

ZUR CHEMISCHEN KLASSIFIZIERUNG VON PFLANZEN  
XXV. QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON HASCHISCH-INHALTSSTOFFEN  
NACH DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE\*

FRIEDHELM KORTE UND HELMUT SIEPER

*Organisch-Chemisches Institut der  
Universität Bonn (Deutschland)*

(Eingegangen den 24. Juli 1963)

Die Bestimmung der Haschisch-Inhaltsstoffe Cannabidiolsäure (CBDS), Cannabidiol (CBD), Tetrahydrocannabinol (THC) und Cannabinol (CBN) hat beachtliche Bedeutung gewonnen für die polizeiliche Kontrolle des illegalen Haschischhandels<sup>1</sup> und für die Züchtung Haschisch-armer Hanfpflanzen zur Fasergewinnung<sup>2</sup>. In jüngster Zeit gelang es uns, Haschischextrakte an Dimethylformamid-inprägnierten Kieselgel-Dünnschichten in die Cannabinolverbindungen aufzutrennen<sup>3</sup>. Wegen der ausserordentlich grossen Trennschärfe und des geringen Zeitbedarfs schien dieses Verfahren als Grundlage für eine genaue und schnelle Bestimmung der Cannabinole besonders geeignet. Eine solche Methode beansprucht um so grösseres Interesse, als die Literaturmethoden sich im allgemeinen auf eine grobe Bestimmung einzelner Komponenten beschränken<sup>4</sup>, oder einen unverhältnismässig grossen Arbeits- und Zeitaufwand erfordern<sup>5</sup>.

Die quantitative Bestimmung dünn-schichtchromatographisch aufgetrennter Verbindungen erfolgt am besten nach ihrer Elution vom Adsorbens spektrophotometrisch. So konnten wir nach diesem Verfahren genuine Anthrachinonglykoside und -aglykone in Extrakten von *Cortex frangulae* mit einer Messgenauigkeit von  $\pm 5\%$  erfassen<sup>6</sup>. Eine analoge Übertragung auf die Cannabisanalytik bereitete jedoch erhebliche Schwierigkeiten. Die direkte spektrophotometrische Auswertung der für die Cannabinole charakteristischen U.V.-Absorptionsmaxima bei 270–280 m $\mu$  erwies sich als unmöglich, da wegen der niedrigen Extinktionskoeffizienten dieser Verbindungen für eine genaue Messung nur ungenügend hohe Eluatkonzentrationen erreicht werden konnten. Dagegen gelang es, die getrennten Substanzen auf dem Chromatogramm reproduzierbar in farbige Azoverbindungen mit hohen Extinktionskoeffizienten überzuführen und nach ihrer Elution im sichtbaren Spektralbereich zu photometrieren.

Zum Studium der systematischen Fehler dieser Methode wurde ein Gemisch aus gleichen Teilen von genuinem CBD, synthetischem CBN und synthetischem THC vom Schmp. 62<sup>o7</sup> bandförmig über 16 cm auf Dimethylformamid-gesättigten Kieselgel-Dünnschichten aufgetragen und mit Cyclohexan chromatographiert. Für die Anfärbung der Cannabinole wählten wir Echtblausalz B, Merck, in alkalischer Lösung. Wie ausgeführt wurde<sup>3</sup>, entstehen mit diesem Reagens so charakteristisch

\* XXIV. Mitteilung: F. KORTE UND H. SIEPER, *J. Chromatog.*, 13 (1964) 90.

gefärbte Verbindungen, dass ihre sichere Identifizierung ohne die Hilfe andersartiger Farbreaktionen an Vergleichschromatogrammen möglich ist. Bei zweimaligem Besprühen wird eine vollständige Umsetzung erreicht, ohne dass sich die schwach gelbe Untergrundfärbung störend auswirken könnte.

Das Ablösen der Farbstoffe vom Adsorbens erfolgte nach der schon für die Anthrachinonbestimmung ausgearbeiteten Elutionstechnik<sup>6</sup>. Als bestes Lösungsmittel eignete sich ein Gemisch aus gleichen Teilen Eisessig und Methanol. Die auf dem Sorptionsmittel irreversibel festgehaltenen Farbstoffmengen waren sehr gering. Die Absorptionsspektren der Farbstofflösungen und eines in analoger Weise erhaltenen Kieselgelblindeluats wurden mit dem Spektrophotometer Beckman DK I in Durchsicht vermessen und sind Fig. 1 zu entnehmen.

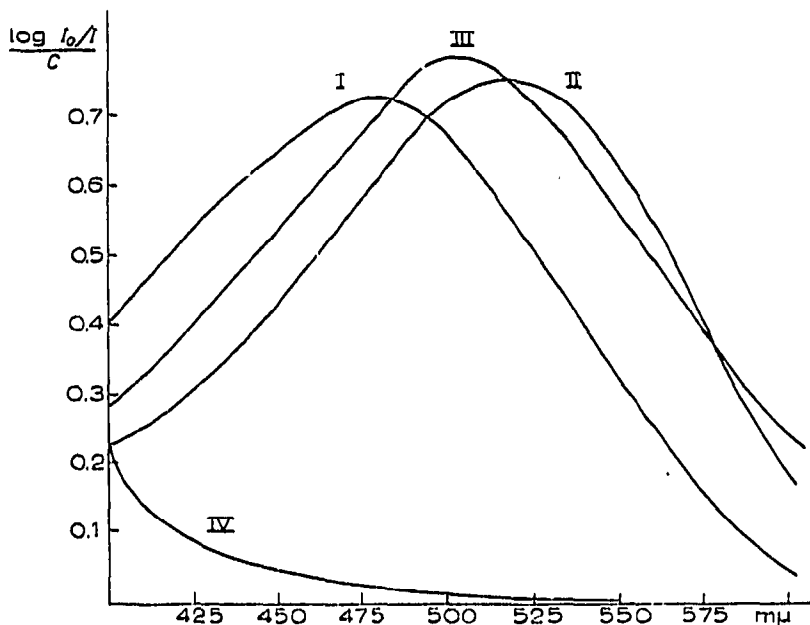


Fig. 1. Absorptionsspektren der Cannabinolverbindungen nach Dünnschichtchromatographie und Umsetzung mit Echtblausalz B (gemessen in Lösung nach Elution mit Eisessig-Methanol (1:1)). I = CBD-Azofarbstoff; II = CBN-Azofarbstoff; III = THC-Azofarbstoff; IV = Kieselgelblindeluat.

Wie man erkennt, ist die Absorption des Kieselgelblindeluats im Absorptionsmaximum der Cannabinole sehr klein. Die Messergebnisse zeigten die geringste Streuung, wenn die Substanzlösung gegen reines Lösungsmittel vermessen und die getrennt bestimmte Kieselgelblindabsorption davon abgezogen wurde. Die Lösungen zeigten auch nach 3-monatigem Stehen keine Änderung der Absorptionslage und Extinktionshöhe.

Um Aussagen über den Gültigkeitsbereich des Lambert-Beerschen Gesetzes machen zu können, wurden 0.1-proz. Lösungen der Cannabinole in unterschiedlichen Mengen chromatographiert und spektrophotometriert. Die Ergebnisse sind in Fig. 2 dargestellt.

Die maximale Abweichung der Messpunkte der Ausgleichsgeraden liegt zwischen Konzentrationen von 2 und 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bei 5 voneinander unabhängigen Bestimmungen unter  $\pm 5\%$ . Innerhalb dieses Konzentrationsbereiches verlaufen die Kurven linear. Daraus kann man schliessen, dass auf dem Chromatogramm eine stöchiometrische

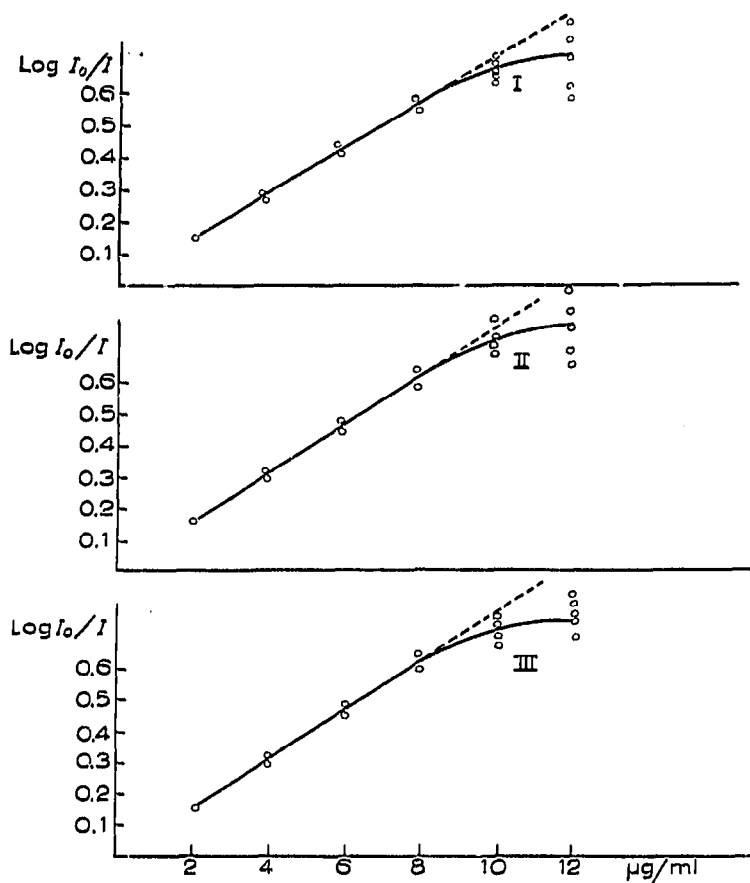


Fig. 2. Eichkurven der Cannabinolverbindungen nach Dünnschichtchromatographie und Umsetzung mit Echtblausalz B (gemessen in Lösung nach Elution mit Eisessig-Methanol (1:1) im Maximum der Absorption). I = CBD-Azofarbstoff; II = CBN-Azofarbstoff; III = THC-Azofarbstoff.

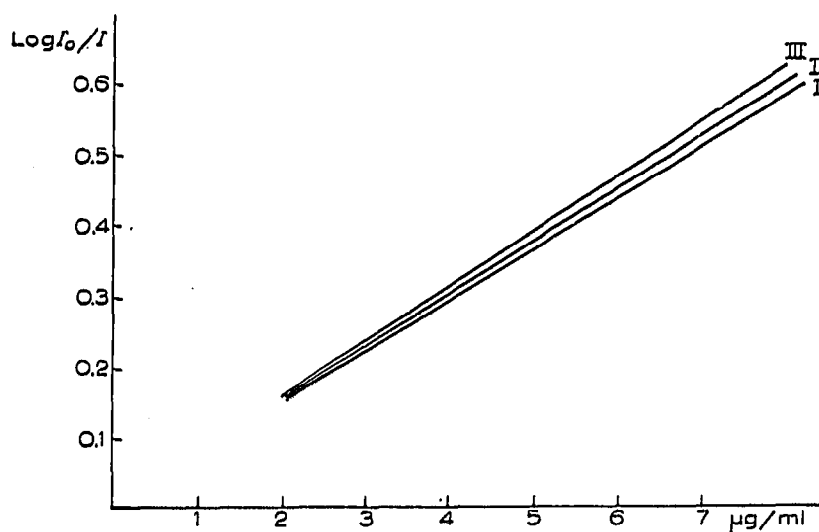


Fig. 3. Eichkurven der Cannabinolverbindungen im Gültigkeitsbereich des Lambert-Beerschen Gesetzes. I = CBD-Azofarbstoff,  $\frac{\log I_0/I}{C} = 72.5$ ; II = CBN-Azofarbstoff,  $\frac{\log I_0/I}{C} = 75.0$ ; III = THC-Azofarbstoff,  $\frac{\log I_0/I}{C} = 78.8$ .

oder zumindest proportionale Umsetzung der Cannabinole mit dem Reagens und eine der Farbstoffmenge proportionale Elution erfolgt.

In Fig. 3 sind die Ausgleichsgeraden im Linearitätsbereich gesondert aufgezichnet. Die daraus ermittelten praktischen Extinktionskoeffizienten gestatten die direkte Berechnung unbekannter Cannabinolkonzentrationen nach dem Lambert-Beerschen Gesetz aus den Extinktionswerten der Dünnschichteluat.

Cannabis- oder Haschischextrakte können ohne vorherige Reinigung für die Bestimmung der Cannabinole eingesetzt werden. Farbige Begleitsubstanzen sowie Cannabinol-fremde Substanzen, die mit Echtblausalz farbige Verbindungen geben, stören im allgemeinen nicht, da ihre Laufgeschwindigkeiten auf dem Chromatogramm von denen der Cannabinole genügend verschieden sind. Cannabidiolsäure konnte nach der beschriebenen Methode nicht bestimmt werden, da sie im Lösungsmittelsystem Dimethylformamid-Cyclohexan am Startpunkt zurückbleibt. Versuche, adsorptionschromatographisch an Dünnschichten in einen günstigen  $R_F$ -Bereich zu kommen, sind noch nicht abgeschlossen. Wie berichtet wurde<sup>3</sup>, waren in allen untersuchten Haschischextrakten drei auf dem Chromatogramm eng benachbarte, aber scharf voneinander getrennte Tetrahydrocannabinole nachweisbar, die mit THC I,

TABELLE I  
GEHALT AN CANNABINOLEN IN CANNABISEXTRAKTEN \*

	% der Trockendroge			
	CBD	THC I	THC II	CBN
Nigeria UNC 59	—	0.079	0.019	0.481
Brasilien UNC 61	—	0.190	Spuren	0.410
Cypern UNC 33	—	0.230	0.150	0.060
Marocco UNC 21	0.129	0.096	Spuren	0.123
Genf UNC 51	0.129	0.059	0.028	0.017
Kanada UNC 37	0.103	Spuren	Spuren	—

\* Der Zeitbedarf für die Bestimmung der 4 Komponenten in Rohextrakten liegt bei 4-5 Stunden. Zwei getrennte Analysen reichen im allgemeinen für eine Genauigkeit von  $\pm 5\%$  aus.

THC II und THC III bezeichnet wurden. THC III war in nicht bestimmbar kleinen Mengen enthalten. Für eine angenäherte Bestimmung von THC I und THC II aus den Extinktionswerten der Umsetzungsprodukte mit Echtblausalz wurde der für das synthetische THC vom Schmp.  $62^\circ$  ermittelte Extinktionskoeffizient eingesetzt (siehe Eichkurve III in Fig. 3). Als Beispiel einer Bestimmung sind die Analysenwerte einiger Haschischextrakte in Tabelle I zusammengestellt.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

Je 10 g Haschisch oder lufttrockener und von groben Stengeln befreiter Cannabis werden in 50 ml dest. Petroläther (Sdp.  $40-60^\circ$ ) suspendiert und 2 Min. bei Raumtemperatur unter ständigem Durchleiten eines lebhaften  $N_2$ -Stromes mit einem Ultraturrax zerkleinert und extrahiert. Der Filtrationsrückstand wird 3-5 mal mit je 30 ml Petroläther nachextrahiert, bis das Filtrat eine nur noch schwache Farb-reaktion mit Echtblausalz B gibt. Die vereinigten Filtrate werden bei Raumtempera-

tur in einem Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft und mit Heptan, dem wenige Tropfen Methyläthylketon und Äthanol zugefügt wurden, auf genau 10-proz. Lösungen eingestellt.

Auf  $20 \times 20$  cm Glasplatten werden Dünnschichten von Kieselgel G, Merck, in einer Dicke von  $250 \mu$  mit dem Streichgerät der Fa. C. Desaga, Heidelberg, nach der Vorschrift von STAHL<sup>8</sup> hergestellt und in der früher beschriebenen Weise<sup>3</sup> mit einer Mischung von 60 Vol. % N,N-Dimethylformamid und 40 Vol. %  $\text{CCl}_4$  über eine Chromatographiestrecke von 12 cm imprägniert.

Während des Abdunstens von überschüssiger Imprägnierungsflüssigkeit, wozu 1–2 Stunden erforderlich sind, werden 2,5 cm oberhalb der unteren Schichtkante 10–30  $\mu\text{l}$  des zu bestimmenden Haschischextraktes mit einer Mikrosyringe, 3 cm von der Seitenkante her angefangen, über eine Strecke von 13 cm bandförmig aufgetropft. Dabei ist darauf zu achten, dass die Sorptionsschicht nicht beschädigt wird und sich die Testlösung über höchstens 0,5 cm nach oben und unten ausbreitet. Auf dem ausgesparten 3 cm breiten Seitenstreifen können für Vergleichszwecke 3  $\mu\text{l}$  einer 0,1-proz. Lösung eines Gemisches von CBD, CBN und THC oder ein Cannabis- bzw. Haschischextrakt bekannter Inhaltsstoffe aufgetragen werden. Es wird mit Cyclohexan chromatographiert, wozu ca. 30 Min. benötigt werden.

15 mg Echtblausalz B, Merck, das zweckmässigerweise bei  $0^\circ$  aufbewahrt wird, werden in 20 ml N/10 NaOH kalt gelöst und durch eine Glasfritte filtriert. Die Lösung wird beim Stehen allmählich braun und ist nach 5 Min. nicht mehr verwendbar. Sie wird daher unmittelbar nach ihrer Herstellung mit einem Sprüher der Fa. C. Desaga unter  $\text{N}_2$ -Druck auf die waagrecht liegende Platte im Abstand von ca. 30 cm so aufgebelt, dass die gesamte Adsorptionsschicht gleichmässig transparent wird, ohne dass bei seitlicher Betrachtung ein Feuchtigkeitsfilm sichtbar wird. Das Chromatogramm wird mit dem Kaltluftstrom eines Föhns getrocknet und wie vorher mit einer frischen Reagenslösung nachbehandelt. CBDS bleibt als orangeroter Fleck am Startpunkt zurück. Es folgen mit steigenden  $R_F$ -Werten: CBD (orangerot), CBN (dunkelviolet), THC I (weinrot) THC II (hellviolet) und THC III (rosa).

Die 0,3–1 cm breiten Zonen der Cannabinol-Azofarbstoffe werden mit einem spitzen Bleistift umrandet, mit einem flachen Spatel von 3 mm Breite abgekratzt und quantitativ in Röhrchen von 2 ml Fassungsvermögen übergeführt. Der Farbstoff wird durch Schütteln mit 1 ml eines Gemisches aus gleichen Vol. Teilen Eisessig und Methanol extrahiert. Man lässt absitzen und filtriert mit reduziertem Wasserstrahlvakuum durch eine Glasfritte Schott G 3 unmittelbar in einen 2,5 ml Messkolben. Es wird zweimal mit je 0,5 ml Lösungsmittel nachextrahiert und bis zur Marke aufgefüllt. Zur Herstellung einer Kieselgelblindlösung wird unterhalb der Startlinie des Haschischextraktes eine den Testmengen entsprechende Menge substanzfreier, aber mit der Reagenslösung behandelte Kieselgelzone extrahiert.

Die Absorptionsspektren der Cannabinol-Azofarbstoffe und des Kieselgelblindeluats werden mit einem selbstregistrierenden Spektrophotometer im Wellenlängenbereich von 600–400  $m\mu$  gegen reines Lösungsmittel (Eisessig–Methanol (1:1)) aufgenommen. Vom Extinktionswert der Substanzlösung im Wellenlängenmaximum wird der Kieselgelblindwert gleicher Wellenlänge abgezogen. Zur Konzentrationsberechnung nach dem Lambert-Beerschen Gesetz werden folgende Extinktionskoeffizienten eingesetzt: CBD 72,5; CB<sup>9</sup>; 75,0; THC I und THC II 78,8.

## DANK

Wir danken der Firma Dr. W. SCHWABE, Karlsruhe, dem Bundeskriminalamt, Wiesbaden, und dem European Office of United Nations Narcotic Drug Section, Genf, für die freundliche Überlassung von Cannabis- und Haschischproben.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Haschisch-Komponenten Cannabidiol, Tetrahydrocannabinol und Cannabinol werden nach dünnenschichtchromatographischer Trennung und Umsetzung zu Azofarbstoffen spektrophotometrisch bestimmt. Die neue Methode ist auch auf Cannabis- und Haschisch-Rohextrakte anwendbar.

## SUMMARY

The hashish components cannabidiol, tetrahydrocannabinol and cannabinol are determined spectrophotometrically after separation by thin-layer chromatography and formation of azo-derivatives. The new method can also be applied to crude extracts of cannabis and hashish.

## LITERATUR

- <sup>1</sup> C. G. FARMILO, *United Nations Secretariat Document*, St/StOA/SER S/7 (1962).
- <sup>2</sup> C. G. FARMILO, *United Nations Secretariat Document*, St/StOA/SER S/4 (1961) 15.
- <sup>3</sup> F. KORTE UND H. SIEPER, *J. Chromatog.*, 13 (1964) 90.
- <sup>4</sup> C. C. FULTON, *Ind. Eng. Chem.*, 14 (1942) 407;  
A. RADČEVIĆ, M. KUPINIĆ UND LJ. GRLIĆ, *Nature*, 195 (1962) 1007;  
LJ. GRLIĆ, *J. Pharm. Pharmacol.*, 13 (1961) 637.
- <sup>5</sup> O. E. SCHULTZ UND G. HAFNER, *Arch. Pharm.*, 293 (1960) 1.
- <sup>6</sup> H. SIEPER, R. LONGO UND F. KORTE, *Arch. Pharm.*, 296 (1963) 403.
- <sup>7</sup> F. KORTE UND H. SIEPER, *Ann.*, 630 (1960) 71.
- <sup>8</sup> E. STAHL, *Chemiker-Ztg.*, 82 (1958) 323; *Z. Anal. Chem.*, 181 (1961) 303; *Arch. Pharm.*, 292 (1959) 411.

*J. Chromatog.*, 14 (1964) 178-183