

(19)



REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt

(10) Nummer:

AT 408 279 B

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer:

669/98

(51) Int. Cl.⁷: G01N 31/22

(22) Anmeldetag:

21.04.1998

(42) Beginn der Patentdauer:

15.02.2001

(45) Ausgabetag:

25.10.2001

(56) Entgegenhaltungen:

US 3656906A US 4816415A EP 132313A2

(73) Patentinhaber:

RAUSCH PETER
A-3300 AMSTETTEN, NIEDERÖSTERREICH (AT).

(72) Erfinder:

RAUSCH PETER
AMSTETTEN, NIEDERÖSTERREICH (AT).

(54) NACHWEIS UND BESTIMMUNG VON PHENOLISCHEN INHALTSSTOFFEN MITTELS DIREKTER
NASSCHEMISCHER METHODEN

AT 408 279 B

(57) Es werden modifizierte nasschemische Analysenmethoden zum Nachweis und zur Bestimmung von phenolartiger Verbindungen und Cannabinoiden mittels Farbreaktionen auf bisher nicht bekannte, einfache Weise, direkt in Frischpflanzen, Pflanzenmaterialien und deren Zubereitungen beschrieben.

Es wurden weiters Verfahren gefunden, mit denen erstmals der spezifische, nasschemische Nachweis einzelner Cannabinoide mittels spezieller Farbreaktionen selektiv durchgeführt werden kann.

Durch ihre Konzeption sind die neu entwickelten Verfahren für die Anwendung in Analysen-Schnelltest-Packungen verwendbar, sodaß die gewünschten Bestimmungen auch für Laien schnell und problemlos durchgeführt werden können.

Phenolische Verbindungen sind wichtige, pharmakologisch wirksame Inhaltsstoffe verschiedener Pflanzen und daraus hergestellter Zubereitungen.

Insbesonders Cannabinoide, die Hauptwirkstoffe der Hanfpflanze (*Cannabis sativa*) stehen durch ihre vielfältigen und wertvollen pharmakologischen Eigenschaften in letzter Zeit im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses.

Für ihren Nachweis sind verschiedene physikalische, chemische und auch diverse nasschemische Methoden bekannt. Letztere werden hauptsächlich in Form von "Spot Tests" unter Verwendung von Sprühreagenzien angewendet.

US 3,656,906 A beschreibt den Nachweis von Cannabinoiden in biologischen Materialien wie Blutplasma und Urin durch Kondensation der vorher extrahierten Cannabinoide mit Polycarboxylsäure und anschließender photometrischer Bestimmung.

In US 4,816,415 A wird ebenfalls der Nachweis von Cannabinoiden in Körperflüssigkeiten beschrieben. Bei diesem Verfahren werden die Cannabinoide mit Hilfe eines Spezialfiltertrichters an Aryl-carboxylsäuren gebunden und anschließend durch Farbreaktion mit bekannten Reagenzien, nämlich Echtblaualsalz BB, Echtbordeaux-Salz-Gp, Echtgrünsalz, Duquenois-Negm-Reagens oder Beam-Reagens der Cannabinoidegehalt ermittelt.

In EP 132 313 A2 werden Cannabinoid-Nachweis-Methoden für Drogentest-Packungen auf Basis von Diazonium-Reagenzien beschrieben. Die Reaktion wird auf Filterpapier durchgeführt und die Reagenzien in flüssiger Form oder als Spray aufgetragen.

Diese und ähnliche Verfahren sind relativ umständlich durchzuführen und meist ist eine Aufbereitung des Probematerials durch Maßnahmen wie Trocknung, Extraktion, Filtration und Eindampfen, notwendig, um die entsprechenden Bestimmungen durchführen zu können.

Dies erfordert einen erheblichen Arbeitse- und Zeitaufwand und kann mitunter auch zu einer Veränderung der stofflichen Zusammensetzung des Probematerials führen.

Außerdem ist bei diesen Methoden häufig die Verwendung von giftigen oder stark ätzenden Chemikalien erforderlich, was für eine breite Anwendung durch den Laien ist.

Im Bereich der Drogenfahndung wird zur Cannabis-Schnellerkennung hauptsächlich die nasschemische Duquenois-Reaktion in Form eines Analysen-Test-Kits eingesetzt. Diese Methode ist jedoch wenig spezifisch, kann keinerlei Auskunft über das tatsächliche Cannabinoid-Verhältnis geben, arbeitet mit konzentrierter Säure und ist außerdem nicht ganz einfach durchzuführen.

Nach den nun neu entwickelten Verfahren werden speziell ausgewählte Farbreaktionen so modifiziert, daß die Reagenzien gleich dem als Extraktionsmittel fungierendem Lösungsmittel zugefügt und in der nasschemischen Nachweisreaktion direkt eingesetzt werden. Dadurch sind die sonst notwendigen Vorbehandlungen Probematerials, wie Trocknen, Extraktion und abschließendes Eindampfen nicht mehr erforderlich.

Durch geeignete Auswahl und Konzeption der Reagenzien, sowie durch spezielle Modifikation bei der Durchführung des Verfahrens konnte erreicht werden, daß der jeweils vorherrschende Phenolkörper durch Entwicklung eines spezifischen, deutlich unterscheidbaren Farbtönes einzeln für das Auge sichtbar gemacht und so auf bisher nicht bekannte, einfache und schnelle Weise direkt nasschemisch nachgewiesen werden kann.

Durch Verfeinerung des Verfahrens konnte zusätzlich eine optimale, besonders leicht ablesbare Abstufung, sowie eine mehrere Stunden anhaltende Beständigkeit der entstandenen Farbtöne erreicht werden.

Auf diese Weise ist es erstmals auch möglich frisches, unbehandeltes Probematerial und sogar Frischpflanzen direkt der Untersuchung zu unterwerfen und nach phenolischen oder Cannabinoiden Bestandteilen zu analysieren.

Besonders bewährt hat sich diese Methode beim Nachweis von Cannabinoiden, den pharmakologisch interessanten Hauptwirkstoffen des Hanfes.

Damit ist erstmals eine Unterscheidung von Drogen- und Industriehanf sogar bei männlichen und jungen Pflanzen ab einem Alter von zwei Wochen möglich.

Des weiteren kann die Bestimmung des Reifegrades von Hanfpflanzen auf schnelle und einfache Weise sogar direkt an Frischpflanzen vorgenommen werden.

Durch spezielle Modifikationen der Reagenzien und der Verfahren konnten neue Methoden zum selektiven nasschemischen Nachweis einzelner spezifischer Cannabinoide gefunden werden.

Die Verfahren können auch für die Identifizierung und Qualitätsbeurteilung von ätherischen

Ölen und Pflanzenmaterialien durch Bestimmung vorhandener Phenolkörpern eingesetzt werden.

Durch die einfache Durchführung und die Verwendung möglichst ungiftiger Reagenzien und Lösungsmittel ist es auch für den ungeübten Laien möglich die beschriebenen Tests ohne Schwierigkeiten durchzuführen.

5 Aufgrund der einfachen Konzeption des Verfahrens und der dazu nötigen Reagenzien, eignen sich diese Verfahren besonders für Analysenpackungen (Test-Kits) die direkt an Ort und Stelle eingesetzt werden können.

Mittels dem Fachmann bekannter, photometrischer Messung der Hauptmaxima der entwickelten Farbtöne können die Verfahren auch zur quantitativen Bestimmung der nachgewiesenen 10 Phenolkörper herangezogen werden.

In der Reagens-Lösung A werden als Lösungsmittel ein-, oder mehrwertige Alkohole alleine oder deren Gemische mit oder ohne Zusatz anderer organischer Lösungsmittel verwendet, welche einerseits eine optimale Extraktion der Wirkstoffe und andererseits aber auch gute Löse-Eigenschaften für das verwendete Reagens und eine störungsfreie Farbreaktion garantieren.

15 Die zur Farbentwicklung notwendigen Reagenslösungen B wurden so konzipiert, daß sie zwecks möglichst einfacher und effektiver Handhabung nur in Tropfenzahlen dem Reagensgemisch zugegeben werden können.

Durch die Zugabe von Salzen organischer Säuren zu den Reagenslösungen B konnte weiters 20 eine besser Ablesbarkeit der entwickelten Farbtöne, sowie eine verbesserte Haltbarkeit derselben erzielt werden.

Folgende Reagenzien und Lösungsmittel wurden verwendet:

Echtschwarz K, Echtblaualsalz B, 2,6-Dibromchinon-chlorimid, 2,6-Dichlorchinon-chlorimid, Formaldehyd, Acetaldehyd, Salicylaldehyd Vanillin, p-Dimethylamino-benzaldehyd, p-Diethylamino-benzaldehyd, Eisen-III-chlorid, 4-Amino-antipyrin, 4-Aminophenol, Kaliumhexacyanoferrat, 25 Ammonium-Azetat, Natrium-Azetat, Alkalihydroxide und Ammonium- und Alkalisalze organischer Säuren und als Lösungsmittel Wasser, primäre, sekundäre und tertiäre Alkohole C-1 bis C-10 mit oder ohne Zusatz von organischen Lösungsmitteln wie ungesättigte Kohlenwasserstoffe, halogenierte Kohlenwasserstoffe, Äther, Ketone, Carbonsäureester, und aromatische Kohlenwasserstoffe.

30 Die Erfindung soll anhand der folgenden Beispiele erläutert und illustriert werden, ohne sich jedoch auf diese zu beschränken :

BEISPIELE

35 BEISPIEL 1

NASSCHEMISCHE BESTIMMUNG VON PHENOLEN UND CANNABINOÏDEN IN VERSCHIEDENEN MATERIALIEN UND FRISCHPFLANZEN

40 Reagenzien:

Reagens A: Lösung von 0,01 % p-Aminophenol in Isopropanol

Reagens B: 10 %ige Lösung von Natriumhydroxyd in H₂O-Isopropanol (2 : 1)

45 Durchführung:

20 bis 100 Milligramm des Probematerials werden in einem glasklaren, ungefärbten Reagensrörchen mit 2 ml Reagens A versetzt, mehrmals geschüttelt, mit 2 Tropfen Reagens B versetzt wieder geschüttelt und die entstandene Färbung nach 10 Minuten abgelesen.

50 Farbreaktionen:

Blindwert: gelblichgrau = negativ

phenolische Verbindungen: Thymol ---> tiefblau

Cannabidiol --> violettrosa

THC ---> grünblau

Cannabinol --> blau

Hanf-Frischpflanzen : unreifer Drogenhanf --> violettröglich
ausgereifter Drogenhanf ---> blaugrün
reifer EU-Industriehanf (Felina 34) ---> violettröglich

ätherische Öle : Rosmarinöl ----> olivgrün
Oreganoöl --> blau
Thymianöl --> blau

10

BEISPIEL 2

SELEKTIVER NASSCHEMISCHER NACHWEIS VON TETRAHYDROCANNABINOL (THC)

15 Reagens A : 0,15 % Eisen-(III) Chlorid in absolutem Ethanol
Reagens B : 1 % Ammonium-Azetat in absolutem Ethanol

Durchführung :

20 10 bis 100 mg des Probematerials werden in einem glasklaren, farblosen Proberöhrchen mit 1,5 ml Reagens A versetzt und geschüttelt. Dann versetzt man mit 5 Tropfen Reagens B. Die Farbtöne werden nach 1 Minute abgelesen.

Farbreaktionen :

25 *Blindwert* ---> schwach bräunlichgelb = negativ
Cannabidiol ---> (schwach bräunlichgelb) = negativ
Cannabinol ---> (schwach bräunlichgelb) = negativ
THC ---> orange rotbraun = positiv

BEISPIEL 3

30 SELEKTIVER NASSCHEMISCHEN NACHWEIS VON THC

Reagenzien :

35 Reagens A : 0,01 %ige Lösung von Echtschwarz K in Ethanol
Reagens B : 5 %ige Natriumhydroxid-Lösung in Ethanol 50 %ig

Durchführung :

40 50 bis 100 mg Probematerial werden in einem glasklaren, ungefärbten Proberöhrchen mit 5 ml Reagens A versetzt und mehrere Male durchgeschüttelt. Ein Tropfen Reagens B wird zugegeben, abermals durchgeschüttelt und die entstandene Färbung innerhalb von 1 Minute abgelesen.

Farbreaktionen :

45 *Blindwert* = hell violettrosa = negativ
Cannabidiol = hell violettrosa = negativ
Cannabinol = hell violettross = negativ
THC = bräunl. orangerot = positiv

BEISPIEL 4

50 SELEKTIVER NASSCHEMISCHER NACHWEIS VON CANNABINOL

Reagenzien :

55 Reagens A : 0,01 %ige Lösung von 2,6,-Dichlorchinox-chlorimid in Isopropanol

Reagens B : wässrige, gesättigte Kaliumcarbonat-LösungDurchführung :

- 10 bis 50 mg Probe werden in einem glasklaren, ungefärbten Proberöhrchen mit 5 ml Reagens 5 A versetzt, mehrere Male durchgeschüttelt. Dann wird mit 1 Tropfen Reagens B versetzt, eine Minute kräftig durchgeschüttelt und die entstandene Färbung sofort abgelesen.

Farbreaktionen :

- 10 *Blindwert* --> hell bräunlichgelbe Färbung = negativ
 Cannabidiol --> hell bräunlichgelbe Färbung = negativ
 THC = hell bräunlichgelbe Färbung = negativ
 Cannabinoi = blaue Färbung = positiv

15

PATENTANSPRÜCHE:

1. Verfahren zum nasschemischen qualitativen und quantitativen Nachweis von phenolischen Substanzen, insbesonders von Cannabinoiden und solche Stoffe enthaltende Materialien, dadurch gekennzeichnet, daß das Probematerial in vorbehandelter oder unbehandelter Form, auch ohne vorherige Trocknung u.s.w., direkt mit der Lösung eines farbbildenden Reagens A mit oder ohne Zusatz von organischen Lösungsmitteln versetzt wird und zur Entwicklung der spezifischen Farbreaktion ein zusätzliches Reagens B zugegeben wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zur quantitativen Auswertung die fotometrische Messung in dem Fachmann bekannter Weise beim spezifischen Absorptionsmaximum des gebildeten Farbstoffes der jeweils zu bestimmenden phenolartigen Substanz durchgeführt wird.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, gekennzeichnet dadurch, daß als Reagens-A 0,001 bis 10 %ige Lösungen von Echtschwarz K, Echtblausalz B, 2,6-Dibromchinon-chlorimid, 2,6-Dichlorchinon-chlorimid, Vanillin, Salicylaldehyd, Formaldehyd, Acetaldehyd, p-Dimethylamino-benzaldehyd, p-Diethylamino-benzaldehyd, Eisen-III-Chlorid, 4-Amino-antipyrin, 4-Aminophenol, Kaliumhexacyanoferrat in Wasser und/oder primären, sekundären und tertiären Alkoholen C-1 bis C-10 mit oder ohne Zusatz von organischen Lösungsmitteln wie gesättigten und ungesättigten Kohlenwasserstoffen, halogenierten Kohlenwasserstoffen, Äthern, Ketonen, Carbonsäureestern und aromatischen Kohlenwasserstoffen und das Reagens B aus einer Lösung von 1 bis 50 % Alkalihydroxid in Wasser und/oder primären, sekundären und tertiären Alkoholen C-1 bis C-10 oder deren Gemischen mit oder ohne Zusatz von Ammonium- oder Alkalosalzen organischer Säuren verwendet werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erzielung einer verbesserten Farbaufteilung und Ablesbarkeit, sowie einer längeren Haltbarkeit der entwickelten Farbtöne dem Reagens B (nach Anspruch 3) 0,1 bis 20 % eines Ammonium- oder Alkalosalzes einer organischen Säure, wie Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Oxalsäure, Fumarsäure, Apfelsäure, Sorbinsäure, Benzoësäure, Salizylsäure, Phthalsäure, Phenylessigsäure, Naphtylessigsäure, Indol-3-essigsäure, u.s.w. zugesetzt wird.
- 45 5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß 0,01 bis 500 mg Probematerial in einem glasklaren, ungefärbten Proberöhrchen mit 1 bis 10 ml Reagens A (nach Anspruch 3) und nach Schütteln mit 1 bis 10 Tropfen Reagens B (nach Anspruch 3) versetzt wird und nach abermaligem Schütteln die entstandene Verfärbung abgelesen wird.
- 50 6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5 zum nasschemischen Nachweis von Cannabinoiden und anderen phenolartigen Stoffen, dadurch gekennzeichnet, daß Reagens A aus einer 0,001 bis 5 %igen Lösung von 4-Amino-phenol in primären, sekundären oder tertiären Alkoholen C-1 bis C-10 mit oder ohne Zusatz von anderen organischen Lösungsmitteln oder Wasser und Reagens B aus einer Lösung von 1 bis 50 % Alkalihydroxid in Wasser oder Alkoholen oder deren Gemischen zusammengesetzt

- ist und die Bestimmung nach Anspruch 5 durchgeführt wird und die entstandene Verfärbung nach 5 bis 10 Minuten abgelesen wird.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5 zum selektiven, nasschemischen Nachweis von Tetrahydrocannabinol dadurch gekennzeichnet, daß das Reagens A aus einer 0,05 bis 5 %igen Lösung von Eisen-II-Chlorid in Wasser und/oder primären, sekundären oder tertiären Alkoholen C-1 bis C-10 mit oder ohne Zusatz von anderen organischen Lösungsmitteln und Reagens B aus einer Lösung von 0,1 bis 5,0 % eines Ammoniumsalzes einer organischen Säure wie unter Anspruch 4 zusammengesetzt ist und die Bestimmung nach Anspruch 5 durchgeführt wird, wobei die entstandene Farbreaktion erst nach 2 Minuten ablesbar ist.
8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5 zum selektiven nasschemischen Nachweis von Cannabinol dadurch gekennzeichnet, daß Reagens A aus einer 0,001 bis 5 %igen Lösung von 2,6-Dibromchinon-chlorimid in primären, sekundären oder tertiären Alkoholen C-1 bis C-10, mit oder ohne Zusatz von anderen organischen Lösungsmitteln und Reagens B aus einer gesättigten wäßrigen Lösung von Kaliumcarbonat zusammengesetzt ist, die Farbreaktion nach Anspruch 5 durchgeführt und der entstandene Farbton innerhalb von 30 Sekunden abgelesen wird.
9. Anwendung der Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß diese zur Identifizierung und Qualitätsbestimmung von Cannabis-Präparaten wie Marihuana, Haschisch, Haschischöl und sonstigen Cannabinoid-hältigen Materialien, zur Bestimmung des Reifegrades von Hanfpflanzen, sowie zur Unterscheidung von Drogen- und Industrie-Hanf bei erwachsenen männlichen oder weiblichen und auch bei jungen Hanfpflanzen in frischer oder auch getrockneter Form, verwendet werden.
10. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß diese zum nasschemischen Nachweis verschiedener phenolartiger Verbindungen, in ätherischen Ölen, Resinoiden, Absolutes, Konkretes, Frischpflanzen, Pflanzendrogen, Pflanzenextrakten und Auszügen und Geruchstoffen, sowie zu deren Identifizierung und Charakterisierung verwendet werden.
11. Anwendung der Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10 in Analysen-Schnelltestpackungen (Test-Kits), dadurch gekennzeichnet, daß diese die beiden Reagenzien A und B abgefüllt in korrosionsfesten, mit einer Ausgußvorrichtung versehenen Fläschchen erforderlicher Größe, sowie mehrere kleine verschließbare glasklare, farblose Proberöhrchen zur Durchführung der Farbreaktion und eine Farbvergleichs-Skala zur Ablesung der entstandenen Farbtöne enthält.

35

KEINE ZEICHNUNG

40

45

50

55