

RIVM rapport 267011001/2004

Kwaliteitsnormen Medicinale Cannabis

C. Slijkhuis, R. Hoving, L. Blok-Tip, D. de Kaste

Inclusief erratum d.d. 11 maart 2004
(zie laatste pagina)

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van het Bureau voor Medicinale Cannabis, in het kader van project V267011, Kwaliteitsnormen Medicinale Cannabis, mijlpaal Oplevering monografie.

Abstract

Ever since the 1st of September 2003 medicinal cannabis can be legally supplied by pharmacists to patients suffering from such illnesses as cancer, multiple sclerosis, and AIDS, although still only on prescription. Medicines always have to meet strict standards; medicines manufactured from plant-based products like medicinal cannabis form no exception and must display a constant quality too. Therefore, the RIVM was commissioned by the Dutch Office for Medicinal Cannabis through RIVM's Centre for Quality of Chemical-Pharmaceutical Products to set up a monograph for medicinal cannabis. A monograph, always specific for one raw material or preparation, describes criteria to be met, necessary tests for control and how the tests are to be carried out.

This report provides not only a description of the monograph, but also a short commentary on the monograph, general information on the cannabis plant, and reasons for supplying medicinal cannabis. The monograph, released in July last year and already in use for product control, was compiled for '**Cannabis flos**', the dried flower tips of the female cannabis plant. The monograph focuses on three components of cannabis: Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD) and cannabinol (CBN). It includes tests and quality standards, along with information on characteristics, e.g. loss on drying, content of Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinol, microbial contamination and pesticide residues. This monograph is a first step in ensuring a cannabis product of more or less constant quality, which should slightly reduce the complexity of the clinical study for the effect of cannabis. Because the cannabinoid mechanism is not yet clear, there is still a lot of discussion on which component or combination of components is responsible for the therapeutic effect of cannabis. This could indicate that in due time more compounds should be included in the monograph. The described methods will then be reconsidered and adjusted if necessary.

Inhoud

Lijst met afkortingen 4

Samenvatting 5

1. Inleiding 6

1.1 Algemeen 6

1.2 Cannabis 7

2. Monografie 8

3. Methode-ontwikkeling en validatie 17

3.1 Monstervoorbewerking 17

3.2 Gewichtsverlies door drogen 17

3.3 Verwante verbindingen en gehalte 17

Dankbetuiging 18

Literatuur 19

GLP verklaring 20

Bijlage 1: Structuren cannabinoïden 21

Bijlage 2: Verzendlijst 22

Lijst met afkortingen

Δ^9 -THC:	Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinol
BMC :	Bureau voor Medicinale Cannabis
CBC:	cannabichromeen
CBCA:	cannabichromeenzuur
CBD:	cannabidiol
CBDA:	cannabidiolzuur
CBG:	cannabigerol
CBGA:	cannabigerolzuur
CBN:	cannabinol
DAD:	diode array detectie
DLC:	dunnelaagchromatografie
EP:	Europese Farmacopee
GAP:	Good Agricultural Practice
GC:	gaschromatografie
HPLC:	high performance liquid chromatography; high pressure liquid chromatography; hoge druk vloeistofchromatografie
HPLC-DAD:	hoge druk vloeistofchromatografie gekoppeld met diode array detectie
HPLC-UV:	hoge druk vloeistofchromatografie gekoppeld met spectrofotometrische detectie in het golflengtegebied van het UltraViolette licht.
LC-MS:	liquid chromatography-mass spectrometry; hoge druk vloeistofchromatografie gekoppeld met massaspectrometrie
RIVM:	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
RIVM-KCF:	Centrum voor Kwaliteit van Chemisch-Farmaceutische Producten binnen het RIVM
RIVM-LAC:	Laboratorium voor Analytische Chemie binnen het RIVM
THC:	Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinol
THCA:	Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinolzuur

Samenvatting

Met ingang van 1 september 2003 mogen apothekers op voorschrift van een huisarts of specialist aan patiënten medicinale cannabis verstrekken. Momenteel worden er twee variëteiten geleverd. Om ervoor te zorgen dat de kwaliteit van deze cannabis constant is, zoals verwacht mag worden van een product uit de apotheek, is in opdracht van het Bureau voor Medicinale Cannabis door het Centrum voor Kwaliteit van Chemisch-Farmaceutische Producten een monografie opgesteld. Een monografie is altijd gericht op een specifieke grondstof of een specifiek preparaat. In een monografie worden eisen beschreven, waaraan het preparaat of de grondstof moet voldoen, en de testen, die uitgevoerd moeten worden om het preparaat of de grondstof op deze kwaliteitseisen te controleren.

In dit rapport is de monografie voor **Cannabis flos** beschreven, voorafgegaan door een inleiding over het waarom van medicinale cannabis en algemene informatie over de plant cannabis. De monografie is bedoeld voor de gedroogde bloemtoppen van de vrouwelijke cannabisplant. Naast de tekst van de monografie is hierop een toelichting gegeven. Tevens is de uitgevoerde validatie beknopt beschreven.



Medicinale cannabis:
de gedroogde bloemtop van een cannabisplant.

1. Inleiding

1.1 Algemeen

Met ingang van 1 september 2003 mogen apothekers op voorschrift van een huisarts of specialist aan patiënten medicinale cannabis verstrekken. Hoewel nog niet wetenschappelijk bewezen zijn er sterke aanwijzingen dat cannabis een gunstige invloed heeft bij bepaalde ernstige ziekten, zoals kanker, AIDS, Multiple Sclerose. Zo zou het verlichting van de pijn geven, spierkrampen en spiertrekkingen tegen gaan, de eetlust bevorderen en misselijkheid verminderen.

Een farmaceutisch preparaat met daarin alleen de werkzame componenten, geproduceerd onder de strenge controles van de farmaceutische industrie, zou misschien de voorkeur verdienen, maar het is momenteel nog onduidelijk welke component of combinatie van componenten in cannabis verantwoordelijk is voor de gunstige effecten. Daarom is door de voormalige minister van VWS gekozen om in eerste instantie cannabis van farmaceutische kwaliteit beschikbaar te stellen.

Om deze farmaceutische kwaliteit te kunnen waarborgen wordt de cannabis geteeld volgens de eisen van Good Agricultural Practice (GAP) en gecontroleerd op diverse kwaliteitsaspecten. De op deze wijze verkregen medicinale cannabis wordt aan de apothekers geleverd door het Bureau voor Medicinale Cannabis (BMC). In opdracht van het BMC is door het Centrum voor Kwaliteit van Chemisch-Farmaceutische (KCF) een monografie opgesteld. In de monografie 'Cannabis flos' zijn de kenmerken, de eisen en analysemethoden beschreven. De monografie is opgesteld in nauw overleg met het BMC. De stijl en opzet van de monografie is conform deze voorwaarden gebaseerd op de monografieën van de Europese Farmacopee (EP)(1). Hierdoor sluit de monografie aan bij vigerende farmaceutische kwaliteitsnormen, hetgeen een toekomstige internationale acceptatie vergemakkelijkt.

In dit rapport is de monografie beschreven, zoals die in de loop van 2003 binnen het RIVM is ontwikkeld en die op 18 juli 2003 vigerend is geworden. Tevens is een toelichting gegeven bij relevante onderdelen van de monografie en is de uitgevoerde validatie beknopt weergegeven. De hier beschreven monografie is gericht op de drie componenten Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD) en cannabinol (CBN), en is bedoeld als eerste aanzet om een cannabisproduct van een min of meer constante kwaliteit aan te bieden, zodat het gebruik door de patiënt niet afhankelijk is van wisselende gehalten THC, CBD of CBN en de patiënt niet belast wordt met verontreinigingen. Tevens kan de evaluatie van de klinische werkzaamheid hierdoor beter worden uitgevoerd. Aangezien het werkingsmechanisme van de cannabinoïden nog niet is opgehelderd, is de discussie over welke componenten een gunstig therapeutisch effect hebben ook nog volop in gang. Dit kan inhouden dat in de loop der tijd besloten wordt om ook andere componenten in de monografie op te nemen. Er zal dan onderzocht worden of de methode gewijzigd moet worden. Inmiddels is de monografie gebruikt voor de controle van producten. Hieruit zijn wat praktische aanpassingen voortgekomen. Tevens is uit aanvullend onderzoek gebleken dat de beschreven HPLC-methode niet selectief genoeg is om onderscheid te maken tussen

cannabidiol en cannabigerol. De methode zal hierop geoptimaliseerd worden. De monografie is derhalve continu in ontwikkeling. De laatste, vigerende versie is beschikbaar via het BMC.

1.2 Cannabis

Cannabis sativa L. is oorspronkelijk afkomstig uit Azië, maar groeit goed in zowel de tropen, de subtropen, als in gematigde klimaatzones. Het is een éénjarige plant, die wel 4 meter hoog kan worden, met 5-7 lancetvormige, gezaagde blaadjes in de vorm van een waaier. Van nature is de plant tweehuizig, dat wil zeggen dat er vrouwelijke planten met bloemen zijn en mannelijke planten met bloemen.

Cannabis bevat meer dan 400 verbindingen(2;3), o.a. terpenen en flavonoïden(4) en ruim 60 cannabinoïden(2;4). Hiervan zijn Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD), cannabinal (CBN) en de zuren Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinolzuur (THCA), cannabidiolzuur (CBDA), cannabigerolzuur (CBGA) en cannabichromeenzuur (CBCA) de belangrijkste(4-7). Het hoogste gehalte cannabinoïden wordt gevonden in de hars van de bloemtoppen van de vrouwelijke plant(2). THC is de belangrijkste psychoactieve verbinding. THCA is niet psychoactief, maar wordt door decarboxylering omgezet in het psychoactieve THC(2). Decarboxylering vindt snel plaats door verhitting(2), zoals bij roken. CBD is niet psychoactief, maar speelt wel een rol bij een 'high'(7). CBN is ook niet psychoactief; het is een degradatieproduct van THC(7).

De afgelopen jaren is er veel onderzoek gedaan naar cannabis, zowel met betrekking tot de inhoudsstoffen van cannabis als naar het werkingsmechanisme van cannabis en cannabinoïden en het medische toepassingsgebied(3). Hoewel de werking van cannabinoïden zeker niet volledig duidelijk is, is er wel meer inzicht verkregen. In het menselijk lichaam zijn twee cannabinoïdereceptoren (CB₁ en CB₂) aangetoond. Wanneer CB₁ wordt geactiveerd door een cannabinoïd heeft dit effect op de pijnbeleving, het geheugen en de motoriek. CB₂-receptoren hebben na activering eveneens invloed op de pijnbeleving, maar ook op een complexe manier op het functioneren van het immuunsysteem en zouden een ontstekingsremmende werking hebben(3).

2. Monografie

Tekst van de monografie	Toelichting
<p>CANNABIS FLOS Hennepbloemen</p>	<p>In oude, nationale farmacopees, zoals de Nederlandse, Belgische en Zwitserse, werd de term Cannabis Herba (Hennepkruid) gebruikt. Voor deze monografie is gekozen voor Cannabis Flos, omdat alleen de bloemtoppen worden gebruikt.</p>
<p>DEFINITIE</p> <p>Hennepbloemen bestaan uit de gedroogde bloeiwijzen van de vrouwelijke exemplaren van <i>Cannabis sativa</i> L., zoveel mogelijk ontdaan van de bladeren en stengeldelen. Het materiaal is te onderscheiden in typen waarvan het gehalte aan cannabinoïden varieert:</p> <p><u>Cannabis type</u></p> <p>Voor alle typen geldt dat het specifieke cannabinoïdenprofiel m.b.v. de test verwante verbindingen en gehalte voldoet aan het profiel vastgelegd voor het betreffende type.</p> <p>Voorbeelden:</p> <p><u>Cannabis type I</u>: bevat voornamelijk tetrahydrocannabinolzuur (THCA) en na verwarmen gedurende 2,5 uur bij 100°C niet minder dan 9,5% en niet meer 13,0% aan tetrahydrocannabinol (Δ^9-THC) berekend op de gedroogde substantie. Hiernaast zijn in geringe hoeveelheden cannabidiol (CBD) 0,1 - 0,5% en cannabinol (CBN) < 1,0% aanwezig.</p> <p><u>Cannabis type II</u>: bevat voornamelijk tetrahydrocannabinolzuur (THCA) en na verwarmen gedurende 2,5 uur bij 100°C niet minder dan 15,5% en niet meer 21,0% aan tetrahydrocannabinol (Δ^9-THC) berekend op de gedroogde substantie. Hiernaast zijn in geringe hoeveelheden cannabidiol (CBD) 0,1 - 1,5% en cannabinol (CBN) < 1,0% aanwezig.</p>	<p>Dit is een raammonografie, waardoor er ruimte is voor andere typen Cannabis. Momenteel zijn er slechts twee typen aangemerkt als medicinale Cannabis, Deze worden gekarakteriseerd door een hoog THC gehalte en een laag gehalte aan overige cannabinoïden. Er bestaan echter ook typen met een laag THC gehalte en/of een hoog gehalte CBD.</p> <p>Het gehalte THC, CBD en CBN <u>na</u> verwarmen is vermeld, aangezien door verwarmen decarboxylering van zuren wordt bewerkstelligd, waardoor in het chromatogram de pieken van THC, CBD en CBN minder verstoord worden door de corresponderende zuren.</p> <p>De gedroogde substantie is verkregen door verwarmen zoals beschreven onder de test <u>Gewichtsverlies door drogen</u>.</p>

<p>PRODUCTIE</p> <p>De productiewijze dient te voldoen aan de beschrijving van de EP monografie ‘Herbal Drugs’ (1433), vigerende editie.</p> <p>Na het plukken en drogen en verpakken is het materiaal al dan niet met gammastraling behandeld.</p>	<p>In grote lijnen stelt de EP(1) dat er geen verontreinigingen of contaminaties aanwezig mogen zijn en dat het product niet mag rotten. Wanneer een decontaminatie-behandeling wordt uitgevoerd, moet aangetoond worden dat dit geen nadelige effecten heeft. Ethyleenoxide mag hiervoor niet gebruikt worden.</p>
<p>KENMERKEN</p> <p>Vuilgroene trosvormige, kleverige bloeiwijzen van 1,5 tot 3 cm lengte en met een karakteristieke geur.</p>	<p>In de EP(1) wordt onder ‘Characters’ een algemene beschrijving gegeven; dit is geen bindende eis.</p>
<p>IDENTIFICATIE</p> <p><u>Identificatie A:</u> Microscopische eigenschappen Bereid een chloralhydraat preparaat door enkele druppels chloralhydraatoplossing aan het plantmateriaal toe te voegen en kort op een kleine vlam op te koken. Onder de microscoop zijn vooral klierharen waarneembaar.</p> <p><u>Identificatie B:</u> Dunnelaagchromatografie <i>Testoplossing (a):</i> Gebruik testoplossing (a) van de test op verwante verbindingen en gehalte. <i>Testoplossing (b):</i> Gebruik testoplossing (b) van de test op verwante verbindingen en gehalte. <i>Referentieoplossingen:</i> Respectievelijk Δ^9-THC, CBN en CBD oplossingen van 1 mg/ml <i>Dunnelaagplaat:</i> DLC silicagel F254 nm platen, 20 x 20 cm. <i>Loopvloeistof:</i> Petroleumether (40-60) : ether (40:10; V/V) <i>Opbrengst:</i> 5 en 10 μl van testoplossing (a) en (b) en 10 μl van de referentieoplossingen, als een band. <i>Ontwikkeling:</i> Over een afstand van 10 cm in een onverzadigde bak. Laat de plaat in de lucht drogen gedurende enkele minuten.</p>	<p>Aangezien het aantal leveranciers beperkt is en zij streng gecontroleerd worden, is een uitvoerige beschrijving om falsificatie vast te stellen niet strikt noodzakelijk.</p> <p>DLC is weliswaar een eenvoudige chromatografische techniek, maar de toepassing is geheel in lijn met de EP monografieën voor medicinale planten(1). De combinatie van DLC op ‘normal phase’ met HPLC op ‘reversed phase’ levert twee onafhankelijke technieken.</p>

<p><i>Detectie:</i> Besproei met een oplossing van 1 g/l Echtblauwzout B in een mengsel van ethanol : water (1:1; V/V). Beoordeel vervolgens in zichtbaar licht.</p> <p><i>Resultaten:</i> Zie de volgorde van de aanwezige zones in het onderstaande schema.</p> <p>In het chromatogram van testoplossing (a) kan een roodviolet zone overeenkomstig Δ^9-THC aanwezig zijn.</p> <p>In het chromatogram van testoplossing (b) kan een roodoranje zone overeenkomstig THCA aanwezig zijn en een oranje zone overeenkomstig CBD.</p>	<p>In de monografie is het schema onderdeel van de tekst. In dit rapport is het schema weergegeven in figuur 1 (pag. 14).</p>
<p>TESTEN</p> <p><u>Vreemd materiaal</u> Het materiaal is vrij van losse stengedelen en van insecten en ander ongedierte.</p> <p><u>Fijnheid</u> Bij macroscopische inspectie van 100 gram materiaal is geen blad waarneembaar dat meer dan 20% van de lengte van de bloeiwijze uitsteekt. Stengels zijn weggeknipt tot direct onder de onderste bloemen van de bloeiwijze.</p> <p><u>Microbiologische contaminatie</u> Dient te voldoen aan de eisen van de EP monografie ‘Microbiological quality of pharmaceutical preparations (5.1.4)’ – categorie 4B.</p> <p><u>Pesticiden</u> Dient te voldoen aan de eisen van de EP monografie ‘Pesticide residues (2.8.13)’.</p> <p><u>Zware metalen</u> Lood: max. 20,0 ppm Cadmium: max. 0,5 ppm Kwik: max. 0,5 ppm De methoden zijn beschreven in de EP mono-</p>	<p>Conform EP(1): inspectie met het blote oog of met een lens (vergroting tot 6x).</p> <p>Aangezien voor medicinale cannabis alleen de bloemtoppen gebruikt worden, dient er een test te zijn om dit te kunnen controleren. ‘Fijnheid’ is echter geen EP-eis.</p> <p>Categorie 4(1) is verdeeld in 4A (voor gebruik wordt kokend water toegevoegd) en 4B (voor gebruik wordt geen kokend water toegevoegd). Aangezien cannabis ook gerookt kan worden is gekozen voor categorie 4B; 4B is strenger dan 4A.</p>

grafie 'Heavy metals in herbal drugs and fatty oils (2.4.27)'.

Gewichtsverlies door drogen

Niet meer dan 10,0%, bepaald op 0,500 g van de verpoederde bloemen (< 1 mm) en verwarmd gedurende 24 uur bij 40°C boven fosforpentoxide onder vacuüm. Zie de EP monografie 'Loss on drying (2.2.32.)', methode C.

Verwante verbindingen en gehalte

(HPLC-DAD)

[N.B.: In Cannabis kan de van nature aanwezige veelvoud van cannabinoïden aanleiding geven tot niet-gescheiden pieken van die componenten die in geringe hoeveelheden aanwezig zijn (o.a. CBD en CBN). Ook kan een geringe verschuiving van de retentietijd optreden van deze componenten in de testoplossingen t.o.v. de retentietijd van de referentieoplossingen. Door de kenmerkende spectra van CBD, CBN en cannabinoïdzuren zijn deze herkenbaar m.b.v. Diode Array Detectie. Bij het evt. gebruik zonder DAD-detector dient bij de analyse verificatie van deze pieken plaats te vinden door middel van standaardadditie aan de testoplossingen].

Testoplossing (a): Weeg 750 mg van de verpoederde bloemen (< 1 mm) en schud gedurende 15 minuten met 40 ml methanol R en centrifugeer. Breng de heldere bovenlaag in een 100 ml maatkolf. Herhaal met 25 ml methanol R en vul de maatkolf aan met methanol R.

Testoplossing (b): Weeg 750 mg van de verpoederde bloemen (< 1 mm) en verwarm gedurende 2,5 uur bij 100 ± 2°C in een indampschaal. Schud gedurende 15 minuten

De bepaling van gewichtsverlies door drogen is noodzakelijk om gehalten in natuurlijk materiaal van verschillende herkomst te kunnen vergelijken. Volgens de 'Technical guide on plants' is deze test geoorloofd, wanneer het product minder dan 1% essentiële oliën bevat; anders dient het watergehalte bepaald te worden d.m.v. destillatie(8). Cannabis bevat 0,1 - 0,3% essentiële oliën(4).

Er is gekozen voor HPLC, omdat:

- a) met behulp van HPLC zowel de cannabinoïdzuren als de cannabinoïden, zoals deze aanwezig zijn in het product, geanalyseerd kunnen worden. Bij toepassing van GC worden de zuren door de hoge temperatuur in de injector omgezet in de overeenkomstige vrije verbindingen.
- b) HPLC een volledig geïmplementeerde analysetechniek is in farmaceutische controle-laboratoria. Dit in tegenstelling tot LC-MS.
- c) HPLC-DAD uitstekend toepasbaar is voor kwantificeren wegens het lineaire verband volgens de Wet van Lambert-Beer. Dit in tegenstelling tot DLC, aangezien vlekintensiteiten geen lineair verband vertonen met de concentratie.
- d) de detectiegrens bij gebruik van HPLC-DAD of HPLC-UV normaliter lager ligt dan bij gebruik van DLC.

Er worden twee testoplossingen bereid. Testoplossing (a) bevat alle componenten, zoals die in het aangeboden product aanwezig zijn. In testoplossing

met 40 ml methanol R en centrifugeer. Breng de heldere bovenlaag in een 100 ml maatkolf. Herhaal met 25 ml methanol R en vul de maatkolf aan met methanol R.

Referentieoplossing (a): Δ^9 -THC 1,0 mg /1,0 ml
Bereid uitgaande van referentieoplossing (a), oplossingen met een concentratiebereik van 0,025 mg/ml tot en met 1,0 mg/ml.

Referentieoplossing (b): CBD 1,0 mg/1,0 ml
Bereid uitgaande van referentieoplossing (b), oplossingen met een concentratiebereik van 0,005 mg/ml tot en met 0,5 mg/ml.

Referentieoplossing (c): Δ^9 -THC, CBN, CBD:
1 mg/5,0 ml

Referentieoplossing (d): CBN 1,0 mg/20,0 ml

Kolom: L = 0,10 m, ID = 3,0 mm, stationaire fase = octadecylsilyl silicagel (5 μ m)

Kolomtemperatuur: 25°C

Mobiele fase:

Mobiele fase A: acetonitril.

Mobiele fase B: meng 0,5 ml 85% fosforzuur met 1000 ml water.

Tijd (min)	mob. fase A (%; V/V)	mob. fase B (%; V/V)
0-28	58	42
28-35	58→80	42→20
35-40	80	20
40-45	80→58	20→42
45-60	58	42

Flow: 1,0 ml/min

Detectie: 230 nm

Injectie: 10 μ l van de testoplossingen en 15 μ l van de referentieoplossingen.

De retentietijd van Δ^9 -THC m.b.v. referentieoplossing (c) is ongeveer 25 min, de relatieve retentietijd van CBN (t.o.v. Δ^9 -THC) is ongeveer 0,8 en van CBD ongeveer 0,5. De relatieve retentietijd van THCA bedraagt ongeveer 1,4. De test is niet geschikt tenzij de resolutie tussen de pieken overeenkomend met CBN en Δ^9 -THC niet kleiner is dan 3,5. Wijzig, indien nodig, de concentratie van acetonitril in

(b) zijn door het verwarmen de cannabinoïdzuren geheel of gedeeltelijk omgezet in de corresponderende vrije verbindingen.

De twee chromatografische profielen, verkregen met deze testoplossingen, zijn karakteristiek voor het betreffende type Cannabis. In een nog uit te voeren houdbaarheidsstudie zal onderzocht worden in hoeverre deze profielen zich wijzigen onder invloed van bewaarcondities. Wanneer de resultaten van dit onderzoek beschikbaar zijn, zullen er eisen gesteld worden aan de variatie in het profiel.

Een geschikte kolom is Inertsil 5 ODS-3.

In figuur 2 (pag. 14 t/m 16) zijn de verschillende chromatogrammen weergegeven.

<p>het gradiëntprofiel om de vereiste resolutie te bereiken.</p> <p>Verwerp voor het berekenen de pieken welke afkomstig zijn van het oplosmiddel (methanol).</p> <p><u>Cannabis type I</u> <u>Cannabis type II</u></p> <p>Bereken het gehalte Δ^9-THC en CBD op de gedroogde stof m.b.v. de piekoppervlakten welke verkregen zijn met testoplossing (b) en de kalibratielijnen van de overeenkomstige pieken in de chromatogrammen welke verkregen zijn met de bereide oplossingen van referentie-oplossing (a) en (b). Houdt rekening met het verschillende injectievolume.</p> <p>In het chromatogram verkregen met test-oplossing (b) is het oppervlak van de piek overeenkomend met CBN kleiner dan het oppervlak van de piek overeenkomend met de piek van CBN in referentie-oplossing (d) (1,0%).</p>	<p>Hoewel de monografie toegepast kan worden voor de kwaliteitscontrole van diverse typen Cannabis, is ze gebaseerd op de resultaten verkregen met de twee hier genoemde typen.</p> <p>Dit is een eis; wanneer hieraan niet wordt voldaan, is het profiel zodanig gewijzigd, dat het product afgekeurd dient te worden.</p>
<p>BEWAREN</p> <p>In luchtdichte verpakking, beschermd tegen licht en vocht.</p>	
<p>BENODIGDE STANDAARDEN</p> <p><u>Cannabinoïden</u></p> <p>1. Δ^9-Trans-tetrahydrocannabinol; $C_{21}H_{30}O_2$; (M_r 314,5) 6a,7,8,10a-Tetrahydro-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol</p> <p>2. Cannabidiol; $C_{21}H_{30}O_2$; (M_r 314,5) 2-(3-Methyl-6-isopropenyl-2-cyclohexen-1-yl)-5-pentyl-resorcin</p> <p>3. Cannabinol; $C_{21}H_{26}O_2$; (M_r 310,4) 6,6,9-Trimethyl-3-pentyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol</p>	<p>De standaarden zijn als oplossing van 1,0 mg/ml (in MeOH) commercieel verkrijgbaar.</p> <p>Voor THC wordt ook de farmaceutische benaming dronabinol gebruikt.</p>
<p>BENODIGDE REAGENTIA</p> <p>Reagentia, kwaliteit conform EP reagentia Echtblauwzout B; $C_{14}H_{12}Cl_2N_4O_2$; (M_r 339,2); 1037400. Gestabiliseerd met zinkchloride.</p>	

<p>(3,3'-Dimethoxy(biphenyl)-4,4'-bisdiazonium dichloride)</p> <p>Chloralhydraat oplossing Oplossing van 80 g chloralhydraat (C₂H₃Cl₃O₂; M_r 165,4) in 20 ml water.</p> <p>Methanol en acetonitril zijn van HPLC kwaliteit.</p>	
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

Top van de plaat		
oranje zone (CBD) roodviolette zone (Δ^9 -THC) violette zone (CBN)	roodoranje zone (THCA)	roodviolette zone (Δ^9 -THC)
Referentieoplossingen	Testoplossing (a)	Testoplossing (b)

Figuur 1: Schematische weergave van de dunne-laag-chromatogrammen.

Figuur 2A t/m 2E: Chromatogrammen en UV-spectra, behorende bij de test op verwante verbindingen.

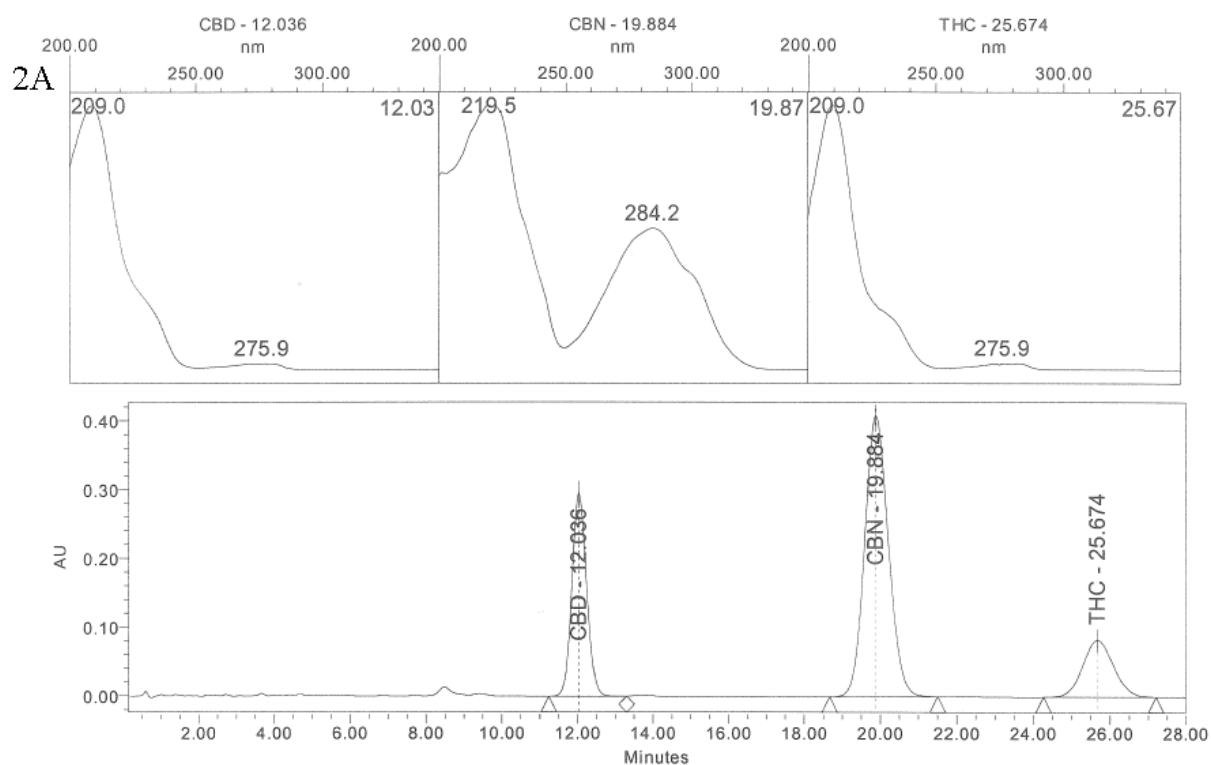


Fig. 2A: Referentieoplossing (c): Δ^9 -THC, CBN en CBD, elk 1 mg/5,0 ml.

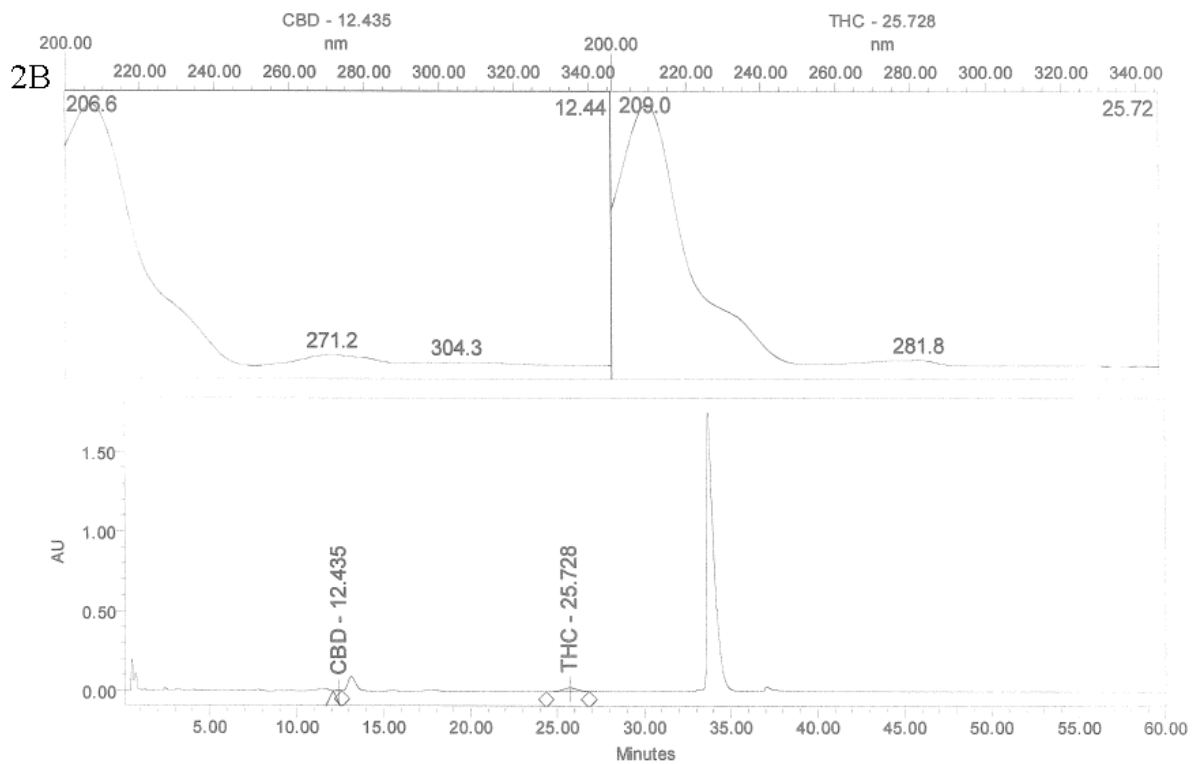


Fig. 2B: Testoplossing (a) van Cannabis type I (voor verhitten).

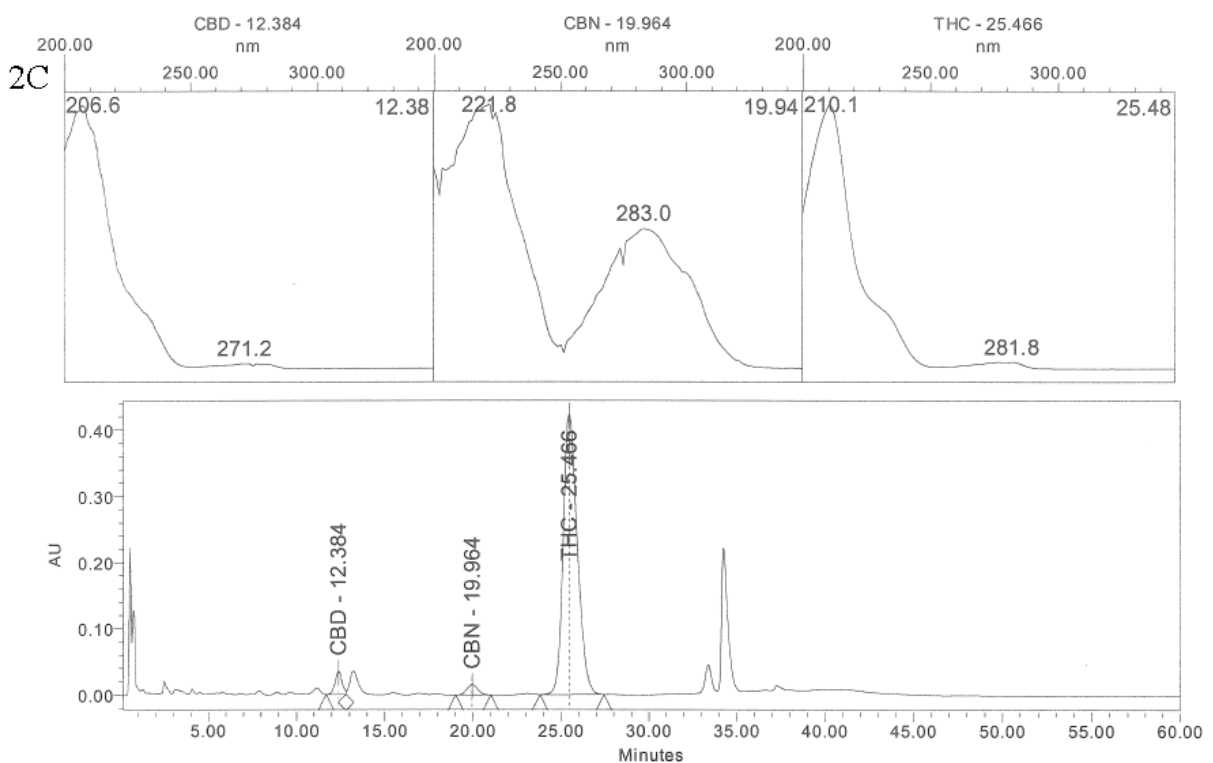


Fig. 2C: Testoplossing (b) van Cannabis type I (na verhitten).

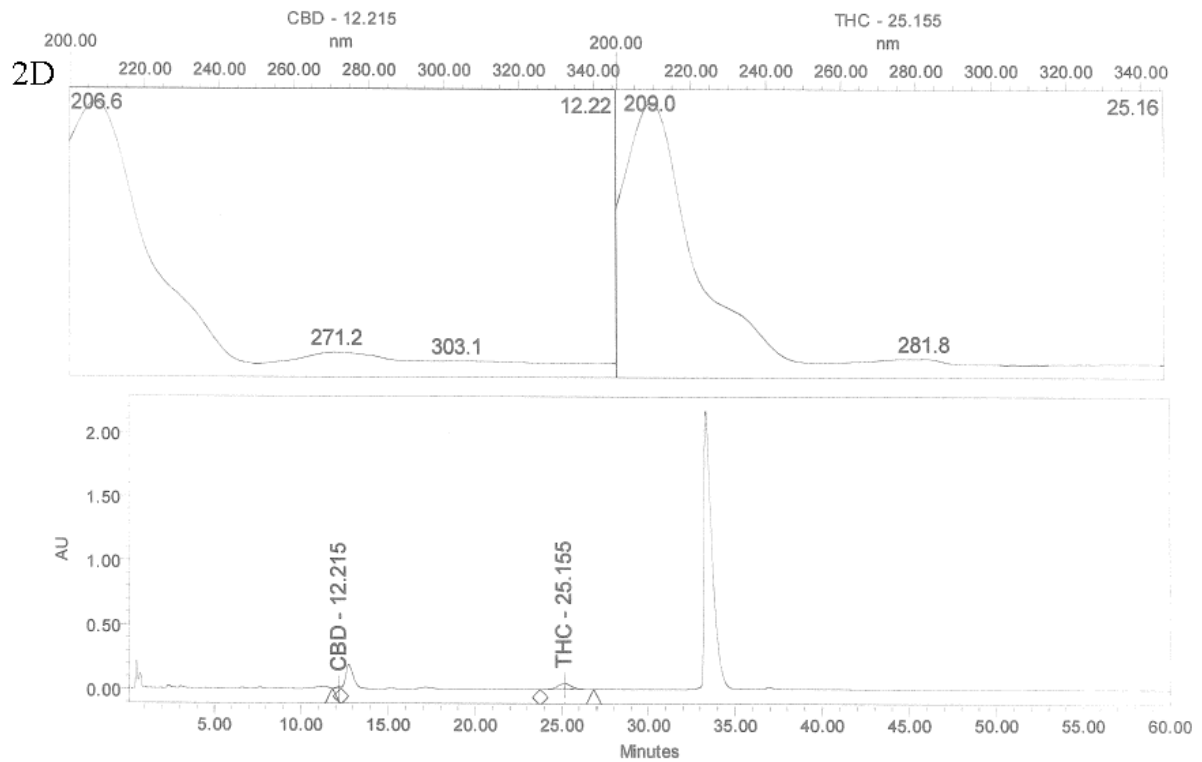


Fig. 2D: Testoplossing (a) van Cannabis type II (voor verhitten).

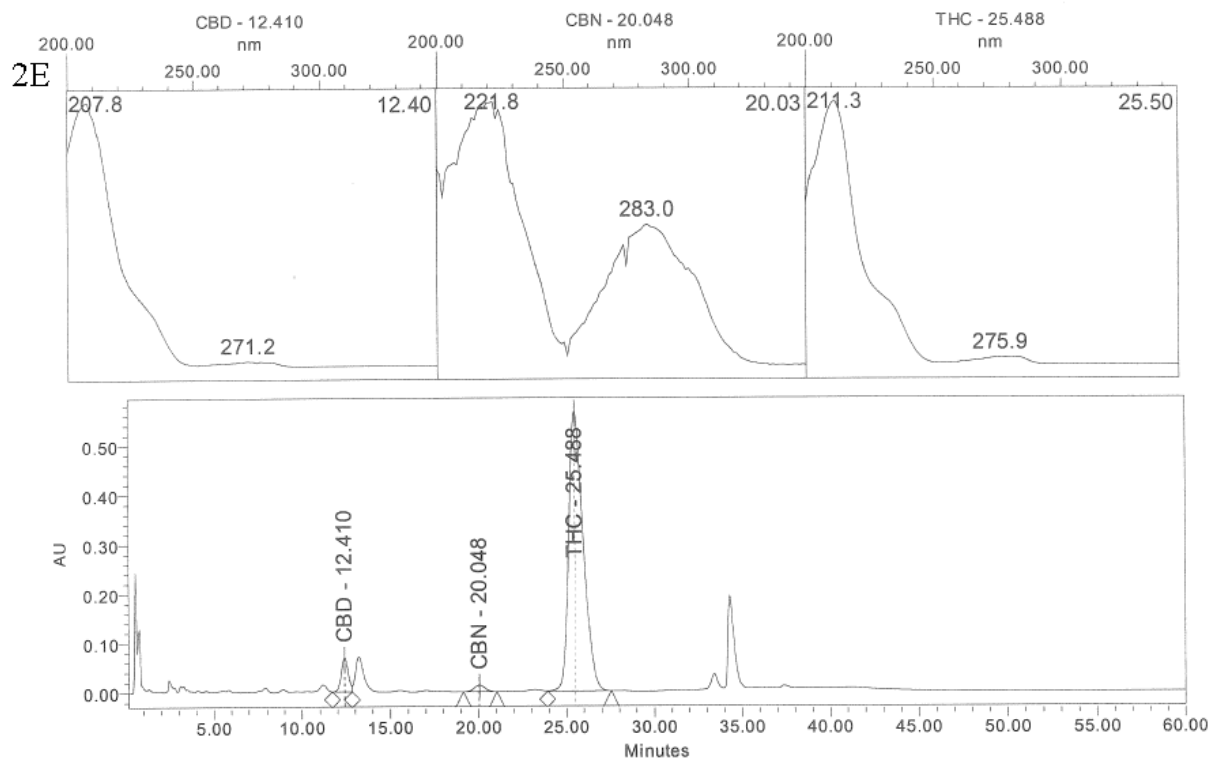


Fig. 2E: Testoplossing (b) van Cannabis type II (na verhitten).

3. Methode-ontwikkeling en validatie

3.1 Monstervoorbewerking

De invloed van de fijnheid van het verpoederd materiaal op de extractie is onderzocht door opwerking van materiaal met een deeltjesgrootte van 1 mm en van 4 mm. Als indicatie voor de extractie-efficiëntie is het gehalte THC na verhitten gebruikt. Met behulp van een T-toets (niet gepaard, dubbelzijdig, $\alpha = 0,05$) is vastgesteld dat het THC-gehalte bij deeltjes van 1 mm significant hoger is dan bij deeltjes van 4 mm (tabelwaarde = 2,447; toetswaarde = 4,871). Verondersteld kan worden dat de extractie-efficiëntie omgekeerd evenredig is met de deeltjesgrootte. Met gangbare maalapparatuur is de ondergrens voor deeltjesgrootte echter ca. 1 mm; voor kleinere deeltjes dient een geavanceerde maaltechniek toegepast te worden.

Diverse oplosmiddelen en combinaties hiervan zijn getest voor de extractie. Petroleumether gaf opsplitsing van de THC-piek onder de gebruikte HPLC-condities. Er werden geen duidelijke verschillen waargenomen bij gebruik van methanol of methanol/chloroform. Vanwege de toxiciteit van chloroform is gekozen voor methanol als extractiemiddel.

3.2 Gewichtsverlies door drogen

Voor de bepaling van gewichtsverlies door drogen zijn de volgende parameters onderzocht:

- monstervoorbewerking: wel of niet verpoederen;
- droogtemperatuur: 40°C, 50°C en 105°C;
- droogtijd: 4, 6, 8, 12, 16, 20 en 24 uur.

Aangezien bij 50°C al decarboxylering van cannabinoïdzuren optreedt, is een lagere temperatuur vereist. Drogen van verpoederd materiaal gedurende 24 uur bij 40°C onder vacuüm boven fosforpentoxide bleek in deze studie de beste resultaten te leveren. Tevens is de herhaalbaarheid van deze methode vastgesteld.

3.3 Verwante verbindingen en gehalte

De HPLC-methode is op diverse parameters onderzocht:

- scheiding van de diverse componenten: eluens, gradiënt en kolom geoptimaliseerd;
- responsverhoudingen van de componenten bij verschillende golflengten: geoptimaliseerd;
- lineariteit: aangetoond voor het betreffende concentratiegebied;
- herhaalbaarheid piekoppervlak THC en CBD: < 1,0% (n = 6);
- herhaalbaarheid retentietijd THC en CBD < 1,0% (n = 6);
- dag tot dag herhaalbaarheid voor het gehalte THC en CDB:
 $RSD_{\text{gemiddeld}} \leq 2,0\%$ resp. $\leq 3,0\%$; voor individuele waarden geldt: $RSD \leq 2 * RSD_{\text{gemiddeld}}$;
- carry-over: geen;
- stabiliteit van de standaardoplossingen: meerdere dagen stabiel;
- recovery op basis van standaardadditie: 97,5 - 101,6% (3 verschillende bepalingen).

Dankbetuiging

De auteurs danken de medewerkers van het RIVM-LAC voor de analyse op zware metalen en de heren J.S. Toren en P.J. Dingemanse (Centrum voor Kwaliteit van Chemisch-Farmaceutische Producten (RIVM-KCF) voor de technische assistentie.

Literatuur

- (1) European Pharmacopoeia. 2002, 4th edition, including all supplements uptill 4.5.
- (2) Lehmann T, Brenneisen R. A new chromatographic method for the isolation of (-)- Δ^9 -(trans)-tetrahydrocannabinolic acid A. *Phytochem Anal* 1992; 3:88-90.
- (3) Baardman, R. Verkenning Medicinale Cannabis. *Complex Simplex*. 2003. Den Haag, ZonMw en verwijzingen hierin.
- (4) Aye RD, et al. Cannabis. In: Drogen: A-D. Hänsel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G, editors. 5, 4, 640-655. 1992. Berlin, Springer-Verlag. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. von Bruchhausen, F., Dannhardt, G., Ebel, S., Frahm, A. W., Hackenthal, E., Hänsel, R., Holzgrabe, U., Keller, K., Nürnberg, E., Rimpler, H., Schneider, G., Surmann, P., Wolf, H. U., and Wurm, G.
- (5) Lehmann T, Brenneisen R. High performance liquid chromatographic profiles of cannabis products. *J Liquid Chromatogr* 1995; 18(4):689-700.
- (6) Mölleken H, Husmann H. Cannabinoids in seed extracts of *Cannabis sativa* cultivars. *J International Hemp Assoc* 1997; 4(2):76-79.
- (7) Niesink, R. J. M., Pijlman, F. T. A., Rigter, S., Hoek, J., and Mostert, L. THC-concentraties in wiet, nederwiet en hasj in Nederlandse coffeeshops (2001-2002). 2002. Utrecht, Trimbos-instituut.
- (8) Technical Guide on Plants. PA/PH/Exp. 13A/T (99) 36. 1999. Group of experts No.13A, European Pharmacopoeia Commission, Council of Europe.

GLP verklaring

Ondergetekende verklaart hierbij dat het werk, dat hierin is beschreven, is uitgevoerd overeenkomstig de OESO-beginselen van Good Laboratory Practice (GLP) en dat dit rapport een compleet, correct en betrouwbaar overzicht geeft van de verkregen resultaten.

Een GLP-inspectie van de experimenten, en een verslag hiervan aan de onderzoeksleider en het management is gemaakt op de volgende data:

Datum GLP-inspectie/Datum verslag

23 jan. 2004 / 29 jan. 2004

Dit RIVMrapport, nr. 267011 001, is geïnspecteerd d.d. 6 feb. 2004.

Kwaliteitsfunctionaris

naam : G.M. Overvliet

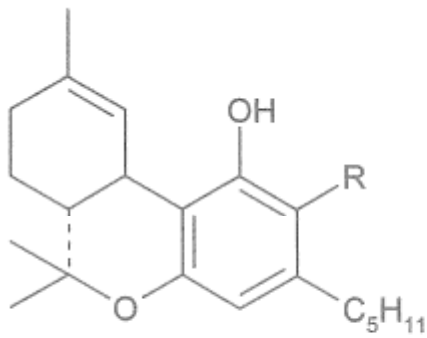
laboratorium : KCF

datum : 06-02-2004

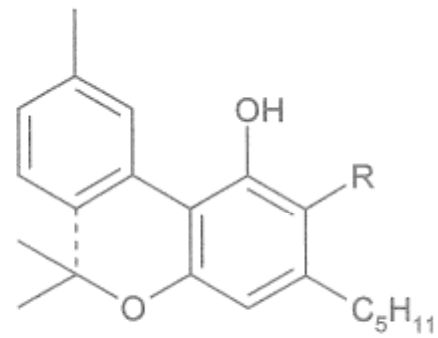
handtekening :



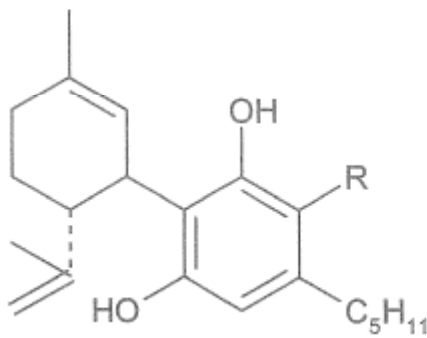
Bijlage 1 Structuren cannabinoïden



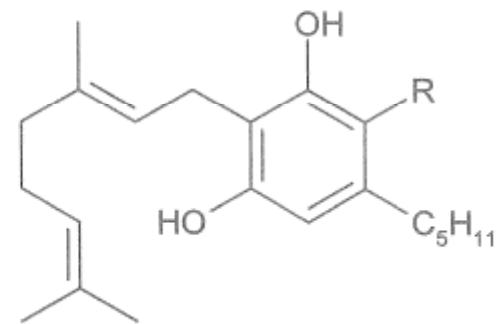
Δ^9 -THC: R = H
 Δ^9 -THCA: R = COOH



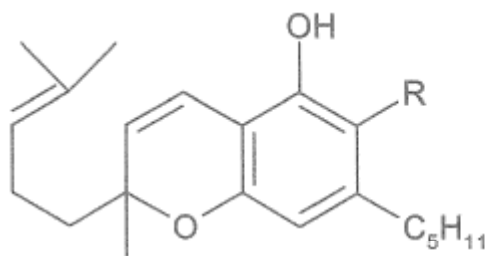
CBN: R = H



CBD: R = H
 CBDA: R = COOH



CBG: R = H
 CBGA: R = COOH



CBC: R = H
 CBCA: R = COOH

Bijlage 2 Verzendlijst

- 1-2 Drs. W.K. Scholten, BMC; Ir. J.I.M. de Goeij, Directeur-Generaal VWS
- 3 Prof. Dr. J.A. Knottnerus, Voorzitter van de Gezondheidsraad, Postbus 16052, 2500 BB Den Haag
- 4-18 Drs. J.C.M.E. Bender, Farmalyse, Zaandam
Dr. J.G.J. Mol, TNO Nutrition and Food Research, Zeist
Prof. Dr. R. Verpoorte, Leiden/Amsterdam Center for Drug Research, Leiden
Prof. Dr. J.A. Walburg, Trimbos-instituut, Utrecht
Drs. D.J.D. Dees, ZonMw, Den Haag
Prof. Dr. J.H. Kingma, IGZ, Den Haag
Drs. J.M.M. Hansen, IGZ, Den Haag
Drs. W. Best, IGZ, Den Haag
Dr. F.J. van de Vaart, WINAp, Den Haag
Prof. Dr. C.J. de Blaey, WINAp, Den Haag
M. Verbrugge, Hiv Vereniging Nederland, Amsterdam
F. Clevers, MS Vereniging Nederland, Den Haag
Raad van Bestuur Jellinek, Amsterdam
G. de Zwaan, Stichting Patiëntenbelangen Medische Marihuana, Rotterdam
Drs. A.G.M. van Asseldonk, Nederlandse Vereniging voor Fytotherapie, Beek-Ubbergen
- 19 Depot Nederlandse Publikaties en Nederlandse Bibliografie
- 20 Directie RIVM
- 21-27 Dr. Ir. A.M. Henken (VGZ)
Dr. Ir. R.D. Woittiez (MEV)
Dr. Ir. H.J.G.M. Derks (KCF)
Ir. H.J.W.J. van de Wiel (LAC)
Dr. R. Ritsema (LAC)
P.J. Dingemanse (KCF)
J.S. Toren (KCF)
- 28-31 Auteurs
- 32 SBC/afd. Communicatie
- 33 Bureau Rapportenregistratie
- 34 Bibliotheek RIVM
- 35-44 Bureau Rapportenbeheer
- 45-75 Reserve exemplaren

Erratum op rapport nr. 267011001

- pag. 2, **Abstract**, regel 3: “still” moet verwijderd worden.
regels 5 en 6: “Dutch Office for Medicinal Cannabis” moet zijn
“Dutch Office of Medicinal Cannabis”.
regel 15: “(THC)” wijzigen in “(THC; dronabinol)”.

pag. 17, **3.3 Verwante verbindingen en gehalte**, regel 7: “CDB” moet zijn “CBD”.

pag. 22, **Bijlage 2 Verzendlijst**: toevoegen:

- Mr. L.J.S. Wever, GMT/VWS, Den Haag
- H.J.J. Seeverens, Begeleidingscommissie
Medicinale Cannabis, Den Haag
- J. Burton, Rotterdam
- Tj. Erkelens, Veendam