

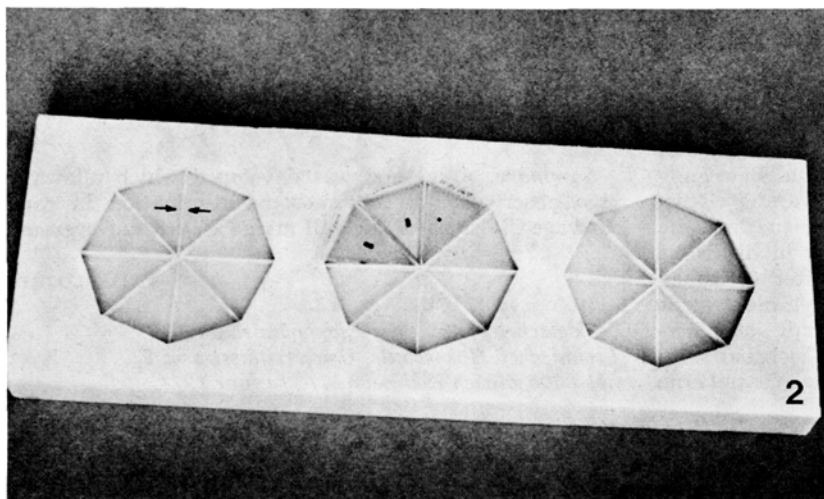


Fig. 2. Plastirack B. 'Pie'-like form with small bridges (arrows) for flat embedding; $\frac{1}{2}$ of original size.

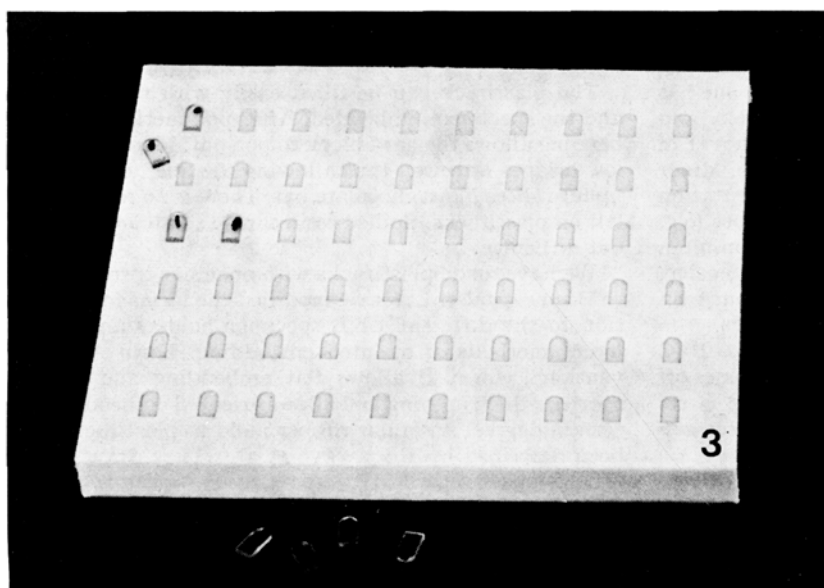


Fig. 3. Plastirack C. Modified form for LKB-specimen holder; $\frac{1}{2}$ of original size.

Vestopal, which does bind to the silicone rubber, each plastic can be used.

Plastiracks offer 3 advantages over the use of capsules: a) they cut the cost of embedding by eliminating capsules (and capsule holders); b) they facilitate the embedding procedure by shortening it and by elimination of razor blade injuries; c) they permit the desired orientation of the specimen.

Modified plastiracks have been used in our histology department. Preliminary results are encouraging since paraffin also does not bind to the silicone rubber used.

Zusammenfassung. Einbettungsformen aus Silikon-gummi wurden entwickelt mit dem Ziel, eine einfache, saubere und rasche Einbettung für eine grosse Zahl von Gewebsblöcken zu erreichen. Die Formen sind für Epon, Epon-Araldit und Maraglas, aber nicht für Vestopal verwendbar.

W. BAUER, R. BRODALE and C. HODEL

Medical and Biological Research Department, Sandoz Ltd., CH-4002 Basel (Switzerland), 30 March 1971.

A Simple Gas Liquid Chromatography Procedure for Determination of Cannabinoidic Acids in *Cannabis sativa* L.

A recent article by KIMURA and OKAMOTO¹ discussed the distribution of tetrahydrocannabinolic acid in fresh *Cannabis sativa* L. The method they employed for analysis of the plant material required heating the dry material at 110°C for 15 min in order to convert tetrahydrocannabinolic acid (THCA) to tetrahydrocannabinol (THC).

The sample was subsequently extracted and analyzed by gas chromatography. The THC content was assumed to be due mainly to THCA. KORTE², however, reports the extraction of the acids with hexane. This paper presents a simple method for determining THCA in *Cannabis sativa*.

Materials and methods. Dried 1 g samples of *Cannabis sativa* were extracted with chloroform according to a modified Lerner procedure³. The extracts were subsequently analyzed by gas chromatography using ethanol as the solvent (Figure 1). The extracts were then taken to dryness, in vacuo, at 25°C. The residues were dissolved in 0.5 ml dry pyridine and reacted with 0.5 ml bis-

(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide plus 1% trimethylchlorosilane (Regis Chemical Company) to form trimethylsilyl (TMS) derivatives of the acids and phenols. The solution was heated at 60°C approximately 5 min and injected into a gas chromatograph. The chromatogram consisted of peaks for the TMS derivatives of the cannabinoids as well as their acids (Figure 2).

TMS derivatives may be prepared by any good silylating procedure. Temperature programming may be employed to improve separation of the peaks by gas chromatography.

In order to determine if essentially all the THC and THCA were extracted from a plant sample, the sample was extracted, re-extracted, heated to 110°C for 15 min and extracted again. Each of the 3 extracts was analyzed by GLC, both silylated and unsilylated.

Gas chromatography. Beckman GC-5 and GC-45 gas chromatographs equipped with $1/8''$, 10' stainless steel columns packed with 2% OV-17 on 100-120 mesh Gas Chrom Q were used for the analyses. The oven temperature was 210°C, the carrier flow rate was 30 ml/min of nitrogen, and a flame ionization detector was used.

Results and conclusions. The THCA present in *Cannabis sativa* may be extracted along with the THC. A comparison of the amounts of THC and THCA which were initially present may be made by gas chromatography of trimethylsilyl derivatives of the extract (Figure 2). The chromatogram from an unsilylated extract has one peak which represents both THC and THCA. This occurs due to rapid decarboxylation of THCA in the heated inlet of the GLC.

Table I. Analysis of *Cannabis sativa* - THC and THCA

Sample	Δ^9 -THC + Δ^9 -THCA (%)	Δ^9 -THC (%)	Δ^9 -THCA (%)
Mexican female, 1969	1.5	0.07	1.4
Mexican male, 1969	1.5	0.3	1.2
Mexican female, 1968	0.84	0.55	0.29

Table II. Extraction of one sample of *Cannabis sativa* for THC and THCA

Extract	Δ^9 -THC + Δ^9 -THCA (%)	Δ^9 -THCA (%)
Initial extract with chloroform	0.73	0.28
Second extract with chloroform	0.034	0.011
Heating plant material from above at 110°C for 15 min followed by extraction with chloroform	0.011	none

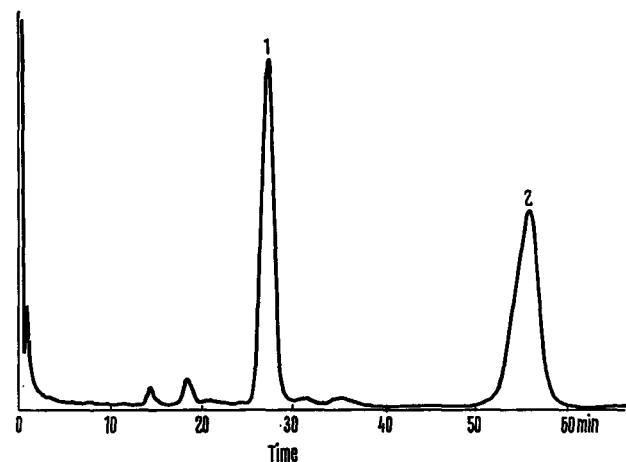


Fig. 1. Chromatogram of 1969 female Mexican *Cannabis sativa* extract (2-PF-81). Peak 1 = Δ^9 -THC + Δ^9 -THCA; peak 2 = internal standard².

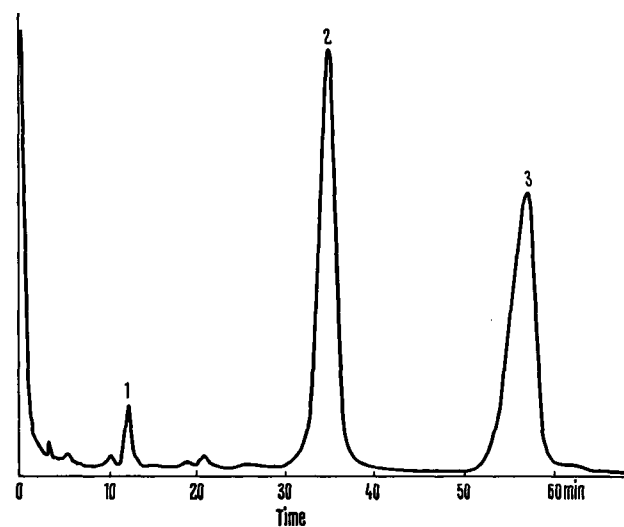


Fig. 2. Chromatogram of 1969 female Mexican *Cannabis sativa* extract (2-PF-81) which has been silylated. Peak 1 = Δ^9 -THC-TMS; peak 2 = Δ^9 -THCA-TMS; peak 3 = internal standard.

¹ M. KIMURA and K. OKAMOTO, *Experientia* 26, 819 (1970).

² F. KORTE, M. HAAG and U. CLAUSSEN, *Angew. Chem.* 4, 872 (1965).

³ The modified Lerner procedure and the internal standard method of calculating are explained in P. S. FETTERMAN, E. S. KEITH, C. W. WALLER, O. GUERRERO, N. J. DOORENBOS and M. W. QUIMBY, accepted for publication by *J. pharm. Sci.*

Table I represents the results of the early 1970 analysis of 3 samples of a Mexican variant of *Cannabis sativa*. The 1968 sample, having 35% of the THCA + THC present in the acid form could not have been as easily analyzed by the procedure followed by KIMURA and OKAMOTO¹.

Repeated extraction of a sample (Table II) proved that THCA is extracted with the solvent used.

The procedure presented here may also be used to determine the amounts of acids other than Δ^9 -THCA. Acid analysis is important in physiological research when the route of administration does not involve decarboxylation of any of these acids present^{4,5}.

Résumé. La chromatographie gazeuse des extraits de la marijuana donne la quantité complète de chaque composant cannabinoïque; tandis que la silylation des extraits précédant la chromatographie gazeuse, fournit

des informations indépendantes sur les formes acides et non acides de chaque composant cannabinoïque.

P. S. FETTERMAN, N. J. DOORENBOS,
E. S. KEITH and M. W. QUIMBY

*Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy,
University of Mississippi, Mississippi
(Mississippi 38677, USA), 25 January 1971.*

⁴ Mass spectrometric identification of Δ^9 -THC-TMS and Δ^9 -THCA-TMS by Battelle Memorial Institute, Columbus, Ohio. THCA formed a bis trimethylsilyl derivative, 1 on the phenol and 1 on the COOH group, thus protecting against decarboxylation during the GLC analysis of the cannabinoids. Other cannabinoidic acids also react in this way.

⁵ Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, University of Mississippi, research supported by National Institute of Mental Health, Contract No. HSM-42-70-109.

Technique d'enregistrement de l'activité unitaire du cortex cérébelleux, chez le chat chronique

L'intérêt de la technique d'enregistrement unitaire présentée ici réside dans le fait qu'elle satisfait aux exigences définies par la nature du travail expérimental auquel elle est adaptée, à savoir l'enregistrement unitaire des cellules de Purkinje du cervelet de Chat, sur animal chronique et libre, effectuant une série de gestes stéréotypés après apprentissage par conditionnement positif (type skinnérien), chaque animal devant être exploité durant plusieurs mois. Il était donc indispensable d'une part que l'ensemble prothèse, microélectrodes, microdescendeur soit suffisamment léger pour ne pas gêner l'activité motrice; d'autre part qu'un système de rappel permette l'implantation temporaire des microélectrodes uniquement pendant les périodes d'enregistrement (Figure 1). Les différentes techniques proposées depuis quelques années¹⁻⁹ ne satisfaisaient pas aux différents impératifs définis par notre expérimentation. D'autre part la conformation de la voûte crânienne au dessus du cervelet chez le Chat n'autorise pas l'adaptation des différents systèmes décrits par les auteurs.

Le système fondé sur un principe mécanique simple consiste en la poussée d'un piston dont les électrodes sont solidaires. Cette poussée se fait grâce à une vis différentielle permettant par une progression des électrodes de 2 en 2 μ m d'approcher avec suffisamment de précision une cellule de Purkinje. 3 parties essentielles constituent l'ensemble: le montage des microélectrodes, le microdescendeur et la prothèse de base, unique élément fixé à demeure sur la tête de l'animal.

1. *Montage des électrodes.* Des tiges de tungstène ($\varnothing$: 300 μ m) affinées selon la méthode de HUBEL¹⁰, et ramenées à la pointe entre 5 et 10 μ m, sont isolées au « vernis gris boloré de Alvar ». La résistance est évaluée à environ 1 M Ω . Les électrodes sont montées par couple de la façon suivante: deux électrodes de 55 mm et 60 mm de long sont enfilées dans un tube hypodermique ($\varnothing$ ext.: 1,2 mm) de 42 mm de long de façon à laisser dépasser les pointes sur 1 cm environ, et à dégager les extrémités supérieures. On pince à l'extrémité supérieure de chaque électrode 3 mm de tube hypodermique ($\varnothing$ ext.: 0,7 mm) sur lequel on peut souder aisément les fils de connexion. L'ensemble est alors verni de façon à isoler le fourreau mais aussi afin d'immobiliser les électrodes dans ce dernier. L'extrémité supérieure du montage est enfilée dans un piston creux en plexiglas ($\varnothing$ ext.: 8 mm) de 1 cm de haut

sur lequel une fente latérale permet de libérer les fils. Ce piston est rempli de ciment acrylique de sorte que l'extrémité des électrodes et de leur fourreau soit parfaitement maintenue et isolée. Ce piston est fermé par un bouchon



Fig. 1. Microdescendeur en place sur la tête de l'animal.

¹ M. SAWA et J.M. R. DELGADO, *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 15, 637 (1963).

² J. N. HAYWARD, M. D. FAIRCHILD, D. G. STUART et J. A. DEEMER, *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 16, 522 (1964).

³ R. DAVID et A. S. TOLLOW, *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 27, 196 (1966).

⁴ P. D. MACLEAN, *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 22, 180 (1967).

⁵ J. OOMURA, H. OYAMA, F. NAKA et T. YAMAMOTO, *Physiol. Behav.* 2, 89 (1967).

⁶ E. V. EVARTS, *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 24, 83 (1968).

⁷ J. THOMAS, P. GROVES et M. VERZEANO, *Experientia* 24, 360 (1968).

⁸ E. R. JOHN et P. P. MORGADES, *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 27, 205 (1969).

⁹ D. R. HUMPHREY, *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 29, 616 (1970).

¹⁰ D. H. HUBEL, *Science* 125, 549 (1957).