

Lettre à la Rédaction / Letter to the Editor

Influence des conditions de séchage et de conservation des échantillons de chanvre prélevés dans les cultures industrielles afin d'en déterminer réglementairement la teneur en Δ -9-THC

The influence of drying and storage conditions on collected samples of industrial hemp crops to determine regulatory levels of Δ -9-THC

Gilbert Fournier^{1*}, Jocelyne Bausset¹, Alexandre Maciuk¹, Claire Thouminot², Olivier Beherec²

¹ Laboratoire de Pharmacognosie, UMR 8076 CNRS (BioCIS), Faculté de Pharmacie, 5 rue J.-B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

² Fédération Nationale des Producteurs de Chanvre (FNPC), 20 rue Paul Ligneul, 72000 Le Mans, France

Mots clés : Chanvre, delta-9-tétrahydrocannabinol, séchage, conservation

Key words: Hemp, delta-9-tetrahydrocannabinol, drying, storage

Reçu le 28 mars 2011, accepté après modifications le 24 mai 2011
Publication en ligne le 6 juillet 2011

1 Introduction

Pour la détermination quantitative du delta-9-tétrahydrocannabinol (Δ -9-THC) des variétés de chanvre, une méthode communautaire a été publiée [1]. Bien que cette méthode permette de contrôler efficacement les variétés cultivées [2], nous avons eu l'occasion de commenter plusieurs points de cette méthode, notamment ceux ayant trait au prélèvement au champ qui peuvent influencer fortement sur le résultat [3] et nous avons proposé une simplification en prenant en compte la valeur du rapport $\alpha = \Delta$ -9-THC/CBD [4]. Nous souhaitons maintenant revenir sur les conséquences des étapes comprises entre le prélèvement au champ et l'analyse et mesurer leur impact sur les teneurs en cannabinoïdes.

2 Les contraintes

Pour les étapes comprises entre le prélèvement au champ et l'analyse, le texte réglementaire [1] stipule pour la procédure A (applicable pour le contrôle des variétés déjà inscrites) : « Le séchage des échantillons doit commencer le plus rapidement possible et en tout cas dans les 48 h, par toute méthode

à une température inférieure à 70 °C. Les échantillons sont séchés jusqu'à poids constant, l'humidité étant entre 8 et 13 %. Les échantillons secs sont conservés non tassés à l'obscurité et à température inférieure à 25 °C ».

« Les échantillons secs . . . sont broyés ; . . . la poudre peut être conservée pendant 10 semaines, au sec et à l'abri de la lumière, à une température inférieure à 25 °C ».

Dans la pratique et pour se conformer à la réglementation communautaire, ce sont chaque année 500 à 600 échantillons qui sont prélevés, dont la moitié en France, durant la première quinzaine d'août. Ces échantillons frais, renfermant 65 à 85 % d'eau, doivent être scellés pour assurer une traçabilité parfaite, mais également séchés dans les délais et stockés en attente de broyage.

Pour la reprise ultérieure des échantillons pour le broyage après séparation des tiges et des graines, il est important que les échantillons soient suffisamment secs sous peine de ne pouvoir obtenir une poudre suffisamment fine, donc nécessitent d'être à nouveau passés en étuve. Lors d'essais préliminaires, nous avons perçu que la durée du stockage, dans la limite des contraintes communautaires de quelques semaines, n'avait aucun impact sur les teneurs en cannabinoïdes, mais que cet étuvage pouvait influencer notablement les cannabinoïdes. Pour préciser cette influence, nous avons été amenés à placer des

* Correspondance : Gilbert Fournier, gilbert.fournier@u-psud.fr

Tableau I. En fonction de différentes conditions de séchage, variation des teneurs en cannabinoïdes de deux variétés de chanvre industriel cultivé en France.

Variété	Conditions de séchage		$\Delta - 9\text{-THC}$ %	CBD %	$\Delta - 9\text{-THC}/\text{CBD}$	CBG %	CBE %	CBN %
F 75	Témoïn		0,083	2,18	0,038	ND	ND	ND
	70 °C	2 jours	0,081	2,13	0,038		ND	ND
		4 jours	0,074	2,02	0,037		ND	ND
		6 jours	0,072	2,00	0,036		ND	ND
		8 jours	0,073	2,05	0,036		ND	ND
	100 °C	12 h	0,061	1,65	0,037		0,075	0,025
		24 h	0,063	1,25	0,049		0,072	0,026
		36 h	0,043	0,96	0,064		0,099	0,012
		72 h	0,041	0,61	0,100		0,102	0,010
	100 °C + eau	12 h	0,044	1,70	0,026		0,010	ND
		24 h	0,055	1,91	0,029		0,015	0,011
		36 h	0,042	1,56	0,027		0,014	0,012
		72 h	0,017	1,00	0,017		0,024	0,013
	S 27	Témoïn		ND	0,04		ND	0,78
70 °C		2 jours	0,04		0,71			
		4 jours	0,04		0,63			
		6 jours	0,04		0,58			
		8 jours	0,04		0,64			
100 °C		12 h	0,03		0,39			
		24 h	0,03		0,36			
		36 h	0,03		0,22			
		72 h	0,03		0,14			
100 °C + eau		12 h	0,03		0,45			
		24 h	0,03		0,45			
		36 h	0,02		0,33			
		72 h	0,02		0,12			

ND = non détecté (< 0,005 %)

échantillons dans diverses conditions expérimentales (voir méthodologie ci-après).

3 Influence des conditions de séchage sur la teneur en $\Delta\text{-9-THC}$

3.1 Rappels préliminaires importants

- Selon les proportions des trois cannabinoïdes principaux, on distingue classiquement deux chimiotypes dans les variétés industrielles françaises :
 - chimiotype à CBD dominant ($\Delta\text{-9-THC}$: 0,05 à 0,15 % ; cannabidiol = CBD : 0,5 à 1,5 % ; cannabigérol = CBG < 0,005 %) par exemple pour les variétés Epsilon 68, Fedora 17, Felina 32, Ferimon et Futura 75 ;
 - chimiotype à CBG dominant ($\Delta\text{-9-THC}$ < 0,005 % ; CBD : 0,05 à 0,10 % ; CBG : 0,5 à 1,5 %) pour les variétés Santhica 27 et Santhica 70 ;
- Le rapport α ($\Delta\text{-9-THC}/\text{CBD}$) est à déterminer ; en effet, nous avons montré qu'un $\alpha < 0,2$ garantissait une teneur en $\Delta\text{-9-THC}$ < 0,2 % [4].
- Sur le plan pharmacologique, le CBD et le CBG sont dépourvus de propriétés psychotropes ;
- D'un point de vue biogénétique, le CBG est le précurseur du $\Delta\text{-9-THC}$ et du CBD ; tous ces cannabinoïdes sont

présents dans la plante sous la forme de leur dérivés acides, évoluant en formes neutres lors du séchage ;

- Parmi les autres cannabinoïdes classiquement décrits, le cannabinoïde (CBN) et la cannabielsoïne (CBE) sont les produits de dégradation respectivement du $\Delta\text{-9-THC}$ et du CBD [5]. Leur présence lors du dosage (par chromatographie en phase gazeuse) est le signe que le séchage et/ou la conservation des échantillons n'auraient pas été correctement menés.

3.2 Méthodologie

Sur deux variétés régulièrement cultivées en France (Futura 75 = F 75 et Santhica 27 = S 27), nous avons mis en place plusieurs études dans l'objectif d'évaluer l'influence des conditions de séchage et de conservation des échantillons sur les teneurs en cannabinoïdes, notamment en $\Delta\text{-9-THC}$. Ces deux variétés ont été choisies comme représentatives des deux chimiotypes rappelés ci-dessus.

Une difficulté majeure : pour éliminer l'influence de la variabilité naturelle des plantes, il fallait constituer un échantillon moyen homogène qui serait soumis aux diverses conditions testées. Ainsi, pour les deux variétés retenues (F 75 et S 27) la procédure officielle de préparation des échantillons a été suivie. Dans leurs sacs respectifs ils ont été normalement séchés (maximum 70 °C) ; leur teneur en eau est alors voisine de

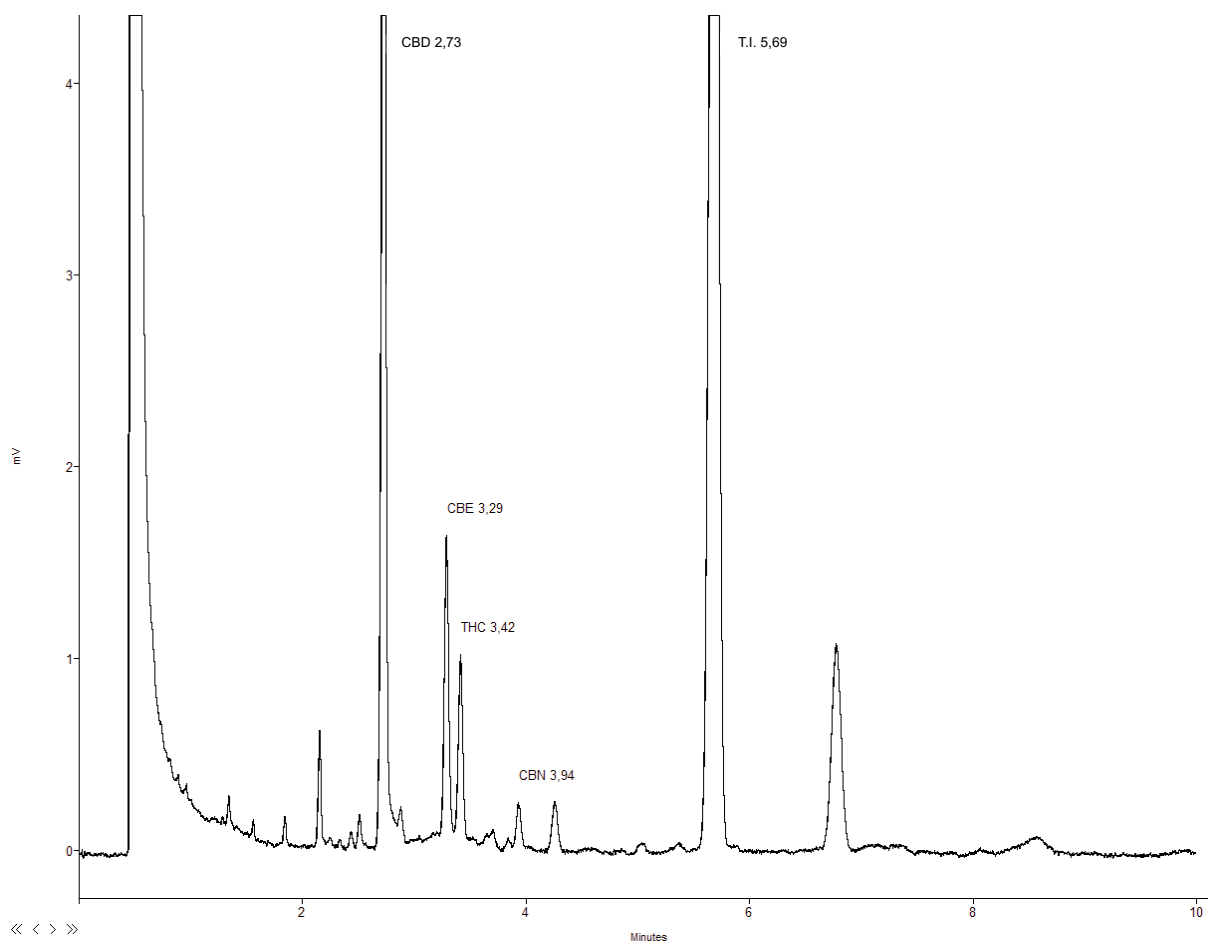


Fig. 1. Chromatogramme (CPG) d'un échantillon de chanvre passé à l'étuve à 100 °C pendant 72 h.

10 %. L'élimination des tiges et des graines puis le broyage ont été faits. Une poudre demi-fine (tamis à largeur de mailles de 1 mm) parfaitement homogène a été obtenue. Elle correspond au témoin.

Des parties aliquotes de cette poudre ont été soumises à diverses conditions expérimentales : certains échantillons sont placés à 70 °C pendant 2 à 8 jours ; d'autres à 100 °C pendant 12 à 72 h ; enfin des échantillons sont de nouveau humidifiés et placés dans un sac hermétique à l'étuve à 100 °C pendant 12 à 72 h. Ces dernières conditions sont notées sur le tableau I : 100 °C + eau.

Ces conditions ont été retenues car elles pourraient correspondre à diverses situations lorsque les sacs sont remis à sécher (voir ci-dessus). Ils peuvent en effet avoir :

- été oubliés plusieurs jours dans l'étuve à 70 °C ;
- été placés dans une étuve trop chaude (100 °C) ;
- subi une ré-humidification importante que l'on tentera de traiter par un séchage rapide à haute température.

Le dosage du Δ -9-THC est réalisé selon la méthode officielle [1]. Les résultats sont colligés dans le tableau I. Pour le dosage des autres cannabinoïdes (CBD, CBG, CBE et CBN), nous nous sommes référés à la gamme d'étalonnage établie avec le Δ -9-THC.

3.3 Interprétation des résultats

Variété Futura 75 : par rapport au témoin, le fait de laisser les échantillons à l'étuve à 70 °C pendant 1 ou 2 jours ne modifie pas le résultat de l'analyse des cannabinoïdes. Au bout de 8 jours on note cependant une diminution de 10 % des teneurs en Δ -9-THC et en CBD. Les teneurs en CBN et en CBE sont inférieures au seuil de quantification (< 0,005 %). À 100 °C, les modifications sont beaucoup plus importantes, affectant proportionnellement plus le CBD que le Δ -9-THC ; le rapport α augmente, passant ici de 0,04 à 0,10. Le CBE et CBN sont présents à des teneurs relativement importantes, traduisant ainsi une importante dégradation respectivement du CBD et du Δ -9-THC. À 100 °C et en présence d'eau, il semble que les dégradations mentionnées ci-dessus soient encore plus fortes avec probablement des modifications précoces qui vont affecter principalement le Δ -9-THC, celui-ci ne se transformant pas nécessairement en CBN.

Remarque : le CBE et le Δ -9-THC ayant des temps de rétention très proches, il convient d'être très vigilant lors de l'analyse elle-même (choix des conditions expérimentales en CPG) et lors de l'interprétation des résultats pour éviter la confusion et/ou l'addition des deux pics chromatographiques (Figure 1).

Variété Santhica 27 : le CBG est le cannabinoïde majoritaire de cette variété. Les autres cannabinoïdes, à l'exception du CBD, ne sont présents qu'à l'état de traces (< 0,005 %).

Par rapport au témoin, un séchage prolongé à 70 °C affecte relativement peu la teneur en CBG (-18 % au bout de 8 jours). En revanche, dès que la température atteint 100 °C, en l'absence ou en présence d'eau, la teneur en CBG chute de 85 %. Dans tous les cas, la teneur en THC reste inférieure au seuil de quantification, comme pour les autres cannabinoïdes (CBE et CBN).

4 Conclusion

Afin d'éviter une dégradation des cannabinoïdes qui se traduirait par une modification de leurs teneurs et donc de leurs proportions relatives, il y a lieu de prendre un certain nombre de précautions dans toutes les étapes qui suivent le prélèvement au champ et vont jusqu'à la pulvérisation des échantillons.

Il faut disposer d'un contenant solide, que l'on peut sceller facilement, permettant une bonne évaporation de l'eau des échantillons frais. Il ne faut pas tasser les plantes dans les sacs.

Le séchage à l'étuve doit être effectué le plus rapidement possible ; la température de séchage ne doit pas dépasser 70 °C. Les sacs ne doivent pas être conservés à l'étuve mais dans un endroit frais, sec et bien ventilé.

Afin que le broyage des échantillons soit efficace, il est possible, au moment même de cette opération, de passer de nouveau les sacs quelques instants à l'étuve à 70 °C.

Ainsi les teneurs en cannabinoïdes ne seront pas modifiées, ni qualitativement (pas de dégradation du Δ -9-THC en CBN,

ni du CBD en CBE), ni de façon concomitante quantitativement (diminution des teneurs en Δ -9-THC, CBD ou CBG selon les variétés).

Conflits d'intérêts. Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts.

Références

1. Journal officiel de l'Union européenne – Règlement (CE) n° 1122/2009 de la Commission du 30 novembre 2009 fixant les modalités d'application du règlement (CE) n° 73/2009 du Conseil en ce qui concerne la conditionnalité, la modulation et le système intégré de gestion et de contrôle dans le cadre des régimes de soutien direct en faveur des agriculteurs prévus par ce règlement ainsi que les modalités d'application du règlement (CE) n° 1234/2007 du Conseil en ce qui concerne la conditionnalité dans le cadre du régime d'aide prévu pour le secteur vitivinicole.
2. Fournier G, Bausset J, Maciuk A, Béhérec O, Desvals M., Bertucelli S. Bilan de huit années de contrôle des cultures de chanvre industriel. *Ann Toxicol Anal.* 2008; 20: 217-221.
3. Fournier G, Béhérec O, Bertucelli S, Mathieu JP. À propos des conditions d'échantillonnage pour le dosage du delta-9-tétrahydrocannabinol dans les variétés de chanvre à usage industriel. *Ann Toxicol Anal.* 2001; 13: 275-281.
4. Fournier G, Bausset J, Béhérec O, Desvals M, Bertucelli S. La simplification du contrôle des cultures de chanvre industriel est possible. *Ann Toxicol Anal.* 2007; 19: 201-209.
5. Brenneisen R. Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other Cannabis constituents. In: El Sohly MA (editors). *Marijuana and the cannabinoids*, Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2007.