

Revue / Review article

Analyse des cannabinoïdes par spectrométrie de masse en mode tandem

Analysis of cannabinoids by tandem mass spectrometry

Marie Fabritius¹, Christian Staub², Christian Giroud^{*}

Centre Universitaire Romand de Médecine Légale, Unité de Toxicologie et Chimie Forensiques, Rue du Bugnon 21, 1011 Lausanne, Switzerland

Résumé – Depuis quelques années, la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) ne cesse de gagner du terrain comme méthode d'analyse en toxicologie forensique, notamment pour le dosage des cannabinoïdes. Couplée à la chromatographie liquide (LC) ou gazeuse (GC), elle permet l'identification fiable et le dosage rapide du THC, de son précurseur acide, et de ses principaux métabolites, y compris les glucuronides. Au cours de ces dix dernières années, un nombre significatif de publications sont parues sur ce sujet. L'objectif de cet article est de passer en revue les analyses par spectrométrie de masse en tandem des cannabinoïdes dans diverses matrices biologiques.

Mots clés : Cannabinoïdes, spectrométrie de masse en tandem, matrice biologique, chromatographie

Abstract – In recent years, tandem mass spectrometry (MS/MS) is gaining ground as a reference method of analysis in clinical and forensic toxicology, especially for the determination of cannabinoids. Coupled to liquid chromatography (LC) or gas chromatography (GC), it allows the definitive identification and rapid determination of THC, its acid precursor, and its major metabolites, including the glucuronides. During the past decade, several methods of analysis of cannabinoids in different matrices have appeared on this subject. The aim of this paper is to review the analysis of cannabinoids by tandem mass spectrometry methods in various biological matrices.

Key words: Cannabinoids, tandem mass spectrometry, biological, matrices, chromatography

Reçu le 17 janvier 2011, accepté après modifications le 29 mars 2011

Publication en ligne le 15 juin 2011

1 Introduction

Le cannabis est l'une des drogues illégales les plus consommées au monde. Environ la moitié des jeunes ont déjà expérimenté le cannabis et 10 % des consommateurs le fument quotidiennement [1]. Le THC est également fréquemment détecté dans le sang de conducteurs impliqués dans un accident de circulation ou arrêtés en raison d'une conduite erratique. Le dosage des cannabinoïdes est donc d'une grande importance en toxicologie clinique et médico-légale. La molécule active du cannabis, le Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) et ses métabolites peuvent être détectés dans de nombreuses matrices biologiques (sang, cheveux, urine, salive...) après consommation de marijuana ou d'autres dérivés du cannabis. La spectrométrie de masse en mode tandem (MS/MS) couplée avec différentes techniques séparatives permet l'identification sans équivoque et le dosage rapide de ces cannabinoïdes. Le but de cet article est de répertorier et décrire les techniques d'analyses des can-

nabinoïdes par spectrométrie de masse en mode tandem appliquées à un large spectre de matrices biologiques et publiées au cours de cette dernière décennie. Dans une première partie, l'article traite des matrices biologiques utilisées. La préparation d'échantillons est abordée dans la seconde partie. Enfin la dernière partie traite des techniques analytiques par MS/MS.

Les références scientifiques mentionnées ont été recherchées à l'aide de PubMed, Web of Science et Google Scholar essentiellement sur la période 2000–2010.

Le tableau I résume les abréviations utilisées pour les principaux cannabinoïdes couramment détectés dans les matrices biologiques.

2 Étalons et étalons internes

La plupart des cannabinoïdes présentant un intérêt pharmacologique ou médico-légal significatif sont commercialement disponibles. Certains métabolites, comme l'acide 7-carboxy-cannabidiolique, le principal métabolite du CBD,

* Correspondance : Christian Giroud, christian.giroud@chuv.ch

Tableau I. Abréviations employées pour les cannabinoïdes.

Composé	Abréviation
$\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol	THC
$\Delta 8$ -tetrahydrocannabinol	$\Delta 8$ -THC
11-hydroxy- $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol	11-OH-THC
11-nor-9-carboxy- $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol	THCCOOH
Cannabinol	CBN
Cannabidiol	CBD
acide $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinolique	THC-A
Glucuronide	gluc

restent toutefois toujours commercialement indisponibles. Des synthèses à façon sont toujours possibles par le biais de certains laboratoires expérimentés.

L'ajout d'un étalon interne précède l'extraction et l'analyse quantitative des cannabinoïdes dans les matrices biologiques. Ces étalons internes sont en général des homologues deutérés des molécules analysées, dans la mesure où ils sont commercialement disponibles. Comme ces étalons contiennent des traces de molécules non deutérées, et aussi en raison de leur prix très élevé, la concentration ajoutée doit être aussi basse que possible. Plusieurs étalons, comme le THC-A ou le THC-gluc ne sont pas disponibles ou alors proposés à des prix exorbitants par un seul fournisseur. De plus, certains métabolites comme le THC-gluc se décomposent rapidement sitôt l'ampoule ouverte. En l'absence d'analogue deutéré, un analogue de structure présentant des propriétés physicochimiques voisines est sélectionné.

3 Matrices biologiques

La stabilité des analytes dans les échantillons biologiques est un paramètre critique à prendre en considération lors de l'interprétation des résultats d'analyse quantitative. En effet, le THC et ses dérivés sont des molécules qui sont sensibles à la lumière, à la chaleur, au pH et à l'oxydation [2]. Le THC peut s'isomériser (en $\Delta 8$ -THC) et vraisemblablement aussi se polymériser. En outre, les dérivés du cannabis peuvent se lier aux glycoprotéines, notamment celles du sang [3]. Les dérivés conjugués comme les glucuronides et les sulfates peuvent être hydrolysés par voie enzymatique ou chimique. Enfin, les cannabinoïdes ont la propriété de s'adsorber à la surface des tubes de prélèvement [2]. Dans le sang natif, les cannabinoïdes sont fortement liés aux protéines plasmatiques. Des changements de la valeur de l'hématocrite ou affectant l'intégrité des protéines vont donc influencer sur la distribution des cannabinoïdes entre les différents compartiments sanguins. La stabilité des dérivés glucuronides semble dépendre de la température et de la nature du set de prélèvement. Des résultats contradictoires ont d'ailleurs été obtenus vis-à-vis des conditions optimales de stockage pour ces conjugués [4, 5]. Enfin, la dégradation des cannabinoïdes serait accélérée par la répétition des cycles de congélation/décongélation. Ces données montrent que les méthodes de prélèvement et de conservation des échantillons doivent être décrites de manière détaillée si l'on désire comparer les résultats d'analyses publiés dans la littérature scientifique ou obtenus lors de contrôles inter-laboratoires.

Les matrices biologiques présentent différentes fenêtres de détection et sont utiles comme indicateurs objectifs d'abus de drogues. Dans un article publié en 2002 sur l'utilisation de la salive et des cheveux pour le dépistage de stupéfiants, Samyn et coll. [6] présentent un tableau comparant les avantages et les inconvénients de 3 matrices biologiques (urine, salive et cheveux). Ainsi, pour la confirmation de l'abstinence d'usage de cannabis, l'analyse d'urine semble être très utile, puisque la présence de THCCOOH peut être détectée plusieurs jours, voire plusieurs semaines encore après consommation de marijuana. Par contre, les analyses de sang sont préférées pour rechercher une prise récente de cannabis et en évaluer les effets aigus sur le comportement et les performances [7]. L'analyse de la salive (fluide oral) présente un intérêt croissant car son prélèvement est moins invasif que celui du sang ou de l'urine. De plus la présence de THC dans la salive indique un usage récent du cannabis ; le THC reste en effet détectable dans cette matrice pendant quelques heures seulement après avoir fumé, la détection est même possible plus longtemps que dans le sérum [8]. L'origine du THC dans la salive est attribuée principalement à une contamination buccale survenue lors de la phase d'inhalation. Le transfert du THC et de ses métabolites du sang vers la salive apparaît comme extrêmement médiocre. Enfin, les cheveux présentent une fenêtre de détection beaucoup plus importante que le sang, la salive ou l'urine : selon la longueur des cheveux, une consommation régulière de marijuana remontant à plusieurs mois peut être mise en évidence par ce biais [7]. Cependant, contrairement aux drogues basiques, les cannabinoïdes présents dans le sang ne sont que médiocrement transférés dans la matrice capillaire si bien que les concentrations de THC y sont extrêmement faibles. De plus, les métabolites, en particulier le THCCOOH, sont encore plus mal absorbés dans les cheveux que la molécule parente. En conséquence, seules les méthodes les plus sensibles sont aptes à détecter la présence de cannabinoïdes dans les cheveux. Les concentrations élevées de THC, voire de THC-A qui sont mesurées juste après l'inhalation proviennent sans doute, comme pour la salive, d'une contamination environnementale dans le cas des cheveux [7]. La détection de métabolites du THC dans les cheveux, même à des concentrations extrêmement faibles procure sans doute une meilleure évidence d'une inhalation réelle de cannabis que la présence de THC, pouvant être issue d'une exposition passive.

3.1 Sang, plasma et sérum

3.1.1 Prélèvement

Le prélèvement de l'échantillon se fait de manière classique par ponction veineuse à l'aide d'une seringue et tube de collecte. Plusieurs millilitres sont ainsi collectés. Plus rarement, des échantillons artériels ou capillaires peuvent être prélevés. Les tubes contiennent en général un adjuvant pour stabiliser le sang et empêcher sa dégradation. Les adjuvants comme le mélange fluorure/EDTA freinent l'hydrolyse des xénobiotiques et empêchent la croissance bactérienne. Quelques études ont été menées sur les micro-volumes (typiquement moins de 100 μ L). C'est le cas de Thomas et coll. [9] qui présentent une méthode de désorption de spots de sang séchés

recueillis sur du papier buvard suivie de l'analyse par LC-MS/MS. Dans ce cas, une goutte de sang capillaire (5 μ L) est prélevée au bout du doigt et recueillie sur un papier buvard.

3.1.2 Préparation

Les échantillons sanguins ne nécessitent pas de prétraitement particulier avant l'extraction et l'analyse. Ils sont éventuellement centrifugés pour en récolter le sérum ou le plasma avant d'être stockés à 4 °C, -20 °C ou -80 °C en fonction du délai d'analyse.

3.1.3 Volume d'échantillon et concentrations habituellement mesurées

Le volume d'échantillon de sang nécessaire pour l'analyse des cannabinoïdes est habituellement de 1 mL. Pourtant, certains auteurs indiquent n'utiliser que 500 [10, 11] voire 200 ou 250 μ L [12, 13] avec des limites de quantification (LOQ) équivalentes à celles obtenues avec 1 mL d'échantillon.

La concentration de THC dans le sang complet est généralement inférieure à 20 ng/mL dans les échantillons réels [11, 14]. Pour le THCCOOH et le 11-OH-THC, les échantillons montrent des concentrations variant de 3 à 100 ng/mL et de 0,3 à 10 ng/mL respectivement. En ce qui concerne les échantillons de sérum, la concentration en THC est généralement inférieure à 70 ng/mL [15, 16]. La concentration en THCCOOH est habituellement comprise entre 5 et 300 ng/mL [15].

3.2 Urine

3.2.1 Prélèvement

Plusieurs dizaines de millilitres sont recueillies et aliquotées par le laboratoire en vue des analyses. Pour tenir compte du degré de dilution naturel de l'urine et d'une possible falsification par dilution, la concentration de la créatinine urinaire est mesurée et le rapport THCCOOH/créatinine calculé.

3.2.2 Préparation

De nombreux auteurs procèdent à une hydrolyse alcaline ou à une β -deglycuronidation avant l'extraction des composés [17–21]. Ceci permet de convertir les métabolites conjugués (glucuronides) en métabolites libres et de doser la totalité du composé. Le choix de la source de glucuronidase est déterminant, seules certaines enzymes étant capables d'hydrolyser les conjugués glucuronidés du THC. Ces deux méthodes d'hydrolyse ont été combinées pour déterminer de manière plus précise les concentrations de THC, 11-OH-THC et THCCOOH totaux dans l'urine [22]. La présence de dérivés sulfates nécessite l'emploi d'une arylsulfatase [23]. L'urine est sujette à contamination, dilution et adultération par ajout d'agents masquants, sans oublier que la substitution d'échantillon reste toujours possible. Pour ces raisons, on préfère parfois prélever d'autres échantillons moins facilement falsifiables tels que la salive ou les cheveux.

3.2.3 Volume d'échantillon et concentrations habituellement mesurées

Le volume habituel d'urine analysé est de 1 à 2 mL. Cependant, des résultats satisfaisants en terme de limites de détection (LOD < 0,5 ng/mL) et de quantification avec un volume d'échantillon de 500 μ L [20] voire avec seulement 200 μ L [17] sont mentionnés dans la littérature.

D'après les valeurs trouvées dans la littérature pour des échantillons réels [15, 24, 25], les concentrations habituellement obtenues pour le THCCOOH total varient entre 1 et 250 ng/mL. Cependant, des échantillons peuvent atteindre une concentration en THCCOOH de plus de 2000 ng/mL [24].

3.3 Cheveux

3.3.1 Prélèvement

Une mèche de cheveux est prélevée à l'arrière de la tête (vertex), au plus près possible du cuir chevelu. La période de temps investiguée dépend de la longueur des cheveux (environ 1 mois/cm). En général, on considère que des données quantitatives fiables peuvent être obtenues jusqu'à environ 6 mois.

3.3.2 Préparation

Que ce soit pour une analyse par GC ou LC-MS/MS, les cheveux sont d'abord décontaminés puis subissent une digestion alcaline avant l'extraction et l'analyse des cannabinoïdes [18, 26–33]. Ils sont mis en présence d'hydroxyde de sodium ou de potassium pendant quinze à soixante minutes et chauffés entre 75 et 100 °C [26–29, 31–33].

3.3.3 Quantité d'échantillon et concentrations habituellement mesurées

Dix à cinquante milligrammes sont nécessaires pour l'analyse des cannabinoïdes. Seuls Gambelunghe et coll. [28] préconisent l'analyse de 200 mg de cheveux.

Les analyses d'échantillons réels donnent les résultats suivants : pour le CBN et le CBD, les concentrations sont généralement comprises entre la limite de quantification et 300 pg/mg [28, 34]. En ce qui concerne le THC et le THCCOOH, les concentrations dans les cheveux varient entre 3 et 200 pg/mg et 0,1 et 10 pg/mg, respectivement [28, 29].

3.4 Salive / fluide oral

3.4.1 Prélèvement

Il existe différents kits de prélèvements salivaires [35]. Dans certains cas, il s'agit d'un bâtonnet de polypropylène avec un tampon en cellulose à l'extrémité (Statsure Saliva Sampler™, Orasure Intercept®, Immunalysis Quantisal™). Le tampon est placé dans la bouche, sous la langue pendant quelques minutes. Il est ensuite placé dans un tube contenant

1 à 3 mL de tampon de conservation. Pour d'autres kits, le prélèvement s'effectue à l'aide d'un coton à mâcher pendant plusieurs minutes. Une fois le prélèvement effectué, il est placé dans un tampon (Cozart[®]) ou dans un tube de collecte pour être centrifugé (Sarstedt Salivette[®]). Le prélèvement d'une expectoration (Acro Biotech Salicule) ou avec une solution d'extraction (Greiner Bio-One) sont d'autres techniques de prélèvement salivaire. Les performances de ces différentes méthodes de prélèvement ont été comparées [35]. Le kit Sarstedt donne des résultats décevants en raison de la forte adsorption du THC sur le tampon de prélèvement. Des rendements d'extraction satisfaisants, voire excellents ont été publiés pour les kits avec liquide de conservation. Par exemple avec le QuantisalTM, Moore et coll. [36] et Quintela et coll. [37] obtiennent des rendements d'extraction de 80–100 %. Cependant, des modes opératoires spécifiques sont recommandés pour le cannabis, comme par exemple laisser incuber le tampon dans son liquide pendant plusieurs heures (au moins 4 h) avant de procéder à son recueil et à l'analyse. Enfin, il convient de rappeler l'existence de kits commerciaux proposés sur le web et servant à masquer la présence de cannabinoïdes dans la salive [38]. Cependant, la spectrométrie de masse en tandem est certainement capable de détecter les fraudeurs malgré l'utilisation de tels kits.

3.4.2 Préparation

La salive ne nécessite pas un traitement particulier avant l'extraction des composés. Les échantillons sont stockés à -20°C en attendant d'être analysés.

3.4.3 Volume d'échantillon et concentrations habituellement mesurées

Le volume de fluide oral nécessaire pour les investigations toxicologiques est de quelques centaines de microlitres (100 à 500 μL). Comme la salive est souvent diluée par le liquide de conservation des kits de prélèvements, un volume 4 à 5 fois plus important est couramment analysé. Comme la prise de cannabis diminue la salivation et assèche la bouche [39], la collecte de salive peut s'avérer difficile. L'effet inhibiteur pourrait être influencé par le système endocannabinoïde [40].

Des prélèvements salivaires effectués lors d'études [25, 41, 42] ont permis de montrer que la concentration en THC et THCCOOH dans la salive varie généralement entre 0,5 et 200 ng/mL pour le THC, entre 10 et 100 pg/mL pour le THCCOOH libre et entre 100 et 300 pg/mL pour le THCCOOH total (libre + conjugué). Cependant, certains échantillons prélevés peu de temps après avoir fumé peuvent dépasser 350 ng de THC/mL [42].

3.5 Autres matrices alternatives

Le méconium collecté après la naissance permet la recherche de drogue pendant environ les 20 semaines qui précèdent la naissance. En cas de suspicion d'exposition à un toxique survenue après la naissance, le lait maternel et les cheveux du nouveau-né peuvent être investigués.

Une étude a été réalisée sur le méconium [43] : un screening de drogues a été effectué par extraction liquide-liquide et LC-MS/MS. Une autre étude a également été développée avec les mêmes techniques pour l'analyse de cannabinoïdes dans le cerveau de souris [44].

Quelques méthodes ont également été mises au point par GC-MS pour le méconium [45–49], la sueur [50] ou l'humeur vitrée [51]. En ce qui concerne ces dernières matrices alternatives, des méthodes par spectrométrie de masse en mode tandem sont manquantes.

Il pourrait être intéressant de se concentrer sur du plasma ou le cordon ombilical en complément du méconium pour établir un transfert du cannabis de la mère à l'enfant.

3.5.1 Préparation

Les échantillons d'humeur vitrée et de méconium subissent une hydrolyse alcaline avant l'extraction.

3.5.2 Quantité d'échantillon

Pour les analyses de méconium, les auteurs utilisent 1 g d'échantillon, à l'exception de Ristimaa et coll. [43] qui a développé une méthode avec 2 g d'échantillon.

Dans le cas de la sueur, des patchs sont appliqués sur la peau et changés chaque jour ou chaque semaine [50].

3.6 Composés, matrices et seuils de concentration

La plupart des analytes peut être retrouvée dans toutes les matrices pourvu qu'une méthode suffisamment sensible ait été appliquée. Cependant, leurs proportions relatives sont dépendantes de la matrice investiguée. Le tableau II donne un rapide aperçu de la présence des cannabinoïdes dans chaque matrice biologique.

Plusieurs sociétés savantes ont établi des directives ou des recommandations en ce qui concerne les seuils de concentrations limites. Certaines de ces valeurs ont été reprises par des organismes étatiques officiels. En septembre 2006, un groupe de travail de l'ICADTS dont la mission était d'établir des recommandations consensuelles dans le secteur de la recherche sur les drogues illégales et la conduite automobile a établi une liste de substances à tester qui mentionne les seuils de concentrations limites et les matrices biologiques à investiguer (sang complet, salive). Les experts de ce groupe qui émanaient de 9 pays et 3 continents étaient patronnés par plusieurs organisations nationales et internationales (ICADTS, EMCDDA, TIAFT, SFTA). Ces valeurs ont été reprises par le Centre national d'information sur la santé mentale américain (SAMHSA) et l'Institut National sur l'Abus de drogue (NIDA). En ce qui concerne les cheveux, la société d'analyse des cheveux (SoHT) a établi ses propres recommandations pour les valeurs seuils. Pour les concentrations dans le sérum ou le plasma, qui diffèrent de celles du sang complet, la société allemande de toxicologie et chimie forensiques (GTFCh) a également publié ses propres recommandations. Ces valeurs sont énumérées dans

Tableau II. Les analytes couramment mesurés en fonction de la matrice biologique.

Matrice	Composés présents dans la matrice
Fluide oral	essentiellement THC, THCCOOH en traces
Sang	THC, 11-OH-THC, THCCOOH
Plasma	THC, 11-OH-THC, THCCOOH, THCCOOH-gluc
Sérum	THC-A, THC, 11-OH-THC, THCCOOH, THCCOOH-gluc
Urine	principalement THCCOOH et THCCOOH-gluc, CBN, CBD, THC-A
Cheveux	THC, CBN, CBD, THCCOOH en traces
Méconium	THCCOOH

Tableau III. Valeurs seuils recommandées par diverses sociétés savantes pour les cannabinoïdes dans plusieurs matrices biologiques.

		Urine	Sang complet	Sérum Plasma	Cheveux	Salive	Sueur
THC	ICADTS*		1 ng/mL			2 ng/mL	
	SAMHSA		1 ng/mL			2 ng/mL	1 ng/patch
	GTFCh			1 ng/mL	0,02 ng/mg		
	SoHT				0,1 ng/mg		
	OFROU		1,5 ng/mL				
11-OH-THC	ICADTS*		1 ng/mL				
	SAMHSA		1 ng/mL				
	GTFCh						
	SoHT						
	OFROU						
THCCOOH	ICADTS*		5 ng/mL				
	SAMHSA	15 ng/mL	5 ng/mL				
	GTFCh	10 ng/mL		10 ng/mL			
	SoHT				0,2 pg/mg		
	OFROU						
	NIDA					10 pg/mL	

- *Consensus du groupe de travail initié par l'ICADTS (Conseil international sur l'alcool, la drogue et la sécurité routière) rédigé en 2006 au centre européen de l'Université Tufts à l'ancien monastère bénédictin de Talloires en France. Pour l'urine, les valeurs indiquées correspondent au THCCOOH total mesuré après hydrolyse alors que pour les autres matrices, il s'agit des cannabinoïdes libres.
- La valeur limite pour le THCCOOH dans la salive est suggérée d'après une publication de l'équipe de M. Huestis du NIDA (2010).

le tableau III synoptique. Les valeurs techniques légales définies en Suisse par l'Office Fédéral des Routes (OFROU) pour le sang complet y figurent aussi. Un compte rendu critique de cette problématique en rapport avec le cannabis et la conduite automobile a été publié récemment par Wille et coll. en 2010.

3.7 Préparation

3.7.1 Extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide (LLE) est principalement utilisée pour les échantillons de fluide oral [25, 42, 52–56] et occasionnellement pour le sang [11, 12, 18], l'urine [21], les cheveux [31], le méconium ou le cerveau (souris) [44]. Le mélange de solvant habituellement employé pour l'extraction des cannabinoïdes est un mélange hexane : acétate d'éthyle (9 : 1) [11, 12, 18, 25, 54] ou heptane : acétate d'éthyle (1 : 4) [31, 43, 52, 53]. Quelques auteurs privilégient un solvant unique comme l'hexane [42], le méthanol [55] ou l'acétonitrile [44]. Le THCCOOH-gluc qui est pourtant une molécule plus polaire est extrait de l'urine par l'éther diisopropylique avant d'être analysé par LC-MS/MS [10].

Les rendements d'extraction obtenus sont trop peu souvent mentionnés. Les quelques valeurs relevées dans la littérature

varient entre 40 et 100 % selon la méthode d'analyse et les molécules d'intérêt.

3.7.2 Extraction sur phase solide

L'extraction sur phase solide (SPE) est couramment utilisée pour les échantillons sanguins (sang complet, plasma, sérum) [4, 10, 14–16, 21, 57, 58] et urinaires [15, 20, 59–61]. Certains auteurs l'utilisent également pour les cheveux [28, 29, 32] ou le fluide oral [41, 62–64].

Dans le cas des échantillons d'urine, Fernandez et coll. [20], Robandt et coll. [60] et Jagerdeo et coll. [59] mentionnent l'emploi d'une phase C8. Pour les autres matrices, les phases employées sont des phases mixtes (Oasis HLB, Bond Elut Certify ou Cerex Polychrom).

Les rendements obtenus avec cette technique d'extraction varient entre 35 et 90 % suivant la matrice biologique et les composés à extraire.

3.7.3 Micro-extraction sur phase solide

À notre connaissance, une seule méthode a été développée avec une micro-extraction sur phase solide (SPME).

Ainsi, pour l'analyse du THC, du CBN et du CBD dans les cheveux, Emidio et coll. [27] ont mis au point une méthode head-space (HS)-SPME. Les rendements d'extraction sont faibles (<10 %), mais combinée à la chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse en tandem, Emidio obtient des limites de détection satisfaisantes comprises entre 7 et 31 pg/mg de cheveux.

3.7.4 Autres méthodes de préparation

Quelques autres méthodes d'extraction ont également été développées pour les cannabinoïdes. L'extraction dynamique sur phase solide (SPDE) [30] ou la micro-extraction en phase liquide (LPME) [26] ont été utilisées pour doser ces composés dans les cheveux. Cependant, les résultats obtenus ne sont pas très satisfaisants, car les rendements d'extraction sont souvent très faibles (<10 %) comparés à ceux que l'on peut obtenir avec une SPE ou une LLE.

Pour l'analyse du THCCOOH et éventuellement d'autres composés (autres drogues ou THCCOOH-gluc) dans l'urine, certains auteurs simplifient la préparation de l'échantillon et procèdent à une dilution avant l'injection directe en LC-MS/MS. Le méthanol est le solvant le plus employé : seul [24] ou mélangé à de l'eau (80 : 20) [19] ou encore à une solution d'acide formique (50 : 50) [17].

4 Chromatographie gazeuse – spectrométrie de masse en tandem

La chromatographie gazeuse semble être une méthode de choix pour l'analyse des cannabinoïdes dans les cheveux, mais elle est également utilisée pour l'analyse des autres matrices.

Le tableau IV répertorie les différentes matrices biologiques et présente les méthodes d'extraction et d'analyse employées selon les molécules d'intérêt. Le THC et le THCCOOH dans les cheveux et la salive sont les composés les plus fréquemment investigués par des techniques de GC-MS/MS. Le mode d'ionisation préféré est l'impact électronique. Les quantités d'échantillons prélevées sont moindres que celles habituellement collectées en cas d'analyse MS simple. Enfin les sensibilités (LOD) et les limites inférieures de quantification rapportées à ce jour varient considérablement, allant de 1 à 100 pg/mg pour les cheveux et de 10 pg/mL à 2,5 ng/mL pour les fluides biologiques.

4.1 Dérivation

La dérivation permet l'analyse de composés qui ne peuvent pas être directement analysés en GC (molécules thermiquement instables, température d'ébullition trop élevée...). Dans le cas des cannabinoïdes, la silylation et l'alkylation sont les deux méthodes de dérivation utilisées pour les cannabinoïdes. Pour la silylation, les réactifs employés sont le N-triméthylsilylimidazole (TMSI) [29], le N-méthyl-N-triméthylsilyltrifluoroacétamide (MSTFA) [28, 30] ou le N, O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide et triméthylchlorosilane

(BSTFA + TMCS) [25, 63]. Pour l'alkylation, les auteurs utilisent l'anhydride pentafluoropropionique (PFPA) [29, 31, 33], l'hexafluoro-2-propanol (HFIP) [11, 29] et/ou l'anhydride trifluoroacétique (TFAA) [11]. L'addition de groupes halogénés accroît de manière considérable la détectabilité des molécules par ionisation chimique en mode négatif. Cinq méthodes différentes de dérivation ont été comparées par Szirmai et coll. [65] pour l'analyse du THCCOOH.

Pourtant, la dérivation n'est pas toujours nécessaire pour l'analyse de certains cannabinoïdes et des auteurs choisissent de les analyser directement après l'extraction en GC-MS/MS [18, 26, 27, 41].

4.2 Colonne

Les colonnes GC utilisées lors de l'analyse de cannabinoïdes sont exclusivement des colonnes capillaires en silice fondue à phase stationnaire en poly-diméthylsiloxane avec 5 % de phenyl (DB-5MS, VF-5MS). En général, une colonne longue de 30 m est préconisée pour l'analyse des cheveux, alors qu'une colonne plus courte, allant de 12 à 15 m est employée pour les autres échantillons.

4.3 Mode d'ionisation

4.3.1 Impact électronique

Le mode d'ionisation par impact électronique (EI) a été employé pour toutes les matrices biologiques mais avec des succès divers. Par exemple, les résultats obtenus dans l'urine et le sang par Chiarotti et Costamagna [18] sont peu satisfaisants puisqu'ils obtiennent une LOQ de 5 ng/mL pour le THCCOOH. Pour les cheveux, les résultats sont également variables : les limites de quantification sont comprises entre 1 et 200 pg/mg selon les molécules [26, 27, 30]. Le mode d'ionisation utilisé pour la salive est rarement explicité. Seuls Chi et Cole [63] spécifient l'utilisation de l'impact électronique pour ce type de matrice et obtiennent une limite de détection de 0,2 ng/mL pour le THC. On peut supposer qu'en l'absence de toute indication, c'est l'EI qui a été utilisée.

4.3.2 Ionisation chimique

L'ionisation chimique (CI) peut être utilisée en mode positif avec du méthane [29] ou en mode négatif également avec du méthane [11, 31, 33] ou de l'ammoniac [41]. Dans les deux cas, les limites de détection et de quantification semblent meilleures que celles obtenues par EI. Dans le sang, Day et coll. [41] et Thomas et coll. [11] obtiennent des valeurs de LOQ très basses en comparaison de celles de Chiarotti et Costamagna [18] (respectivement 10 et 500 pg/mL par rapport au 5 ng/mL). Pour les cheveux, Huestis et coll. [29] mentionnent une LOQ de 1 pg/mg pour le THC et de 0,1 pour le THCCOOH en ionisation chimique positive. À l'opposé, Marsili et coll. [31] décrivent une LOD bien plus élevée (50 pg/mg) pour le THCCOOH avec la même technique d'ionisation.

Tableau IV. Analyse des cannabinoïdes par GC-MS/MS.

Composés	Matrice	Quant. éch.	Préparation	Dérivation	Colonne	Détection	LOD, LOQ, domaine	Réf.
THC, 11-OH-THC, THCCOOH	S	500 µL	Acide, LLE (hexane : acétate d'éthyle 9 :1)	Chloroforme, TFAA, HFIP	DB-5MS, 15 m × 0,25 mm, 0,25 µm	CI- mode MS/MS	LOQ : 0,5, 0,5 et 2,5 ng/mL Linéarité : 0,5–20 et 2,5–200 ng/mL	[11]
THCCOOH	U, S, C	1 mL ou 50 mg	Hydrolyse alcaline, LLE (hexane : acétate d'éthyle 9 :1)	BSTFA	5 % phenyl-methyl- silicone 12 m × 0,32 mm, 0,33 µm	EI mode MS/MS	Calibration : 5–50 ng/mL	[18]
THC, CBN, CBD	C	10 mg	Hydrolyse alcaline, HF-LPME		VF-5MS 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm	EI mode MS/MS	LOQ : 20, 1 et 1 pg/mg Linéarité : LOQ – 500 pg/mg	[26]
THC, CBN, CBD, THCCOOH	C	10 mg	Hydrolyse alcaline, HS SPME		VF-5MS 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm	EI mode MS/MS	LOD : 31, 11 et 7 pg/mg LOQ : 62, 30 et 12 pg/mg Linéarité : 0,1–8 ng/mg	[27]
THC, CBN, CBD, THCCOOH	C	200 mg	Digestion alcaline, SPE (Bond Elut Certify)	MSTFA-NH ₄ -DTE	CCP-SIL 8CB-MS 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm	EI mode MS/MS	Calibration : 10–5000 pg/mg	[28]
THC THCCOOH	C	20 mg	Digestion alcaline, SPE (Cerex polychrom)	TMSI et acétate d'éthyle ou HFIP et PFPA	DB-5MS 15 m × 0,25 mm, 1 µm	CI+ MS/MS	LOQ : 1 et 0,1 pg/mg Linéarité : 1–100 et 0,1–25 pg/mg	[29]
THC, CBN, CBD	C	10 mg	Hydrolyse alcaline, SPDE	MSTFA	DB-5MS 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm	EI, SIM et MRM	LOD : 40, 51 et 52 pg/mg LOQ : 137, 216 et 187 pg/mg Linéarité : 0,05 ou 0,1–20 ng/mg	[30]
THCCOOH	C	50 mg	Hydrolyse LLE (heptane : acétate d'éthyle 9 :1)	Pentafluoro- propanol + PFPA	Non indiquée 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm	CI- mode MS/MS	LOD : 50 pg/mg LOQ : 100 pg/mg Calibration : 0–1000 pg/mg	[31]
THCCOOH	C	25 mg	Hydrolyse alcaline, LLE (hexane : acétate d'éthyle 9 :1)	Pentafluoro- propanol + PFPA	DB-5MS 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm	CI-, MRM	LOD : 0,02 pg/mg LOQ : 0,05 pg/mg Linéarité : 0,1–10 pg/mg	[33]
THC	O	200 µL	Hydrolyse alcaline, LLE (hexane : acétate d'éthyle 9 :1)	BSTFA (1 % TMCS) + acétate d'éthyle	5 % phenyl-methyl silicone, 15 m × 0,25 mm	Non indiqué	LOQ : 0,2 ng/mL	[25]
THC	O	200 µL	SPE (HyperSpe Verify AX)	BSTFA	Non indiquée 15 m × 0,25 mm, 0,25 µm	EI MRM	LOD : 0,2 ng/mL Linéarité : 0,2–20 ng/mL	[63]
THCCOOH	O	100 µL	SPE (Cerex polychrome)	HFIP + PFPA	J&W DB-5 15 m × 0,25 mm, 1 µm	Mode négatif	LOQ : 10 pg/mL domaine : 10–240 pg/mL	[41]

Matrice : C : cheveux, U : urine, S : sang, O : fluide oral.
Détection : CI : ionisation chimique, EI : impact électronique.
Dérivation : NH₄I : iodure d'ammonium, DTE : dithioerythritol.

4.4 Validation de méthode

4.4.1 Identification et quantification

Dans la majorité des travaux, le mode MRM ou MS/MS est sélectionné. Deux transitions sont choisies selon des critères d'abondance et de sélectivité, l'une servant à la quantification et l'autre à l'identification [11, 26, 27, 29, 30, 41, 63].

4.4.2 Sélectivité

La sélectivité de la méthode est établie de deux façons : en analysant des échantillons blancs, afin de s'assurer qu'aucune interférence ne perturbe la détection des composés [11] ou en analysant des échantillons dopés avec des composés susceptibles d'être présents dans l'échantillon (autres drogues, médicaments) [41].

5 Chromatographie liquide-spectrométrie de masse en tandem

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) est une technique fréquemment utilisée pour l'analyse du THC et de ses métabolites dans les échantillons biologiques. En 2005, Marquet a rédigé un article très complet présentant la théorie et l'instrumentation de cette technique [66].

Le tableau synoptique V regroupe les méthodes de dosage des cannabinoïdes par LC-MS/MS publiées au cours de cette dernière décennie dans 30 articles. Ce tableau indique que l'approche analytique par LC-MS/MS a été appliquée à la plupart des matrices biologiques. Si dans la salive, seule la molécule parente (THC) est en général quantifiée, l'analyse porte sur une batterie de cannabinoïdes lorsque les dérivés du sang ou l'urine sont concernés. Cinq articles proposent des méthodes pour la détermination du THCCOOH-glucuronide et un seul considère l'analyse du précurseur du THC, à savoir le THC-A. Cette dernière molécule qui devrait pourtant être présente dans les cheveux contaminés par la fumée de cannabis n'est jamais analysée dans cette matrice par LC-MS/MS. Le CBN qui pourrait être utilisé comme marqueur de dégradation du THC est rarement investigué (par 4 publications). Il en va de même pour le CBD qui présente pourtant un intérêt certain en raison de son potentiel thérapeutique largement étudié et de sa possible conversion en THC dans le liquide gastrique [67]. Les méthodes d'extraction se partagent à presque égalité entre la SPE et la LLE (respectivement 16 et 12). Quelques méthodes proposent pour l'urine l'approche plus directe « diluer et injecter ». L'ionisation par ESI en mode positif est largement plébiscitée. Sur 30 articles revus, seuls 3 font appel à l'APCI dont 2 en mode positif et 1 seul en mode négatif. Aucun gain substantiel de sensibilité ne semble être obtenu en substituant l'APCI à l'ESI, que ce soit en mode positif ou négatif. Relevons que peu de travaux mentionnent l'utilisation de la photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI) pour l'analyse des cannabinoïdes [68].

5.1 Choix des colonnes

La plupart des analyses en chromatographie liquide a été réalisée avec des pompes classiques HPLC. Cependant, quelques auteurs ont bénéficié de pompes capables de travailler à des pressions très élevées, largement au-dessus du seuil maximum des pompes classiques (400 bars) [4, 19, 52, 62]. Ces pompes "UPLC" permettent l'emploi de colonnes à faible granulométrie (<2 μm) facilitant l'analyse des composés dans un laps de temps réduit généralement de l'ordre de 5 min [19, 52]. Relevons que les pics chromatographiques obtenus par UPLC pour les cannabinoïdes sont extrêmement fins, de l'ordre d'une dizaine de secondes contre une demi-minute pour les colonnes classiques, permettant ainsi un gain de sensibilité appréciable.

Pour l'analyse des cannabinoïdes, les colonnes C18 sont les plus couramment utilisées, bien qu'il soit possible de séparer les métabolites du cannabis avec une colonne C12 [21] ou une C8 [10, 16, 17]. Deux méthodes ont également été mises au point avec une colonne de type phenylhexyl pour le dosage du THC-A [15] ou d'une série de plusieurs cannabinoïdes (THC, 11-OH-THC, THCCOOH et THCCOOH-gluc) [58]. Les longueurs de colonne sont habituellement de 50 [14, 15, 19, 32, 53, 57-60, 64], 100 [4, 13, 20, 43, 52, 56, 62] ou 150 mm [10, 12, 16, 17, 24, 42, 54]. Quelques auteurs ont cependant choisi une colonne de 250 mm pour un screening [55] ou à l'opposé, une colonne de 20 mm pour l'analyse du THCCOOH uniquement [61].

5.2 Phase mobile

Les cannabinoïdes sont en général élués au moyen d'un gradient de polarité formé par des concentrations croissantes d'un solvant organique (acétonitrile ou méthanol). L'éluant est tamponné avec un tampon formate ou acétate d'ammonium acidifié avec 0,1 à 0,2 % d'acide formique. Plusieurs méthodes font abstraction de l'emploi d'un tampon [14, 19, 20, 59, 60].

La séparation des cannabinoïdes n'est pas toujours aisée : le 11-OH-THC et le THCCOOH sont souvent coélusés, en particulier lorsque le pH d'éluion est bas. Cependant, un pH soigneusement ajusté à des valeurs plus élevées permet leur séparation. Par exemple, avec un pH de respectivement 8,6 et de 6,5, Coulter et coll. [57] et Maralikova et Weinmann [58] parviennent à séparer ces 2 métabolites du cannabis avec un intervalle de temps de 1,5 à 2 min.

5.3 Mode d'ionisation

5.3.1 Électrospray

L'ionisation par électrospray (ESI) est la méthode de choix pour le couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse en tandem. Essentiellement utilisée en mode positif pour l'analyse des cannabinoïdes, elle est parfois utilisée en mode négatif pour l'analyse d'un métabolite particulier comme le THC-A [15] ou le THCCOOH [17] qui sont des molécules acides (pK de 4,5 pour le THCCOOH) contrairement aux autres qui sont des molécules basiques (pK de 10,6 pour le THC).

Tableau V. Analyse des cannabinoïdes par LC-MS/MS.

Composés	Matrice	Quant. éch.	Préparation	Colonne	Phase mobile	Détection	LOD, LOQ, domaine	Ref.
THC	O	500 µL	SPE (Oasis HLB)	Atlantis dC18 3µm phase inverse (50 × 2,1 mm)	A : ACN B : H ₂ O + 0,1 % FA	ESI+, MRM	LOQ : 1 ng/mL Linéarité : 1–200 ng/mL	[64]
THC	O	200 mg	SPE (Bond Elut Certify)	Acquity UPLC HSS T3 C18 100 × 2,1 mm, 1,8 µm	A : NH ₄ Ac 2 mM B : MeOH	ESI+, MRM	LOQ : 0,5 µg/kg Domaine : 0,5–100 µg/kg	[62]
THC	O	500 µL	LLE acétate d'éthyle : heptane (4 : 1)	Waters Atlantis dC18 2,1 × 50 mm, 3,5 µm	A : ACN B : NH ₄ Ac 5 mM pH 5	ESI+, MRM	LOQ : <0,16 ng/mL Calibration : 1,6–16 ng/mL	[53]
THC	O	100 ou 500 µL	pH = 6-7 LLE hexane	XTerra MS C18 150 × 2,1 mm, 3,5 µm	Isocratique : 1 mM formate d'ammonium : MeOH (10 : 90)	ESI+, MRM	LOQ : 0,1 ou 0,5 ng/mL domaine : 0,1–10 ou 0,5–100 ng/mL	[42]
THC	O	400 µL	LLE heptane : acétate d'éthyle (1 : 4)	Acquity UPLC BEH C18 100 × 2,1 mm, 1,7 µm	A : H ₂ O + 2 mM carbonate d'ammonium pH 9,3 B : MeOH	ESI+, MRM	LOQ : 1 ng/mL Linéarité : 1–200 ng/mL	[52]
THC	O	600 µL	LLE Tox tubes A	Waters Atlantis T3 100 × 2,1 mm, 3 µm	A : ACN : 2 mM formate d'ammonium (95 : 5) B : 2 mM formate d'ammonium : ACN (95 : 5)	ESI+, MRM	LOD : 0,4 ng/mL LOQ : 1,1 ng/mL Linéarité : 1–200 ng/mL	[56]
THC	O	1 mL	LLE isopropanol : DCM : heptane (10 : 25 : 65)	XTerra MS C18 100 × 2,1 mm, 3,5 µm	A : tampon formate pH 3 B : ACN	ESI+ MRM	LOQ : 2 ng/mL : Calibration : 2–100 ng/mL	[69]
THC, THCCOOH	O	500 µL	LLE hexane : acétate d'éthyle (9 : 1)	XTerra C18 MS 150 × 2,1 mm, 3,5 µm	A : 10 mM formate d'ammonium B : MeOH	ESI+	LOD : 0,05 et 0,2 ng/mL LOQ : 0,1 et 0,5 ng/mL Linéarité : LOQ–100 ng/mL	[54]
THC, THCCOOH	O, P	150 µL	LLE (MeOH)	Reversed phase C18 Alltima, 250 × 4,6 mm, 5 µm	A : ACN B : H ₂ O	ESI+, MRM	LOQ (P) : 5 et 4,3 ng/mL LOQ (O) : 3,7 et 3,5 ng/mL Linéarité : LOQ–100 ng/mL	[55]
THC, 11-OH-THC, THCCOOH, CBN, CBD	P	1 mL	SPE (Bond Elut Certify)	Synergi MAX-RP 80A C12 2 × 7,5 mm, 4 µm	A : 10 mM formate d'ammonium B : ACN : 10 mM formate d'ammonium 9 : 1	APCI+	LOQ : 0,2 ng/mL Calibration : 0,2–100 ng/mL	[21]
THC, 11-OH-THC, THCCOOH, THCCOOH-glyc	P	1 mL	SPE (Chromabond C18)	Luna phenylhexyl 50 × 2 mm, 3 µm	A : NH ₄ Ac 5 mM (pH 6,5) B : ACN	ESI+ MRM	LOQ : 0,8, 0,8 et 4,3 ng/mL Linéarité : LOQ–100 ou 500 ng/mL	[58]

Tableau V. Suite.

Composés	Matrice	Quant. éch.	Préparation	Colonne	Phase mobile	Détection	LOD, LOQ, domaine	Réf.
THC, THCCOOH	S	1 mL	SPE (Fluoro-C10)	Intakt US C18 50 × 2 mm, 5 µm	A : H ₂ O + 0,1 % FA B : ACN + 0,1 % FA	MRM +/-	LOQ : 0,25 ng/mL Linéarité : 0,25–50 ng/mL	[14]
THC, 11-OH-THC, THCCOOH	S	1 mL	SPE (Bond Elut Certify)	Acquity UPLC BEH C18 100 × 2,1 mm, 1,7 µm	A : 0,1 % HCOOH B : ACN	ESI+, MRM	LOQ : 0,05, 0,1 et 0,2 ng/mL Linéarité : LOQ-50 ng/mL	[4]
THC, 11-OH-THC, THCCOOH	S	250 µL	LLE (hexane : acétate d'éthyle 90 : 10)	XBridge C18 150 × 2,1 mm, 3,5 µm	Isocratique : MeOH : 0,1 % FA (80 : 20)	ESI+	LOQ : 0,5, 1 et 2 ng/mL Linéarité : LOQ-40 et LOQ-160 ng/mL	[12]
THC, 11-OH-THC, THCCOOH	S	200 µL	SPE on line (Polar RP)	Luna C8 100 × 2 mm, 3 µm	A : H ₂ O 0,1 % FA B : ACN 0,2 % FA	ESI+, SRM	LOD : 0,18, 0,18, 0,85 ng/mL LOQ : 0,44, 0,45, 2,0 ng/mL Linéarité : 0,5–20 ng/mL (THC) 2,5–100 µg/ml (11-OH-THC, THCCOOH)	[13]
THC, 11-OH-THC, THCCOOH	S	1 mL	SPE (Cerex)	narrow-bore Zorbax C18 50 × 2,1 mm, 1,8 µm	A : formate d'ammonium 20 mM pH 8,6 B : MeOH	ESI+	LOQ : 0,5, 2 et 4 ng/mL Linéarité : LOQ-100 ng/mL	[57]
THC-A Sérum	U	1 mL	SPE (Chromabond C18)	Luna phenylhexyl 50 × 2 mm, 3 µm	A : NH ₄ Ac 5 mM B : ACN	ESI- MRM	LOQ (U) : 5 ng/mL LOQ (Sérum) : 7,5 ng/mL Linéarité : LOQ-75 ou 100 ng/mL	[15]
THC, 11-OH-THC, THCCOOH, CBD, CBN	U	1 mL	SPE on line (C8-endcapped)	XTerra MS C18 50 × 3 mm, 5 µm	A : H ₂ O 0,1 % FA B : ACN 0,1 % FA	ESI+ MRM	LOQ : 8, 6, 6, 9 et 12 ng/mL Quantification : LOQ-500 ng/mL	[59]
THCCOOH	U	3 mL	Automated SPE (C8 EC-SE)	Xbridge C8 50 × 2,1, 3,5 µm	A : ACN B : H ₂ O + 0,2 % FA	ESI+ MRM	LOQ : 2 ng/mL Calibration : 7–2000 ng/mL	[60]
THCCOOH	U	2 mL	SPE (Chromabond C18 endcapped)	XTerra MS C18 3,9 × 20 mm, 3,5 µm	A : 1 mM formate d'ammonium, 0,1 % FA B : MeOH	APCI-	LOD : 2,0 ng/mL LOQ : 5,1 ng/mL Calibration : 0–500 ng/mL	[61]
THC, 11-OH-THC, THCCOOH, CBD, CBN	U	2,5 mL	β-glucuronidase, LLE diéthyléther : acétate d'éthyle (50 : 50)	MAX-RP 80A C12 2 × 7,5 mm, 4 µm	A : 10 mM formate d'ammonium pH 3 B : ACN : 10 mM formate d'ammonium 9 : 1	APCI+	LOQ : CBN : 3 ; THC, CBD et THCCOOH : 1 ; 11-OH-THC : 2 ng/mL Calibration : 0,2–100 ng/mL	[21]
THCCOOH	U	500 µL	β-glucuronidase, dilution eau-MeOH (80 : 20)	Zorbax Eclipse XBD-C18 50 × 4,6 mm, 1,8 µm	A : H ₂ O + 0,1 % FA B : ACN + 0,1 % FA	ESI+ SRM	Cut-off : 20 ng/mL Calibration : 0–75 ng/mL	[19]

Tableau V. Suite.

Composés	Matrice	Quant. éch.	Préparation	Colonne	Phase mobile	Détection	LOD, LOQ, domaine	Réf.
THCCOOH	U	200 µL	NaOH, dilution MeOH/HAc (1:1)	Zorbax RX-C8 150 × 2,1 mm, 5 µm	A : H ₂ O/0,001 % acide acétique, 1 mM NH ₄ Ac B : MeOH/0,001 % acide acétique, 1 mM NH ₄ Ac	ESI+/-	LOD : <0,5 ng/mL LOQ : 7,5 ng/mL Calibration : 5-40 ng/mL	[17]
THCCOOH	U	500 µL	Dilution MeOH	Synergi polar 150 × 2 mm, 4 µm	A : H ₂ O + 0,01 % FA B : MeOH C : ACN	ESI+ MS/MS	LOD : 5 ng/mL LOQ : 10 ng/mL Calibration : 5-1000 ng/mL	[24]
THCCOOH	U	500 µL	Hydrolyse, on line-SPE (HySphere C8)	Atlantis dC18, 100 × 3 mm, 3 µm	Isocratique : 0,1 % FAH : ACN (20 : 80)	ESI+ MRM	LOD : 0,25 ng/mL LOQ : 5 ng/mL Linéarité : 5-200 ng/mL	[20]
THCCOOH	U	500 µL	LLE (éther diisopropylique)	Zorbax Eclipse XBD C8 150 × 2,1 mm, 5 µm	ACN-MeOH-NH ₄ Ac 20 mM, pH 4,0 (41 : 41 : 18)	ESI+	LOD : 1,4 ng/mL LOQ : 6,0 et 6,6 ng/mL Linéarité : 10-500 ng/mL	[10]
THCCOOH	P	500 µL	SPE (HF Bond Elut Certify)	Zorbax Eclipse XBD C8 150 × 2,1 mm, 5 µm	ACN-MeOH-NH ₄ Ac 20 mM, pH 4,0 (41 : 41 : 18)	ESI+	LOD : 0,6 et 1,1 ng/mL LOQ : 2,4 et 4,5 ng/mL Linéarité : 10-500 ng/mL	[10]
THCCOOH	Sérum	500 µL	SPE (HF Bond Elut Certify)	Zorbax Eclipse XBD C8 150 × 2,1 mm, 5 µm	ACN-MeOH-NH ₄ Ac 20 mM, pH 4,0 (41 : 41 : 18)	ESI+	LOD : 1,1 ng/mL	[16]
THCCOOH	M	2 g	LLE (MeOH) puis LLE (heptane : acétate d'éthyle)	Phenomenex Genesis C18 100 × 2,1 mm, 4 µm	A : NH ₄ Ac 10 mM pH 3,2 B : ACN	ESI+	LOD : 20 ng/g	[43]
THC	C	20 mg	SPE (Cerex Polychrom)	narrow-bore Zorbax C18 50 × 2,1 mm, 1,8 µm	A : 20 mM formate d'ammonium pH 8,6 B : MeOH	ESI+	LOQ : 10 pg/mg Linéarité : 10-1000 pg/mg	[32]
CBD, THC, 11-OH-THC, THCCOOH, CBC	B (souris)	0,35-0,47 g	LLE (acétonitrile)	Zorbax Eclipse XDB-C18 4,6 × 75 mm, 3,5 µm	Isocratique : H ₂ O : MeOH (10 : 90) 0,1 mM formate d'ammonium	ESI+ MRM	LOQ (THC, 11-OH-THC, THCCOOH) : 1 ng/g LOQ (CBD, CBC) : 0,5 ng/g Linéarité : LOQ-20 ou 200 ng/g	[44]

Matrice : O : fluide oral, P : plasma, S : sang, U : urine, C : cheveux, M : méconium, B : cerveau.
Phase mobile : DCM : dichlorométhane, FA : acide formique, ACN : acétonitrile, MeOH : méthanol, NH₄Ac : acétate d'ammonium.
Détection : ESI : ionisation par électrospray, APCI : ionisation chimique à pression atmosphérique.
Composé : CBC : cannabichromène.

De plus, l'ESI est souvent associée à une détection MRM (Multiple Reaction Monitoring) sur des appareils à triple quadripôles, ce qui permet d'augmenter la sensibilité et la sélectivité. Les LOQ obtenues sont ainsi en général inférieures ou égales à 1 ng/mL pour la salive et les échantillons sanguins. Pour l'urine, les limites de quantification varient entre 1 et 10 ng/mL.

5.3.2 Ionisation chimique à pression atmosphérique

L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) n'est pas aussi souvent utilisée que l'ESI pour l'analyse des cannabinoïdes. Pourtant, que ce soit en mode positif [21] ou négatif [61], l'APCI permet d'obtenir des résultats satisfaisants puisque les limites de quantification obtenues dans ce cas varient entre 1 et 5 ng/mL. Ces valeurs sont cependant légèrement supérieures aux valeurs que l'on peut obtenir avec l'ionisation par électrospray.

5.3.3 Autres modes d'ionisation

Certains fournisseurs proposent une source PhotoSpray® (APPI) pour l'ionisation des composés ce qui permet une meilleure ionisation des composés légèrement polaires (Poster n° 42 de ABSciex). Hughes et coll. [68] ont comparé les performances respectives de l'APCI, de l'ESI et l'APPI pour l'analyse du THC, du 11-OH-THC et du THCCOOH dans le sang. La sensibilité était améliorée lorsque l'APCI remplaçait l'ESI comme mode d'ionisation. Le THC était détecté de manière plus sensible en mode positif alors que le mode négatif était préférable pour les autres cannabinoïdes. L'APPI était 3 à 5 fois plus sensible pour les 3 cannabinoïdes. Il pourrait donc être intéressant de tester et de développer une méthode analytique pour les cannabinoïdes avec ce mode d'ionisation pour d'autres matrices biologiques que le sang.

5.4 Validation de méthode

5.4.1 Identification

Dans presque la totalité des travaux, le mode MRM est sélectionné. Deux transitions sont mesurées, l'une servant à la quantification et l'autre à l'identification. Le rapport signal sur bruit doit être supérieur ou égal à 3 (LOD), avec un critère d'acceptation pour les rapports ioniques inférieur ou égal à 30 % et une déviation du temps de rétention inférieure à 3,5 % par rapport à celle du contrôle correspondant [12].

5.4.2 Effets de matrice

Afin de mettre à jour d'éventuels effets de matrices, des échantillons blancs sont extraits, puis dopés avec les analytes et analysés par LC-MS/MS. Les résultats obtenus sont alors comparés à ceux obtenus lors d'injection directe de standards [4, 12, 55]. Les résultats obtenus sont variables : entre 6 et 25 % de réduction du signal selon les auteurs et les composés.

6 Expérience personnelle

La GC-MS en mode tandem a notre préférence quand il s'agit de déterminer les concentrations des trois cannabinoïdes majeurs (THC, 11-OH-THC, THCCOOH). Nous donnons la priorité aux dérivés halogénés combinés au mode d'ionisation chimique négative qui permet d'atteindre les limites de quantification les plus basses [11]. Pour des analyses de routine moins exigeantes, une analyse en GC-MS/MS après ionisation par impact électronique des dérivés silylés est satisfaisante (limite inférieure de quantification voisine du ng/mL). Si on veut élargir la palette des cannabinoïdes investigués aux métabolites conjugués et à d'autres dérivés polaires, la LC-MS en mode tandem est la méthode de prédilection. Toutefois, seuls les équipements les plus sensibles permettent d'atteindre les valeurs seuils les plus basses. Un choix particulier devra aussi être apporté à la sélection de la méthode d'extraction qui aura une influence déterminante sur la sensibilité du processus analytique. Pour l'heure, il faut bien avouer qu'il existe une grande variété de méthodes d'extraction proposées et qu'aucune ne semble sortir du lot. Une méthode générale s'appliquant à l'ensemble des cannabinoïdes est aussi manquante.

7 Conclusion

La spectrométrie de masse en tandem est une technique qui se popularise rapidement en raison de l'amélioration combinée des performances et de la baisse de prix. De nombreuses publications récentes ont démontré son utilité pour la détermination des cannabinoïdes dans des matrices biologiques variées. Lorsqu'elle est associée à la chromatographie en phase gazeuse ou la chromatographie liquide à haute pression, elle rend possible la mesure du THC et de ses métabolites dans des domaines de concentrations qui sont en rapport avec les effets du THC. L'augmentation de la sensibilité des appareillages permet d'injecter directement un échantillon d'urine dilué dans un LC-MS/MS, sans dérivation préalable, ce qui simplifie grandement l'analyse de cette matrice.

Dans le proche futur, des méthodes encore plus versatiles, capables d'analyser une batterie de cannabinoïdes caractérisés par des propriétés physicochimiques variées seront sans doute développées. L'effort de recherche se déplacera sans doute des cannabinoïdes naturels vers les cannabinoïdes de synthèse dont l'usage pourrait se répandre dans la population [70]. L'automatisation des phases d'extraction et leur couplage direct avec les appareillages MS/MS devrait permettre un gain de temps appréciable dans la préparation et l'analyse des cannabinoïdes. Des solutions innovantes sont de plus en plus proposées. L'une d'elles est la technique d'extraction automatisée sur pointes de pipettes jetables (DPX) contenant un gel de silice monolithique, une autre pourrait être l'extraction automatisée de microvolumes de sang séché sur buvard, ou encore la chromatographie d'affinité avec les polymères à empreinte moléculaire (MIPs) [71]. En ce qui concerne les interfaces, la photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI) devrait trouver avec les molécules apolaires que sont les cannabinoïdes de synthèse ou naturels un nouveau champ d'application [72]. La sensibilité des filtres de masses qui s'est accrue

de manière spectaculaire avec la mise à disposition des quadripôles triples récents, des systèmes hybrides, des trappes 3D et 2D comme l'OrbitrapTM ou encore les analyseurs à temps de vol (TOF) [73] devrait faciliter la détection des cannabinoïdes de synthèse les plus actifs. Enfin, il est intéressant de mentionner la mise sur le marché de colonnes HPLC avec des particules à noyau dur, mais recouverte d'une couche à faible porosité (colonnes de type Kinetex de Phenomenex ou Poroshell de Agilent). Ces colonnes permettent de réduire les effets de la diffusion d'Eddy (terme A de l'équation de Van Deemter) et ainsi d'augmenter l'efficacité de la séparation par rapport à des colonnes complètement poreuses sans avoir besoin d'un équipement de type UPLC.

Remerciements. Les auteurs remercient le Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique (FNS 320030_127507/1) et la Faculté de Biologie et Médecine de l'Université de Lausanne (projet multidisciplinaire FBM) pour leur soutien financier.

Conflit d'intérêt. Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

- Giroud C, Bollmann M, Thomas A, Mangin P, Favrat B. Cannabis: what are the risks? *Ann Toxicol Anal.* 2009; 20(4): 183-205.
- Garrett ER, Hunt CA. Physicochemical properties, solubility, and protein binding of delta9-tetrahydrocannabinol. *J Pharm Sci.* 1974; 63(7): 1056-1064.
- Spahn-Langguth H, Benet LZ. Acyl glucuronides revisited: is the glucuronidation process a toxification as well as a detoxification mechanism? *Drug Metab Rev.* 1992; 24(1): 5-47.
- Jamey C, Szwarc E, Traçqui A, Ludes B. Determination of cannabinoids in whole blood by UPLC-MS-MS. *J Anal Toxicol.* 2008; 32(5): 349-354.
- Schwilke EW, Schwoppe DM, Karschner EL, Lowe RH, Darwin WD, Kelly DL, Goodwin RS, Gorelick DA, Huestis MA. Delta9-tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC, and 11-nor-9-carboxy-THC plasma pharmacokinetics during and after continuous high-dose oral THC. *Clin Chem.* 2009; 55(12): 2180-2189.
- Samyn N, Areschka A, Kintz P. Place of oral fluid and hair for workplace drug testing. *Ann Toxicol Anal.* 2002; 14(1): 33-42.
- Musshoff F, Madea B. Review of biologic matrices (urine, blood, hair) as indicators of recent or ongoing cannabis use. *Ther Drug Monit.* 2006; 28(2): 155-163.
- Toennes SW, Ramaekers JG, Theunissen EL, Moeller MR, Kauert GF. Pharmacokinetic properties of delta9-tetrahydrocannabinol in oral fluid of occasional and chronic users. *J Anal Toxicol.* 2010; 34(4): 216-221.
- Thomas A, Deglon J, Steimer T, Mangin P, Daali Y, Staub C. On-line desorption of dried blood spots coupled to hydrophilic interaction/reversed-phase LC/MS/MS system for the simultaneous analysis of drugs and their polar metabolites. *J Sep Sci.* 2010; 33(6-7): 873-879.
- Skopp G, Potsch L. Stability of 11-nor-delta(9)-carboxy-tetrahydrocannabinol glucuronide in plasma and urine assessed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2002; 48(2): 301-306.
- Thomas A, Widmer C, Hopfgartner G, Staub C. Fast gas chromatography and negative-ion chemical ionization tandem mass spectrometry for forensic analysis of cannabinoids in whole blood. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 45(3): 495-503.
- Del Mar Ramirez Fernandez M, De Boeck G, Wood M, Lopez-Rivadulla M, Samyn N. Simultaneous analysis of THC and its metabolites in blood using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008; 875(2): 465-470.
- König S, Aebi B, Lanz S, Gasser M, Weinmann W. On-line SPE LC-MS/MS for the quantification of Delta9-tetrahydrocannabinol (THC) and its two major metabolites in human peripheral blood by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2011; 400(1): 9-16.
- Elian AA, Hackett J. Solid-phase extraction and analysis of THC and carboxy-THC from whole blood using a novel fluorinated solid-phase extraction sorbent and fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2009; 33(8): 461-468.
- Jung J, Kempf J, Mahler H, Weinmann W. Detection of Delta9-tetrahydrocannabinolic acid A in human urine and blood serum by LC-MS/MS. *J Mass Spectrom.* 2007; 42(3): 354-360.
- Skopp G, Potsch L. Cannabinoid concentrations in spot serum samples 24-48 h after discontinuation of cannabis smoking. *J Anal Toxicol.* 2008; 32(2): 160-164.
- Chebbah C, Pozo OJ, Deventer K, Van Eenoo P, Delbeke FT. Direct quantification of 11-nor-Delta(9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry in relation to doping control analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2010; 24(8): 1133-1141.
- Chiarotti M, Costamagna L. Analysis of 11-nor-9-carboxy-delta(9)-tetrahydrocannabinol in biological samples by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC/MS-MS). *Forensic Sci Int.* 2000; 114(1): 1-6.
- Eichhorst JC, Etter ML, Rousseaux N, Lehotay DC. Drugs of abuse testing by tandem mass spectrometry: a rapid, simple method to replace immunoassays. *Clin Biochem.* 2009; 42(15): 1531-1542.
- Fernandez Mdel M, Wille SM, Samyn N, Wood M, Lopez-Rivadulla M, De Boeck G. On-line solid-phase extraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for high throughput analysis of 11-nor-Delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009; 877(22): 2153-2157.
- Grauwiler SB, Scholer A, Drewe J. 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 Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007; 850(1-2): 515-522.
- Schwilke EW, Gullberg RG, Darwin WD, Chiang CN, Cadet JL, Gorelick DA, Pope HG, Huestis MA. Differentiating new cannabis use from residual urinary cannabinoid excretion in chronic, daily cannabis users. *Addiction.* 2010; 106(3): 499-506.
- Kemp P, Abukhalaf IK, Manno JE, Manno BR, Alford DD, McWilliams ME, Nixon FE, Fitzgerald MJ, Reeves RR, MJ W. Cannabinoids in humans. II. The influence of three methods of hydrolysis on the concentration of THC and two metabolites in urine. *J Anal Toxicol.* 1995; 19: 292-298.
- Felli M, Martello S, Chiarotti M. LC-MS-MS method for simultaneous determination of THCCOOH and THCCOOH-

- glucuronide in urine: Application to workplace confirmation tests. *Forensic Sci Int.* 2010; 204(1-3): 67-73.
25. Niedbala RS, Kardos KW, Fritch DF, Kardos S, Fries T, Waga J, Robb J, Cone EJ. Detection of marijuana use by oral fluid and urine analysis following single-dose administration of smoked and oral marijuana. *J Anal Toxicol.* 2001; 25(5): 289-303.
 26. Emidio ES, de Menezes Prata V, de Santana FJ, Dorea HS. Hollow fiber-based liquid phase microextraction with factorial design optimization and gas chromatography-tandem mass spectrometry for determination of cannabinoids in human hair. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010; 878(24): 2175-2183.
 27. Emidio ES, Prata Vde M, Dorea HS. Validation of an analytical method for analysis of cannabinoids in hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2010; 670(1-2): 63-71.
 28. Gambelunghe C, Rossi R, Ferranti C, Bacci M. Hair analysis by GC/MS/MS to verify abuse of drugs. *J Appl Toxicol.* 2005; 25(3): 205-211.
 29. Huestis MA, Gustafson RA, Moolchan ET, Barnes A, Bourland JA, Sweeney SA, Hayes EF, Carpenter PM, Smith ML. Cannabinoid concentrations in hair from documented cannabis users. *Forensic Sci Int.* 2007; 169(2-3): 129-136.
 30. Lachenmeier DW, Kroener L, Musshoff F, Madea B. Application of tandem mass spectrometry combined with gas chromatography and headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of drugs of abuse in hair samples. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2003; 17(5): 472-478.
 31. Marsili R, Martello S, Felli M, Fiorina S, Chiarotti M. Hair testing for delta9-THC-COOH by gas chromatography/tandem mass spectrometry in negative chemical ionization mode. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2005; 19(11): 1566-1568.
 32. Coulter C, Taruc M, Tuyay J, Moore C. Quantitation of tetrahydrocannabinol in hair using immunoassay and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Drug Test Anal.* 2009; 1(5): 234-239.
 33. Kim JY, In MK. Determination of 11-nor-Delta(9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using gas chromatography/tandem mass spectrometry in negative ion chemical ionization mode. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2007; 21(7): 1339-1342.
 34. Skopp G, Strohbeck-Kuehner P, Mann K, Hermann D. Deposition of cannabinoids in hair after long-term use of cannabis. *Forensic Sci Int.* 2007; 170(1): 46-50.
 35. Langel K, Engblom C, Pehrsson A, Gunnar T, Ariniemi K, Lillsunde P. Drug testing in oral fluid-evaluation of sample collection devices. *J Anal Toxicol.* 2008; 32(6): 393-401.
 36. Moore C, Vincent M, Rana S, Coulter C, Agrawal A, Soares J. Stability of Delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC) in oral fluid using the Quantisal collection device. *Forensic Sci Int.* 2006; 164(2-3): 126-130.
 37. Quintela O, Crouch DJ, Andrenyak DM. Recovery of drugs of abuse from the Immunalysis Quantisal oral fluid collection device. *J Anal Toxicol.* 2006; 30(8): 614-616.
 38. Document consulté le 20 décembre sur le site <http://www.alwaystestclean.com>.
 39. Grotenhermen F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin Pharmacokinet.* 2003; 42(4): 327-360.
 40. Prestifilippo JP, Fernandez-Solari J, Medina V, Rettori V, Elverdin JC. Role of the endocannabinoid system in ethanol-induced inhibition of salivary secretion. *Alcohol Alcohol.* 2009; 44(5): 443-448.
 41. Day D, Kuntz DJ, Feldman M, Presley L. Detection of THCA in oral fluid by GC-MS-MS. *J Anal Toxicol.* 2006; 30(9): 645-650.
 42. Laloup M, Ramirez Fernandez Mdel M, Wood M, De Boeck G, Henquet C, Maes V, Samyn N. Quantitative analysis of delta9-tetrahydrocannabinol in preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2005; 1082(1): 15-24.
 43. Ristimaa J, Gergov M, Pelander A, Halmesmaki E, Ojanpera I. Broad-spectrum drug screening of meconium by liquid chromatography with tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 398(2): 925-935.
 44. Poklis JL, Thompson CC, Lichtman AH, Poklis A. Disposition of cannabichromene, cannabidiol and delta-9-tetrahydrocannabinol and its metabolites in mouse brain following marijuana inhalation determined by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2010; 34: 516-520.
 45. Coles R, Clements TT, Nelson GJ, McMillin GA, Urry FM. Simultaneous analysis of the Delta9-THC metabolites 11-nor-9-carboxy-Delta9-THC and 11-hydroxy-Delta9-THC in meconium by GC-MS. *J Anal Toxicol.* 2005; 29(6): 522-527.
 46. ElSohly MA, Feng S. delta 9-THC metabolites in meconium: identification of 11-OH-delta 9-THC, 8 beta,11-diOH-delta 9-THC, and 11-nor-delta 9-THC-9-COOH as major metabolites of delta 9-THC. *J Anal Toxicol.* 1998; 22(4): 329-335.
 47. Feng S, ElSohly MA, Salamone S, Salem MY. Simultaneous analysis of delta9-THC and its major metabolites in urine, plasma, and meconium by GC-MS using an immunoaffinity extraction procedure. *J Anal Toxicol.* 2000; 24(6): 395-402.
 48. Marchei E, Pellegrini M, Pacifici R, Palmi I, Lozano J, Garcia-Algar O, Pichini S. Quantification of Delta9-tetrahydrocannabinol and its major metabolites in meconium by gas chromatographic-mass spectrometric assay: assay validation and preliminary results of the "meconium project". *Ther Drug Monit.* 2006; 28(5): 700-706.
 49. Moore C, Lewis D, Becker J, Leikin J. The determination of 11-nor-delta 9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THCCOOH) in meconium. *J Anal Toxicol.* 1996; 20(1): 50-51.
 50. Huestis MA, Scheidweiler KB, Saito T, Fortner N, Abraham T, Gustafson RA, Smith ML. Excretion of Delta9-tetrahydrocannabinol in sweat. *Forensic Sci Int.* 2008; 174(2-3): 173-177.
 51. Lin DL, Lin RL. Distribution of 11-nor-9-carboxy-Delta9-tetrahydrocannabinol in traffic fatality cases. *J Anal Toxicol.* 2005; 29(1): 58-61.
 52. Goessaert AS, Pil K, Veramme J, Verstraete A. Analytical evaluation of a rapid on-site oral fluid drug test. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 396(7): 2461-2468.
 53. Oiestad EL, Johansen U, Christophersen AS. Drug screening of preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2007; 53(2): 300-309.
 54. Quintela O, Andrenyak DM, Hoggan AM, Crouch DJ. A validated method for the detection of Delta 9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- Delta 9-tetrahydrocannabinol in oral fluid samples by liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2007; 31(3): 157-164.
 55. Sergi M, Bafille E, Compagnone D, Curini R, D'Ascenzo G, Romolo FS. Multiclass analysis of illicit drugs in plasma and oral fluids by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 2009; 393(2): 709-718.

56. Simoes SS, Ajenjo AC, Franco JM, Vieira DN, Dias MJ. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the qualitative and quantitative analysis of illicit drugs and medicines in preserved oral fluid. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2009; 23(10): 1451-1460.
57. Coulter C, Miller E, Crompton K, Moore C. Tetrahydrocannabinol and two of its metabolites in whole blood using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2008; 32(8): 653-658.
58. Maralikova B, Weinmann W. Simultaneous determination of Delta9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-Delta9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-Delta9-tetrahydrocannabinol in human plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2004; 39(5): 526-531.
59. Jagerdeo E, Montgomery MA, Karas RP, Sibum M. A fast method for screening and/or quantitation of tetrahydrocannabinol and metabolites in urine by automated SPE/LC/MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 398(1): 329-338.
60. Robandt PV, Klette KL, Sibum M. Automated solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of 11-nor-Delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in human urine specimens: application to a high-throughput urine analysis laboratory. *J Anal Toxicol.* 2009; 33(8): 456-460.
61. Weinmann W, Goerner M, Vogt S, Goerke R, Pollak S. Fast confirmation of 11-nor-9-carboxy-Delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC-COOH) in urine by LC/MS/MS using negative atmospheric-pressure chemical ionisation (APCI). *Forensic Sci Int.* 2001; 121(1-2): 103-107.
62. Badawi N, Simonsen KW, Steentoft A, Bernhoft IM, Linnet K. Simultaneous screening and quantification of 29 drugs of abuse in oral fluid by solid-phase extraction and ultraperformance LC-MS/MS. *Clin Chem.* 2009; 55(11): 2004-2018.
63. Chi E, Cole J. Detecting Marijuana in Saliva. *Forensic Magazine.* 2010; 7(5): 17-20.
64. Concheiro M, de Castro A, Quintela O, Cruz A, Lopez-Rivadulla M. Determination of illicit and medicinal drugs and their metabolites in oral fluid and preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2008; 391(6): 2329-2338.
65. Szirmai M, Beck O, Stephansson N, Halldin MM. A GC-MS study of three major acidic metabolites of delta 1-tetrahydrocannabinol. *J Anal Toxicol.* 1996; 20(7): 573-578.
66. Marquet P. LC-MS and LC-MS/MS theory and instruments applicable to toxicology. *Ann Toxicol Anal.* 2005; 17(1): 5-12.
67. Watanabe K, Itokawa Y, Yamaori S, Funahashi T, Kimura T, Kaji T, Usami N, Yamamoto I. Conversion of cannabidiol to delta-9-tetrahydrocannabinol and related cannabinoids in artificial gastric juice, and their pharmacological effects in mice. *Forensic Toxicol.* 2007; 25: 16-21.
68. Hughes J, Andrenyak D, Crouch D, Slawson M. Abstract : Comparison of LC-MS Ionization Techniques for Cannabinoid Analysis in Blood. *J Anal Toxicol.* 2003; 27: 191.
69. Simonin J, Salquebre G, Cirimele V, Kintz P. Screening for illicit drugs in oral fluid by LC-MS/MS. *Ann Toxicol Anal.* 2007; 19(2): 141-150.
70. Uchiyama N, Kikura-Hanajiri R, Ogata J, Goda Y. Chemical analysis of synthetic cannabinoids as designer drugs in herbal products. *Forensic Sci Int.* 2010; 198(1-3): 31-38.
71. Kumazawa T, Hasegawa C, Lee X, Sato K. New and unique methods of solid-phase extraction for use before instrumental analysis of xenobiotics in human specimens. *Forensic Toxicol.* 2010; 28: 61-68.
72. Robb DB, Blades MW. State-of-the-art in atmospheric pressure photoionization for LC/MS. *Anal Chim Acta.* 2008; 627(1): 34-49.
73. Hudson S, Ramsey J, King L, Timbers S, Maynard S, Dargan PI, Wood DM. Use of high-resolution accurate mass spectrometry to detect reported and previously unreported cannabinomimetics in "herbal high" products. *J Anal Toxicol.* 2010; 34(5): 252-260.