



Maßgeschneiderte Lösungen für die Cannabis-Prüfung

Analytische Lösungen entsprechend der aktuellen Vorschriften

Dr. Gesa Schad

Shimadzu Europa GmbH

Seit Juli 2018 haben über 20 europäische Staaten Cannabis für medizinische Zwecke legalisiert, und von weiteren wird erwartet, dass sie in den kommenden Jahren folgen werden. Der Besitz von Cannabis ist auf Grund von Landesgesetzen noch immer unzulässig; es gibt jedoch eine laufende Diskussion, Cannabis für die Medizin und den Genuss zuzulassen. Die Nachfrage nach Cannabis-Prüfung und entsprechenden analytischen Methoden nimmt daher stetig zu.

Zahlreiche Vorteile für die Gesundheit sind über Cannabis berichtet worden. Hierzu gehören allgemeine Schmerzlinderung, Wirkung gegen Übelkeit und Minderung von Krämpfen und Autismus. Eine Qualitätskontrolle (QC) von Cannabinoiden ist unentbehrlich hinsichtlich einer genauen Kennzeichnung von Cannabis-Produkten für medizinische wie Genussbezogene Märkte. Cannabinoide sind die wichtigsten aktiven Wirkstoffkomponenten; daher sind sie die Zielverbindungen für Wirksamkeitsprüfungen. Terpene beeinflussen den homöopathischen Effekt, und auch in Cannabis-Produkten müssen Verunreinigungen kontrolliert werden, wie Pestizidrückstände und Mykotoxine, um die Verbrauchersicherheit zu gewährleisten.

Dieser Artikel befasst sich mit Cannabis-Analytik inklusive Probenaufbereitung auch hinsichtlich kundenorientierter Lösungen sowie entsprechender Konfigurationen und Anwenderunterstützung.

Wirksamkeitsprüfung für Cannabis-Produkte mit der HPLC

Während sich der Grund für die kontroverse Sicht auf Cannabis als legales

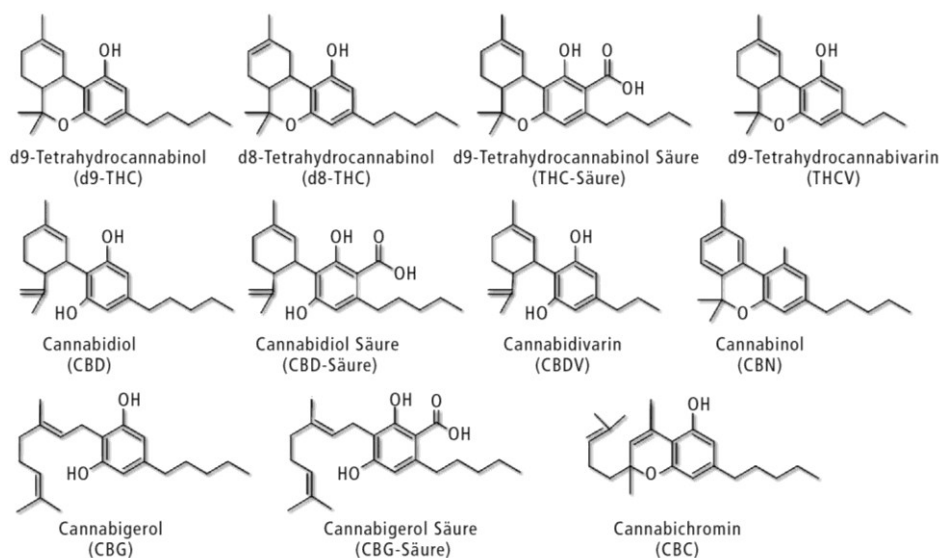


Abb. 1: Bei der Wirksamkeitsprüfung ermittelte Cannabinoide

Arzneimittel aus dem psychoaktiven Effekt von nur einem einzigen enthaltenen Cannabinoid ableitet, nämlich dem Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (d9-THC), wurde durch den Einsatz einer Kombination anderer Phytocannabinoide auch ein therapeutischer Nutzen berichtet, z.B. Schmerzlinderung und verminderte Ausprägung von Übelkeit und Krämpfen [1, 2]. Zudem zeigten zahlreiche Studien ein hohes Sicherheitsniveau im Hinblick auf ein breites Spektrum an Nebenwirkungen, und es ist bisher keinerlei Toleranz gegenüber Cannabidiol (CBD), einer anderen Cannabis-Hauptkomponente, nachgewiesen worden [3,4]. CBD-reiche Produkte mit einem fehlenden oder vernachlässigbaren d9-THC-Gehalt werden daher immer populärer, da sie ohne Rezept – wie für d9-THC enthaltene Medikamente notwendig – legal bezogen werden können.

Regulative Forderungen bezüglich d9-THC legen den primären Fokus auf die

Wirksamkeitsprüfung. Cannabis-Pflanzenmaterial enthält d9-Tetrahydrocannabinolsäure (THCA), eine nicht-psychoaktive Carbonsäureform des d9-THC. Sie ist eine Vorstufe und wird beim Erhitzen in THC umgewandelt. Die HPLC ist die bevorzugte Methode, Cannabinoide in ihrer Säureform zu quantifizieren, da die hohen Temperaturen bei der GC nur die Erfassung des Gesamt-THC erlauben.

Die Cannabis-„Stärke“ wird normalerweise durch Quantifizierung der Hauptkomponenten einschließlich THCA, THC, CBD und CBN bestimmt. Die HPLC-Analysesysteme der i-Series von Shimadzu ermöglichen eine verlässliche Quantifizierung von elf wichtigen Cannabinoiden (Abbildung 1) mit Hilfe einer schnellen und einfachen HPLC-UV-Untersuchung. Im beschriebenen Beispiel wurde sie zur Qualitätskontrolle von Hanföl mit Blick auf die Etikettenangabe des CBD- sowie des THC-Gehalts eingesetzt.

Fünf Hanfölprouben von diversen Versandhändlern wurden in Isopropylalkohol gelöst, mit Methanol verdünnt und vor der HPLC-Analyse gefiltert. Abbildung 2 zeigt Chromatogramme, die durch die Analyse zweier unterschiedlicher Hanfölprouben zur Bestimmung des Gesamt-Cannabinoidgehalts (81-fach verdünnt) ebenso wie nur des CBD-Gehalts (405-fache Verdünnung) erhalten wurden.

Zwei der fünf geprüften Öle waren klar, schwach gelb/grün gefärbt und zeigten einen hohen Anteil von CBD am Gesamt-Cannabinoidgehalt (92%). Beide überprüften Proben lagen auch nahe bei der Etikettenangabe von 95% bzw. 92%. Dies führte zu der Vermutung, dass diese beiden Öle Produkte einer mehrstufigen Reinigung nach Extraktion waren.

Anders das Erscheinungsbild einer dritten Probe: Sie war nicht transparent, braun/grün gefärbt, erschien körnig, wies auch einen deutlich „erdigen“ Geruch auf und zeigte den höchsten Gehalt an CBD und Gesamt-Cannabinoiden beim niedrigsten Verhältnis von CBD zu Gesamt-Cannabinoiden (59%). Dieses Öl war sehr wahrscheinlich das Ergebnis einer nur einfachen Extraktion ohne weitere Veredelung. Obgleich der prozentuale CBD-Anteil laut Etikett der niedrigste war (81%), enthielt diese Probe den höchsten CBD-Anteil verglichen mit allen anderen geprüften Ölen.

Die zwei übrigen Hanföle, 122% bzw. 200% höher getestet als die Kennzeichnung, stellen Art und Genauigkeit der zur Überprüfung eingesetzten Verfahren und die Berechtigung der Kennzeichnung in Frage.

Alle Proben enthielten, wie von den Hanfprodukten erwartet, weniger als 0,3% d9-THC. Diese Untersuchung zeigt, dass bei 3 von 5 zufällig ausgewählten Proben die tatsächlichen CBD-Konzentrationen nicht den angegebenen Inhalten entsprachen. Sie ist eine einfache und schnelle CBD und Gesamt-Cannabinoid-Prüfung für eine verbesserte Qualitätskontrolle von Cannabis Produkten.

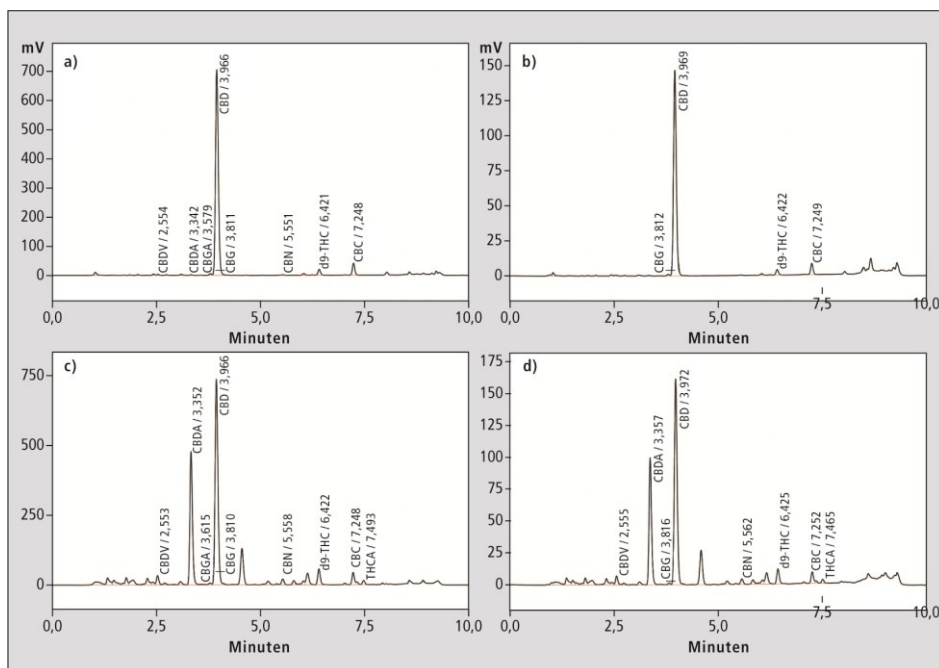


Abb. 2: Repräsentative Chromatogramme für den Gesamt-Cannabinoidgehalt (a + c) und den CBD-Gehalt (b + d) in zwei unterschiedlichen Hanfölen

Terpen-Profil mit GC-MS

Terpene und Terpenoidverbindungen werden in Harzdrüsen (wo auch THC gebildet wird) produziert und geben Cannabis seinen einzigartigen Duft und Geschmack. Neben ihren aromatischen Eigenschaften besitzen Terpene auch gesundheitliche Vorteile. Sie sind unverzichtbare, medizinische Kohlenwasserstoff-Grundbausteine und haben eine synergistische Beziehung mit Cannabinoiden, indem sie den gesamten homöopathischen Effekt beeinflussen.

Vom Piniengeruch von Pinen bis zum zitrusähnlichen Duft von Limonen wird die Charakterisierung von Terpenen einfach per Gas-Chromatographie erhalten. Mit einem Shimadzu GCMSQP2020, dem HS-20 Headspace-Sampler (Dampfraum) und der NIST-Spektrenbibliothek lassen sich mehr als 3.000 Duft- und Geschmackskomponenten für die effizienteste Terpen-Profilierung identifizieren.

Cannabis besitzt über 140 Terpene-Verbindungen, von denen viele von medizinischem Interesse sind [5]. Zu den überwiegenden Terpenen in Cannabis gehören

- Myrcen, das antibiotische Eigenschaften besitzt und die muskelrelaxierende Wirkung von THC verstärkt,
- Pinen, das die bronchodilatorische Wirkung von THC verbessert und entzündungshemmende Eigenschaften aufweist sowie
- Caryophyllen, das sich ebenfalls wie ein entzündungshemmender Wirkstoff verhält und neben anderen gesundheitlichen Vorteilen die zytrotektive Wirkung von THC im Magen steigert [6, 7].

Die Konzentration einzelner Terpene variiert je nach Stamm. Sie kann zwischen 0,1 und 1,5% des Gesamtrockengewichts liegen und sehr von der Ernte-

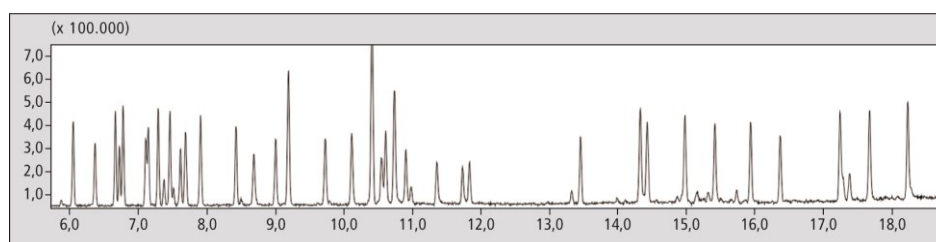


Abb. 3: TIC-Chromatogramm des Terpen-Standards

zeit, von Trocknungs- und Lagerungsbedingungen abhängen. Die Terpen-Werte können mit der Zeit abnehmen und nach dreimonatiger Lagerung um mehr als die Hälfte reduziert sein [8].

Die Abnahme des Gehalts über die Zeit variiert für verschiedene Terpene. Aufgrund der Einzigartigkeit der Terpen-Profile lassen sie sich von den Züchtern teilweise als „Fingerabdruck“ für einen spezifischen Stamm einsetzen. Als Beispiel wird hier die Analyse diverser Cannabis-Stämme auf 41 Terpene mit Hilfe der GC-MS mit Headspace-Injektion beschrieben.

Eine Fünfunkt-Kalibrationskurve wurde mit Konzentrationen zwischen 12,5 und 100 µg/ml erzeugt. Ein Teil der Blüte von 1 g Gewicht wurde eingefroren und anschließend gemahlen, um eine repräsentative Probe zu sichern. 10 bis 30 mg der Blüte wurden dann in ein Headspace-Fläschen eingewogen und mit einem Deckel verschlossen.

Das endgültige Ergebnis wurde auf Gewichtsprozente berechnet.

Die erste Cannabis-Probe, CB Diesel, wurde kurz nach der Ernte analysiert. Die sich ergebenden Terpen-Gewichtsprozente waren mit denen in der aktuellen Literatur vergleichbar [5]. Die beiden anderen Proben, Blue Dream und Haze Wreck, wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt und vor der Analyse für einen Monat dem Licht ausgesetzt. Es wurde gezeigt, dass unterschiedliche Lagerungsbedingungen die Terpen-Ergebnisse über die Zeit verändern können, was in die Überlegung einbezogen werden sollte, wenn Cannabis-Proben analysiert werden (Abbildung 4).

Pestizid-Screening mit LC-MS-MS

Pestizide werden in kommerziellen Anbaubetrieben eingesetzt, um die Insekten und Spinnen auf den Cannabis-Pflanzen abzutöten. Ab bestimmten Konzentrationen können Pestizide karzinogen und mutagen sein, was Konsumenten ernsthaft schaden kann, insbesondere bei immungeschwächten Patienten, die medizinisches Cannabis konsumieren. Ein empfindlicher und selektiver Nachweis von Rückständen ist für den Verbraucherschutz notwendig.

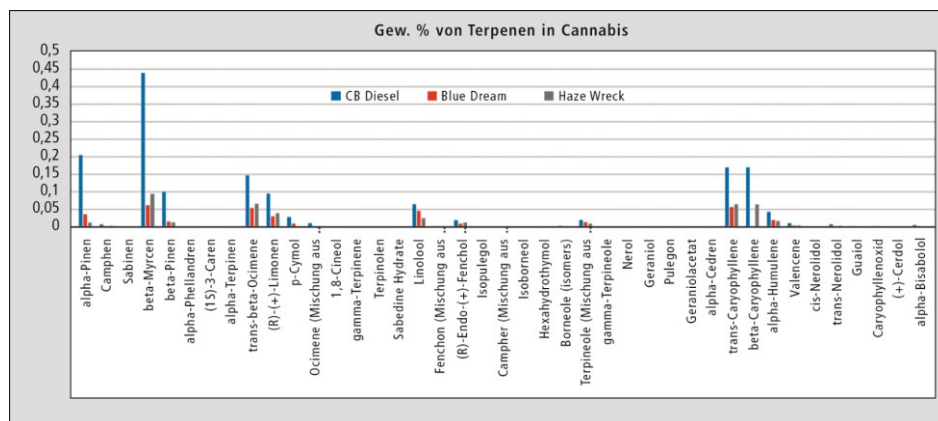


Abb. 4: Terpen-Verteilung in drei verschiedenen Cannabis-Stämmen: CB Diesel, Blue Dream und Haze Wreck

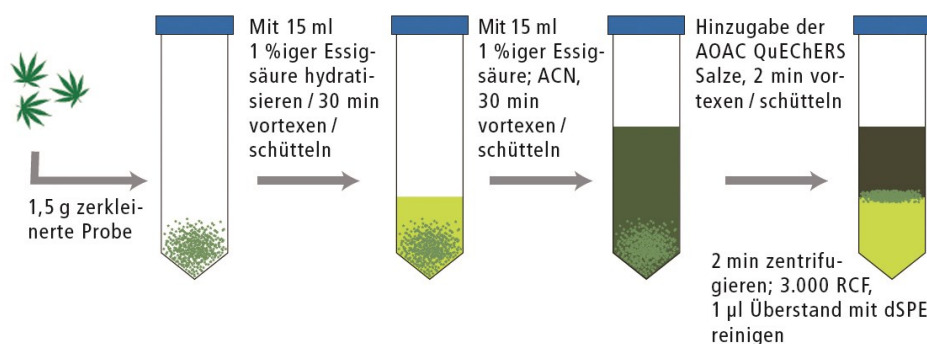


Abb. 5: QuEChERS-Extraktion getrockneter Cannabis-Blüten zur Pestizid-Analyse

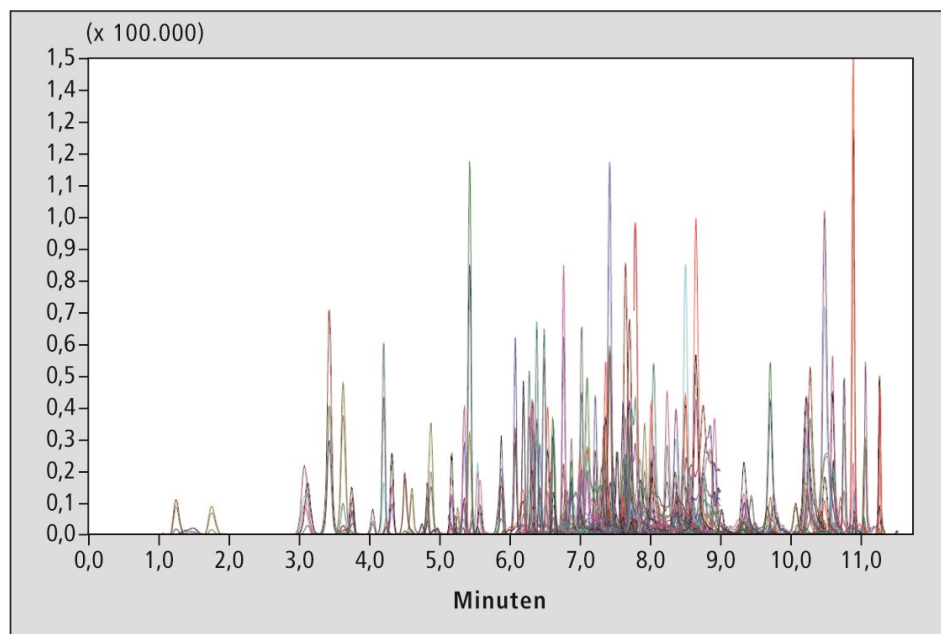


Abb. 6: Repräsentatives Chromatogramm einer mit Pestizid-Mischung versetzten Cannabis-Matrix

QuEChERS-Extraktion und LC-MS-Analyse bieten einen effizienten Nachweis von Pestiziden, die üblicherweise für die Cannabis-Kultivierung verwendet werden.

Pestizidfreies, ökologisch gewachsenes Cannabis wurde für Spiking Experimente und Kalibrationskurven verwendet. Eine Vielzahl für den Verkauf angebotener Cannabis-Proben, einschließlich Konzentrat, wurde anschließend auf Pestizide analysiert.

Die Proben wurden gemäß des QuEChERS-Extraktionsprotokolls (Abbildung 5) aufbereitet und mit einer Prominence HPLC und einem LCMS-8050 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer von Shimadzu analysiert. Für den Nachweis wurde eine Electrospray-Ionisation im kontinuierlichen Polaritätsumschaltmodus eingesetzt.

Für jede Komponente wurden optimierte MRM-Einstellungen verwendet und mindestens ein Gewichtung- und ein Kennzeichnungsübergang gewählt. Die Retentionszeiten wurden bestimmt und dazu verwendet, die MRM-Bereiche für einen optimalen Arbeitszyklus zu programmieren. Abbildung 6 zeigt ein repräsentatives Chromatogramm einer Pestizid-Mischung, mit der eine Cannabis-Matrix auf mittlerem Niveau (31 ppb) versetzt wurde.

Eine Kalibrationskurve wurde aus der versetzten Matrix über einen Bereich von 20 bis 2.000 ng/g Trockenblütengewicht angefertigt. Die Quantifizierungsgrenzen wurden durch dreifache Probenmessung bei verschiedenen Werten bestimmt. An der Quantifizierungsgrenze waren ein Signal-Rausch-Verhältnis von mindestens 10 zu 1 und ein RSD von 20% oder besser erforderlich. Zusätzlich wurde eine Reproduzierbarkeit innerhalb von 20% RSD für drei QC-Wiederholungen, in drei verschiedenen Cannabis-Stämmen erreicht.

Das am häufigsten nachgewiesene Pestizid war Piperonylbutoxid. Es ist in Pestizid-Formulierungen sehr verbreitet, um die Wirksamkeit der Hauptinhaltsstoffe zu erhöhen und wurde über weite Konzentrationsbereiche detektiert. Myclobutanil, ein Antipilzmittel aus dem Cannabis-Anbau, wurde ebenso in zahlreichen Proben nachgewiesen. Bei den Cannabis-Konzentraten wurde ein hoher Prozentsatz positiv auf ein oder mehrere Pestizide getestet.

Literatur

[1] Perry G. Fine, Mark J. Rosenfeld, *Rambam Maimonides Medical Journal*, October 2013, Volume 4, Issue 4

[2] Klein TW, Newton CA, *Adv Exp Med Biol*. 2007;601:395-413.

[3] LM Borgely, et al., "The pharmacologic and clinical effects of medical cannabis", *Pharmacotherapy (Review)* 33 (2):195-209 (February 2013).

[4] Kerstin Iffland, Franjo Grotenhermen *Cannabis and Cannabinoid Research Volume 2.1*, 2017.

[5] Giese, M.W., Lewis, M.A., Giese, L. and Smith, K.M. *Development and Validation of a Reliable and Robust Method for the Analysis of Cannabinoids and Terpenes in Cannabis*. Napro Research, California, 2015.

[6] Parland, J.M., and Russo, E.B. *Cannabis and Cannabis Extracts: Greater than the Sum of Their Parts?* The Haworth Press, Pennsylvania, 2001.

[7] E. Russo, *Taming THC: Potential Cannabis Synergy and Phytocannabinoid-Terpenoid Entourage Effects*, *British Journal of Pharmacology* 163 (2011) 1344.

[8] *Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other Cannabis Constituents*. Humana Press, New Jersey.

Anmerkung

Shimadzu unterstützt nicht die Verwendung seiner Produkte im Zusammenhang mit illegaler Nutzung, dem Anbau oder Handel von Cannabisprodukten. Shimadzu billigt nicht die unrechtmäßige Verwendung von Marihuana, wir liefern lediglich eine Übersicht über die Methoden der Cannabis-Analytik.