d'accroître la spécificité de la méthode. En outre, le ratio THC-COOH/THC permet d'approcher le moment de la dernière exposition, selon l'équation  $\text{Log T (en heures)} = (0,576 \times \log \text{THC-COOH/THC}) - 0,176$  (4).

La répétabilité de la méthode a été évaluée en analysant 8 échantillons surchargés à 5 ng/ml en THC et THC-COOH. Le coefficient de variation est de 8,9 % pour le THC et de 6,3 % pour le THC-COOH.

**Tableau I : Temps de rétention et ions qualifiants**

Composés	Temps de rétention (mn)	ions (m/z)
THC	9,39	285, 313, <u>328</u>
THC-d3	9,38	316, <u>331</u>
11 -OH-THC	10,11	313, 314, <u>358</u>
THC-COOH	10,71	<u>313</u> , 357, 372
THC-COOH-d3	10,70	<u>316</u> , 360, 375

Les ions soulignés sont utilisés pour la quantification

**Tableau II: Paramètres de validation**

Composés	linéarité(ng/ml)	coefficient de corrélation	limite de détection (ng/ml)	% d'extraction
THC	1 - 20	0,998	0.4	93.1
THC-COOH	0.5 - 40	0.999	0.2	91.4

**Références:**

(1) V. Leirer J. Yesavage, D. Morrow

**Marijuana carry-over effects on aircraft pilot performance.**  
**Aviat. Space and Environ. Med., 199, 62, 221.**

(2) J.M. Schermann.

**Evaluation du risque d'accident de la circulation lié à l'absorption de drogues illicites.**Convention Direction de la sécurité routière.  
**Rapport final.23 décembre 1992.**

(3) J. Garriott, V. Di Maio, R. Rodriguez.

**Detection of cannabinoids in homicide victim and motor vehicle fatalities.**  
**J.Forensic Sci., 1986,31, 1274.**

(4) M. Huestis, J. Henningfield, E. Cone.

**Blood cannabinoids. II. Models for the prediction of time of marijuana exposure from plasma concentrations of THC and THC-COOH.**  
**J.Anal.Toxicol., 1992 16,283.**