

177. Zur Identifikation potentieller Metabolite von Cannabis-Inhaltstoffen: Kernresonanz- und massenspektroskopische Untersuchungen an seitenkettenhydroxylierten Cannabinoiden

von Michael Binder¹⁾ und Stig Agurell²⁾

Institut für Pharmakognosie der Universität Uppsala,
Lindhagensgatan 128, S-112 51 Stockholm, Schweden

Kurt Leander

Institut für Organische Chemie der Universität Stockholm,
S-105 04 Stockholm 50, Schweden

und Jan-Erik Lindgren

Abteilung für Toxikologie, Karolinska Institut, S-104 01 Stockholm 60, Schweden

(20. V. 74)

Summary The 100-MHz-NMR-spectra of 11 side chain hydroxylated derivatives of cannabidiol (**1**), Δ^6 -tetrahydrocannabinol (**2**) and cannabinol (**3**) were analysed for signals specific for the position of hydroxyl groups. The mass spectra of these compounds and their trimethylsilyl ethers were investigated at ionisation voltages between 70 and 10 eV. The mass spectra of the non-silylated compounds showed no similarities independent on the basic type of cannabinoid but in the case of their trimethylsilyl ethers it was possible to derive fragmentations specific for the site of hydroxylation. These data are presented as a general method for the identification of small quantities of side chain hydroxylated *in vitro* and *in vivo* metabolites of cannabinoids.

1. Einleitung. – Die Aufklärung der Struktur von $(-)\text{-}\Delta^1\text{-}3,4\text{-trans}$ -Tetrahydrocannabinol¹⁾ (= Δ^1 -THC), dem wichtigsten psychoaktiven Prinzip von *Cannabis sativa* L. durch Mechoulam & Gaoni [1], sowie die stereospezifische Synthese dieser Verbindung [2–4] waren die Ausgangspunkte für Untersuchungen des Metabolismus dieses und weiterer, bereits bekannter Haschischinhaltsstoffe im tierischen und menschlichen Organismus. Diese Arbeiten führten 1970 unabhängig voneinander in zwei Laboratorien zur Isolierung und Strukturaufklärung von 7-OH- Δ^1 -THC, dem aus *in vitro* Versuchen mit Leberhomogenat gewonnenen Hauptmetaboliten von Δ^1 -THC [5] [6]. Inzwischen ist der Metabolismus von Δ^1 -THC, $(-)\text{-}\Delta^1(6)\text{-}3,4\text{-trans}$ -Tetrahydrocannabinol (= Δ^6 -THC) (**2**) [7], Cannabidiol (= CBD) (**1**) und Cannabinol (= CBN) (**3**) in einer Reihe von Organismen *in vitro* und *in vivo* untersucht und eine grosse Zahl von mono-, dihydroxylierten und sauren Metaboliten (die z. T. als Konjugate auftreten) beschrieben worden. Der metabolische Primärschritt ist im allgemeinen die Einführung einer Hydroxylgruppe, die bevorzugt in allylischen Positionen, aber auch unspezifisch in der aliphatischen Pentylseitenkette der Cannabinoide erfolgt. Seitenkettenhydroxylierte Metabolite treten allein oder in Kombination mit weiteren metabolisch eingeführten Funktionen im Isoprenanteil der Molekeln auf, fal-

¹⁾ Gegenwärtige Adresse: Institut für Physiologische Chemie II der Ruhr-Universität, D-463 Bochum-Querenburg, Postfach 2148.

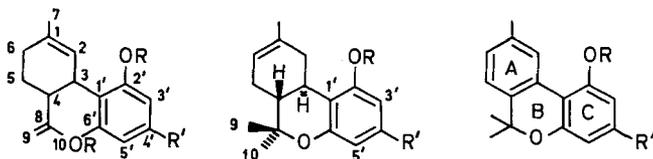
²⁾ Ebenfalls: Astra Läkemedel AB, S-15185 Södertälje, Schweden.

³⁾ Zur Nomenklatur vgl. [8]. Wir verwenden im folgenden die Monoterpenbezeichnung für Cannabinoide, wie in *Schema 1* dargestellt.

len aber sowohl bei *in vitro* als auch bei *in vivo* durchgeführten Experimenten durchweg in sehr geringen Mengen an. Dadurch, sowie durch das weitgehende Fehlen von Referenzsubstanzen wird die Strukturaufklärung solcher Metabolite erschwert.

Es erschien uns wünschenswert, über eine allgemeine Methode zu verfügen, die unabhängig vom jeweiligen Cannabinoid-Grundtypus und von eventuellen weiteren Substituenten im Isoprenoidteil der Molekeln eine Lokalisierung von Hydroxylgruppen in der Pentylseitenkette erlaubt. Wir haben deshalb versucht, aus den NMR.- und den Massenspektren einer Reihe von synthetischen Monohydroxy-Derivaten von Δ^6 -THC (2), CBD (1) und CBN (3) sowie den Massenspektren der Trimethylsilyläther dieser Verbindungen, die für die jeweilige Stellung der Hydroxylgruppe

Schema 1



R = H	R' =	1 CBD	2 Δ^6 -THC	3 CBN
R = H	R' =	4	5	
R = TMS	R' =	4 a	5 a	
R = H	R' =	6	7	8
R = TMS	R' =	6 a	7 a	8 a
R = H	R' =		9	10
R = TMS	R' =		9 a	10 a
R = H	R' =			11
R = TMS	R' =			11 a
R = H	R' =	12	13	14
R = TMS	R' =	12 a	13 a	14 a

typische Information herauszuarbeiten, um somit rückwirkend eine eindeutige Identifizierung kleinster Mengen an Metaboliten zu ermöglichen.

2. Untersuchte Verbindungen. – *Schema 1* gibt einen Überblick über die von uns untersuchten Verbindungen, ihre Trimethylsilyläther und die zugrunde liegenden Cannabinoide CBD (**1**), Δ^6 -THC (**2**) und CBN (**3**). Die Verbindungen **4** bis **10** und **12** bis **14** wurden totalsynthetisch dargestellt und standen in Mengen von einigen mg zur Verfügung. Über diese Synthesen werden wir später an anderer Stelle berichten [9]. Alle Verbindungen wurden mittels präparativer Dünnschichtchromatographie gereinigt und waren nach DC. und GC. einheitlich. **11** wurde als Metabolit von CBN (**3**) aus einem *in vitro* Versuch mit Kaninchenleberhomogenat isoliert [10] und enthielt nach GC. und DC. etwa 20% 5"-OH-CBN (**14**). Da von **11** nur 300 μ g zur Verfügung standen, wurde auf eine weitere Reinigung verzichtet.

3. NMR.-Spektren. – Die 100-MHz.-NMR.-Spektren der Verbindungen **4** bis **14** wurden in CDCl_3 unter Verwendung der *Fourier*-Puls-Technik aufgenommen⁴⁾. Die Daten dieser NMR.-Spektren sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Alle chemischen Verschiebungen sind auf Tetramethylsilan bezogen, aber vom Chloroform-Signal ($\delta = 7,26$ ppm) aus gemessen. Um einen direkten Vergleich der drei Verbindungsklassen zu ermöglichen, haben wir eine einheitliche Bezifferung der drei Grundgerüste verwendet (vgl. *Schema 1*), die von der üblichen darin abweicht, dass bei den Δ^6 -THC- und CBN-Derivaten die Bezifferung des Ringes C (Aromat) an der gleichen Stelle begonnen wird wie bei CBD (**1**) und nicht an der Stellung der Ätherbrücke. Die Aromatprotonen von Ring C liegen demnach immer an C(3') und C(5'). Bei CBD (**1**) entspricht C(9) der Methylengruppe, bei Δ^6 -THC (**2**) und CBN (**3**) der β -ständigen Methylgruppe an C(8). Unter den in δ -Werten angegebenen chemischen Verschiebungen der einzelnen Protonen finden sich der Signaltypus und Kopplungskonstanten in Hz. Die NMR.-Spektren der Cannabinoid-Grundtypen sind beschrieben worden [4] [11], weshalb wir nur auf die uns interessierenden, durch die Einführung der Hydroxylgruppen in die Seitenkette bedingten Änderungen eingehen wollen.

Bei den 1"-OH-Derivaten **4** und **5** von CBD (**1**) und Δ^6 -THC (**2**) ist das den Benzylprotonen an C(1'') entsprechende 2-Protonentriplett, das bei den unsubstituierten Grundkörpern bei $\delta = 2,4$ ppm auftritt, durch ein scharfes 1-Protontriplett bei $\delta = 4,5$ ppm ersetzt worden, welches bei Einstrahlung bei $\delta = 1,7$ ppm, dem ungefähren Ort der 2"-Protonen, kollabiert. Es soll noch darauf hingewiesen werden, dass das bei allen Δ^6 -THC-Derivaten bei $\delta = 3,3$ ppm auftretende doppelte Dublett ($J_{AB} = -16$ Hz, $J_{2\alpha,3} = 5$ Hz) dem 2α -Proton und nicht, wie früher irrtümlich zugeordnet, dem Proton an C(3) entspricht, welches bei $\delta = 2,6-2,8$ ppm als Multiplett erscheint [11].

Bei 2"-OH-CBD (**6**), 2"-OH- Δ^6 -THC (**7**) und 2"-OH-CBN (**8**) (vgl. Fig. 1) findet sich um $\delta = 3,8$ ppm ein Multiplett, das dem 2"-Proton zuzuordnen ist. Die 1"-Protonen aller drei Verbindungen bilden *AB*-Systeme ($J_{AB} = -15$ Hz), die durch unterschiedliche Kopplungen von 3 und 8, 3 und 9 bzw. 4 und 8 Hz zum 2"-Proton weiter aufgespalten sind. Die beiden Hälften dieser *AB*-Systeme sind bei $\delta = 2,5$ und $\delta =$

⁴⁾ Alle NMR.-Spektren verdanken wir Doz. *Torbjörn Drakenberg*, Institut für Technologie, Lund, Schweden

2,7 ppm zentriert, der gemeinsame Schwerpunkt liegt somit rund 0,2 ppm bei tieferem Feld als bei den unsubstituierten Grundkörpern. Einstrahlung auf das Signal des 2"-Protons führt zu einfachen *AB*-Systemen für die 1"-Protonen. Nur im Fall von **8** gelang es, durch Einstrahlen bei $\delta = 2,7$ ppm das Multiplett von H(2'') zu einem angenäherten Triplet zu vereinfachen.

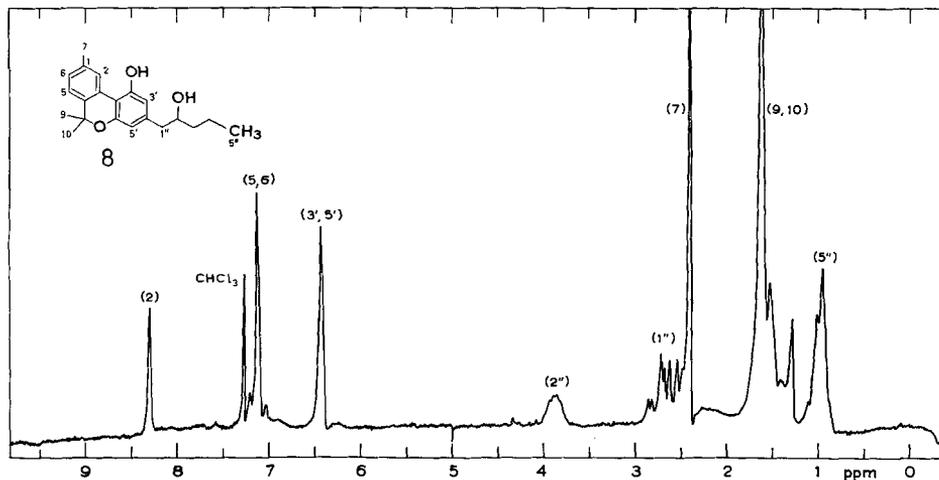


Fig. 1. 100-MHz.-NMR.-Spektrum von 2''-OH-CBN (**8**) in $CDCl_3$

Das Signal des 3"-Protons erscheint sowohl bei 3"-OH- Δ^6 -THC (**9**) als auch bei 3"-OH-CBN (**10**) (vgl. Fig. 2) als Pentett ($J_{2,3} = J_{3,4} = 6$ Hz) bei $\delta = 3,5$ ppm.

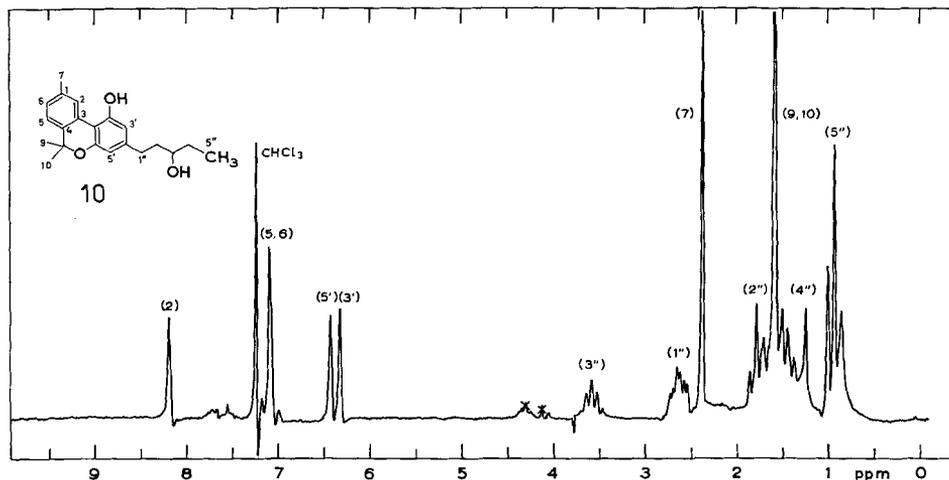


Fig. 2. 100-MHz.-NMR.-Spektrum von 3''-OH-CBN (**10**) in $CDCl_3$

Die Protonen an C(1'') bilden Multiplette, die noch immer leicht nach tieferem Feld verschoben sind ($\delta = 2,59$ bzw. $2,67$ ppm). Einstrahlung auf diese Signale führt

zu Vereinfachungen bei $\delta = 1,8$ ppm, dem Ort der 2"-Protonen, erzeugt aber erwartungsgemäss keine Änderung im Signal von H(3"). Bei **9** und **10** tritt das Signal der terminalen Methylgruppe (C(5")) erstmals als sauberes Triplett ($J = 7$ Hz) auf.

Im Spektrum des 4"-OH-CBN (**11**) erscheint das 4"-Proton bei $\delta = 3,7$ ppm als breites Multiplett. Charakteristisch ist hier das Signal der 5"-Protonen, deren üblicherweise bei $\delta = 0,95$ ppm zentriertes 3-Protonen-Triplett durch ein Dublett ($J = 6$ Hz) bei $\delta = 1,21$ ppm ersetzt worden ist. Die Protonen an C(1") bilden ein dem unsubstituierten Grundkörper entsprechendes Triplett bei $\delta = 2,56$ ppm. Einstrahlung auf H(4") führt zum Kollabieren des Dubletts der 5"-Protonen.

Bei den 5"-OH-Derivaten **12**, **13** und **14** ist das 3-Protonen-Triplett der terminalen Methylgruppe durch ein 2-Protonen-Triplett bei $\delta = 3,66$ ppm ersetzt worden (vgl. Fig. 3) Einstrahlen bei $\delta = 1,7$ ppm, dem Ort der 4"-Protonen vereinfacht das Signal

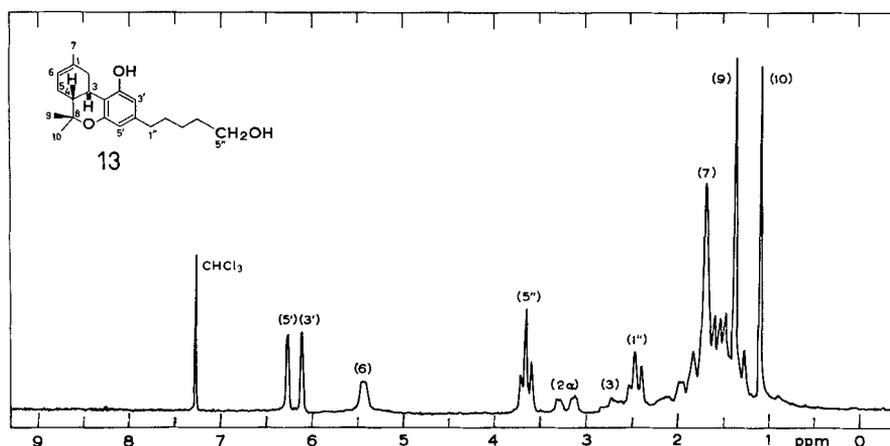


Fig. 3. 100-MHz.-NMR.-Spektrum von 5"-OH- Δ^6 -THC (**14**) in $CDCl_3$

der Protonen an C(5") zu einem Singulett. Gleichzeitig damit kollabiert auch das Triplett der 1"-Protonen bei $\delta = 2,5$ ppm, was darauf hinweist, dass auch die 2"-Protonen ungefähr bei $\delta = 1,7$ ppm lokalisiert sind.

Wichtig für uns ist, dass die Signale der Protonen an den hydroxylierten C-Atomen und die Signale ihrer Nachbarprotonen unabhängig vom Grundtypus des jeweiligen Cannabinoids das gleiche Aufspaltungsmuster mit nur geringen Änderungen der Kopplungskonstanten und ähnliche chemische Verschiebungen zeigen. Diese Resultate bedeuten, dass auch für hier nicht untersuchte Cannabinoide wie Δ^1 -THC, Cannabichromen, Cannabicyclol und Cannabigerol analoge Daten für seitenkettenhydroxylierte Derivate erwartet werden dürfen. Es sollte somit möglich sein auch bei Metaboliten, die wie **11** in geringer Menge vorliegen und deren NMR.-Spektren keine scharfen Signale aufweisen, durch gezielte Doppelresonanzversuche Hydroxylgruppen in der Seitenkette zu lokalisieren. Typisch ist hier das Beispiel des 4"-OH-CBN (**11**), das trotz verhältnismässig grosser Mengen an Verunreinigungen eindeutig identifiziert werden konnte. Zusätzliche Hydroxylierungen im Isopreneteil der Molekeln sollten zum Verschwinden charakteristischer Signale führen, wodurch z.B.

HO-Gruppen an C(7), (9), (10) leicht lokalisiert werden könnten. Ebenso sollten HO-Gruppen an C(3) und C(4) (bisher ist kein derartiges Beispiel bekannt) eindeutig erkennbar sein. Komplizierte Überlappungen könnten bei Hydroxyfunktionen an C(5) und C(6) entstehen. Hier sind Voraussagen ohne Vorliegen dihydroxylierter Vergleichsubstanzen kaum möglich.

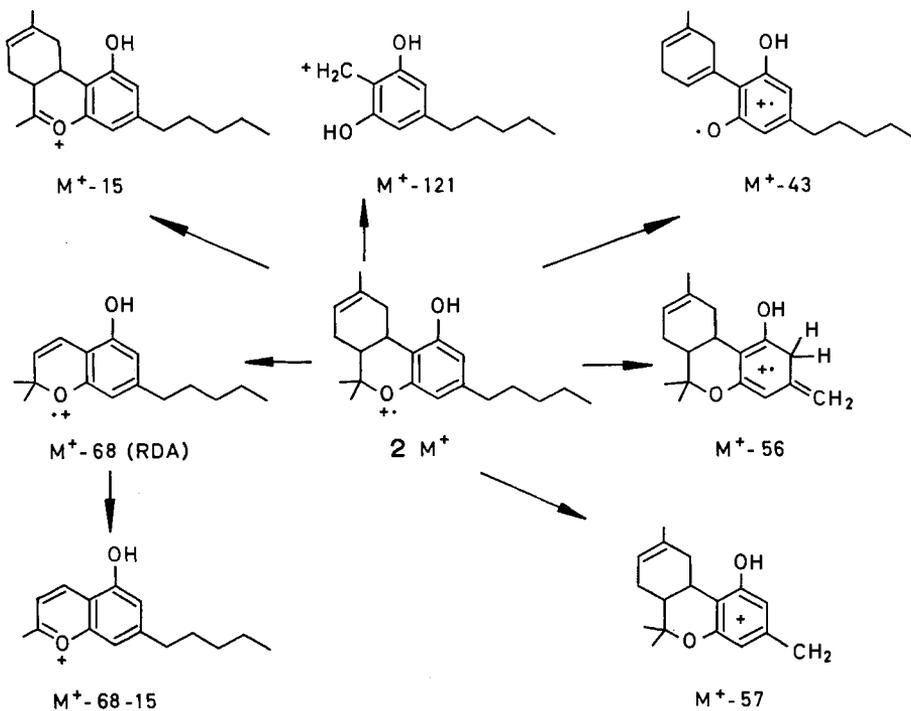
4. Massenspektren der nicht silylierten Verbindungen. -- Zur Aufnahme aller Massenspektren diente eine Kombination aus Gas-Chromatograph und Massenspektrometer, die einerseits ein einfaches Handhaben von μg -Mengen erlaubt und andererseits eine zusätzliche Reinigung der untersuchten Substanzen gewährleistet. Die Intensitäten der Fragment-Ionen liessen sich im allgemeinen gut reproduzieren. Die in den Tabellen 2 und 3 angegebenen relativen Intensitäten sind Mittelwerte aus mehreren Spektren, die jeweils im ansteigenden Teil der gas-chromatographischen Pike aufgenommen wurden. Wir versuchten zunächst Fragmentierungen zu finden, die für die Stellung der Seitenkettenhydroxylgruppe typisch waren. Dann untersuchten wir nach der Methode von *Vree* [12] [13] charakteristische Zerfallsreaktionen der einzelnen Cannabinoid-Grundtypen in Abhängigkeit von der verwendeten Ionisierungsenergie. Diese Methode besteht darin, Massenspektren der betreffenden Verbindung bei Ionisierungsenergien zwischen 20 und 10 eV im Abstand von 2 eV aufzunehmen. Die relativen Intensitäten typischer Fragmente, normiert auf das jeweilige Basissignal, werden dann gegen die Ionisierungsenergie aufgetragen. Dabei ergeben sich Massenintensitäts-Diagramme, die sehr charakteristisch sind. Die Methode wurde zur Identifizierung der C_3 - und C_1 -Seitenketten-Analoga von Δ^1 -THC, CBD und CBN verwendet. Die von uns so erhaltenen Diagramme erlauben eine Unterscheidung der Verbindungen innerhalb der senkrechten Kolonnen von *Schema 1*, lassen sich jedoch nicht auf die anderen Cannabinoid-Grundtypen übertragen, lieferten also keine Beziehung für die waagrechten Kolonnen von *Schema 1*. Auf eine Darstellung dieser Diagramme wird deshalb verzichtet.

Die Massenspektren der Cannabinoid-Grundtypen sind beschrieben worden [14] [15], aber es soll dennoch kurz auf die wesentlichsten Zerfallsreaktionen eingegangen werden, bevor wir uns der Diskussion der Massenspektren der Hydroxylderivate zuwenden.

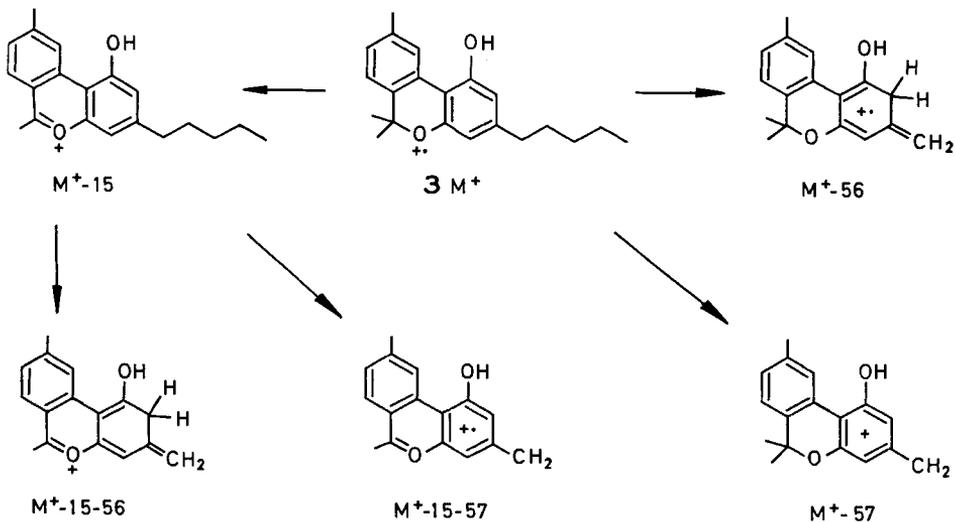
CBD (**1**), Δ^6 -THC (**2**) und Δ^1 -THC zeigen qualitativ sehr ähnliche Massenspektren, die hauptsächlich durch Fragmentierungen im Isopreneil der Molekeln bestimmt sind. Die wichtigsten Fragmente dieser Verbindungen sind am Beispiel von Δ^6 -THC (**2**) in *Schema 2* zusammengefasst. Typische Fragmente sind $M^+ - 43$, Verlust der gesamten Isopreneinheit mit Ausnahme von C(3) ($M^+ - 121$), die *Retro-Diels-Alder*-Reaktion (RDA) ($M^+ - 68$), Aromatisierung dieses Fragments unter Verlust einer Methylgruppe ($M^+ - 68 - 15$) und direkter Verlust von CH_3 aus dem Molekelion ($M^+ - 15$). Zwei Fragmentierungen in der Seitenkette sind bekannt: Verlust des Butylradikals $\cdot\text{C}_4\text{H}_9$ und Verlust von Buten, der durch die Übertragung eines H-Atoms von C(3') auf den Aromatring zustande kommt (*McLafferty*-Umlagerung). Die entstehenden Fragmente sind $M^+ - 57$ und $M^+ - 56$. Wir kennzeichnen im folgenden die Fragment-Ionen nur durch ihre Massendifferenz zum Molekel-Ion, nicht durch ihre absoluten Massen, da es uns auf die Gemeinsamkeiten der betrachteten Zerfallsreaktionen ankommt.

Die Zerfallsreaktionen von CBN (3), dargestellt in *Schema 3*, beschränken sich auf Aromatisierung des Molekel-Ions (Bildung von $M^+ - 15$) und die erwähnten Fragmentierungen der Seitenkette.

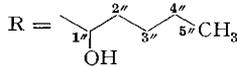
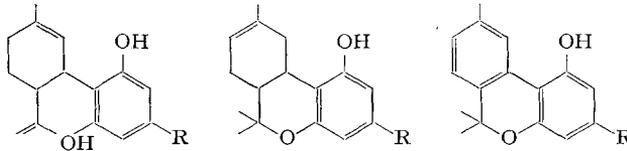
Schema 2



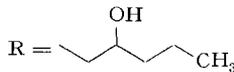
Schema 3



Der dirigierende Einfluss der Hydroxylgruppe auf Fragmentierungen ist gering. Zu erwarten wären α -Spaltungen, die zu spezifischen Fragmenten führen könnten. Im Fall der 1''-Hydroxyl-Derivate wäre ein intensives $M^+ - 57$ Fragment zu erwarten, bei 2''-Hydroxyl-Derivaten (sowie bei allen weiteren Verbindungen) die Fragmente $M^+ - 72$ und $M^+ - 73$, die einem Verlust der Seitenkette inklusive Hydroxylgruppe entsprechen. Zusätzlich durch α -Spaltung zwischen C(2'') und C(3'') das Fragment $M^+ - 43$, das jedoch mit dem bekannten $M^+ - 43$ Fragment (vgl. *Schema 2*) isobar ist. Unwahrscheinlich ist in allen Fällen eine Ladungsretention auf dem Seitenkettenfragment. Die 3''-OH-Derivate sollten Fragmente $M^+ - 29$ und $M^+ - 59$, die 4''-OH-Derivate $M^+ - 15$ und $M^+ - 45$, resultierend aus den jeweiligen α -Spaltungen liefern. Eine Voraussage für die 5''-Hydroxyl-Derivate zu machen, ist kaum möglich.

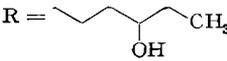
Tabelle 2. *Massenspektren der in der Seitenkette hydroxylierten Cannabinoide^{a)}*

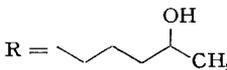
M^+	4	25	5	100
- 15		2		8
- 18		19		35
- 43		-		20
- 56		-		85
- 57		-		55
- 68		40		12
- 68 - 15		100		86
- 121		-		20
- 121 - 18		60		13
- 68 - 56		19		-



M^+	6	20	7	83	8	21
- 15		4		4		100
- 18		1		2,5		-
- 43		4		17		-
- 72		-		100		3
- 73		-		-		2
- 68		28		9		-
- 68 - 15		100		59		-
- 15 - 72		-		-		10
- 15 - 73		-		-		9
- 68 - 72		-		19		-
- 68 - 72 - 15		43		18		-

Tabelle 2. (Fortsetzung)

R = 				
<i>M</i> ⁺	9	18	10	16
– 15		1		100
– 29		2		–
– 72		100		10
– 68–15		13		–
– 68–72		7		–
– 72–15		–		2

R = 				
<i>M</i> ⁺			11	9 ^{b)}
– 15				100
– 72				2
– 73				3
– 73–15				11

R = 				
<i>M</i> ⁺	12	12	13	80
– 15		3		7
– 68		28		21
– 68–15		100		100
– 68–15–72		6		4
– 68–15–73		6		–
– 72		–		48
– 15–72		–		–
– 15–73		–		–
				2
				9

a) Alle Werte sind in Prozent rel. Intensität angegeben.

b) Dieses Spektrum wurde bei 70 eV Ionisierungsenergie aufgenommen.

Die Resultate der Massenspektren der Verbindungen **4** bis **14** sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

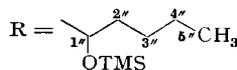
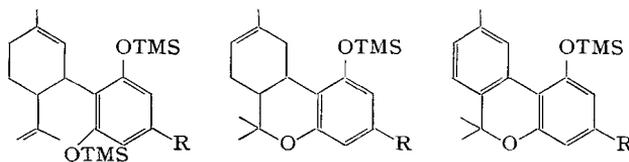
Um einen direkten Vergleich dieser Resultate mit denen der Trimethylsilyläther (vgl. Tab. 3) zu erlauben, sind die relativen Intensitäten der Fragment-Ionen bei 20 eV Ionisierungsenergie angegeben. In der Darstellung sind nur die wichtigsten (bzw. charakteristischen) Fragmente berücksichtigt.

Die Tabelle zeigt, dass einige der erwarteten charakteristischen Ionen zwar auftreten, allein oder in Kombination mit einer oder mehreren bevorzugten Fragmentierungen des betreffenden Cannabinoid-Grundtypus, aber keine typischen Gemeinsamkeiten vorhanden sind, die für die Stellung der Hydroxylgruppen spezifisch wären. Die Massenspektren innerhalb einer senkrechten Kolonne von *Schema 1* unterscheiden sich hinreichend um die einzelnen Derivate zu charakterisieren, aber die Unterschiede lassen sich auf keinen anderen Grundtypus übertragen und machen somit Voraussagen unmöglich. Das beruht vor allem darauf, dass die typischen Ionen in sehr geringer Intensität auftreten und bei Ionisierungsenergien unter 20 eV gänz-

lich verschwinden. Auch die allgemein auftretende Abspaltung von Wasser in der Seitenkette zeigte keine Beziehung zur Stellung der Hydroxylgruppe. Auf die Massenspektren der einzelnen Derivate wird bei der Diskussion der Spektren ihrer Trimethylsilyläther näher eingegangen.

5. Massenspektren der silylierten Verbindungen. – Allgemein dienen die Trimethylsilyl-Derivate von Alkoholen, Aminen und Carbonsäuren dazu, schwer flüchtige Verbindungen in eine gas-chromatographierbare Form zu überführen oder ihre Flüchtigkeit soweit heraufzusetzen, dass diese Substanzen der Massenspektroskopie unterworfen werden können. Der Einfluss der Trimethylsiloxygruppe auf massenspektrometrische Zerfallsreaktionen ist mehrfach untersucht worden [16] und Resultate von *Wall et al.* [17] wiesen darauf hin, dass bei hydroxylierten Cannabinoiden eventuell spezifische Fragmente erwartet werden dürfen. Im Fall der von uns untersuchten Verbindungen begünstigt die Trimethylsiloxygruppe das Auftreten von Fragmentierungen in der Seitenkette, wobei die betreffenden Fragment-Ionen die Intensität der sonst bevorzugten Zerfälle wie RDA oder Methylabspaltung bei CBN (**3**) erreicht. In den 70 eV Spektren der Verbindungen **4a** bis **14a** dominieren unspezifische Ionen vom Typ $\text{Si}(\text{CH}_3)_3^+$ (m/e 73), $\text{HO}=\text{Si}(\text{CH}_3)_3^+$ (75), $\text{CH}_2=\text{OSi}(\text{CH}_3)_2^+$ (103) und $(\text{CH}_3)_2\text{Si}=\text{OSi}(\text{CH}_3)_2^+$ (147), die für Mono- und Poly-trimethylsilyläther typisch sind [16], mit der Stellung der Trimethylsiloxygruppe jedoch nichts zu tun haben. Bei 20 eV Ionisierungsenergie herrschen charakteristische Fragmente vor, während das Ion m/e 73, das bei 70 eV fast immer das Basissignal stellt, bedeutungslos geworden ist. Bei Ionisierungsenergien unter 20 eV ergaben sich keine wesentlichen Änderungen der relativen Intensität der bei 20 eV beobachteten Fragmente mit Ausnahme eines allgemeinen Anstiegs der Intensität des Molekel-Ions. Die Resultate der bei 20 eV aufgenommenen Massenspektren der Verbindungen **4a** bis **14a** sind in Tabelle 3 zusammengefasst, wobei wiederum nur die wichtigsten Fragmente herausgegriffen wurden.

Tabelle 3. *Massenspektren der Trimethylsilyläther der in der Seitenkette hydroxylierten Cannabinoide^{a)}*



M^+	4a		5a	
– 15		10		22
– 57		6		3
– 68 – 57		14		100
– 68 – 57 – 15		100		–
– 121		–		2
		49		–

Tabelle 3. (Fortsetzung)

R = CCCC(C)C(OTMS)C

<i>M</i> ⁺	6a		7a		8a	
		3		7		5,5
– 15		2		2		12
– 43		0,5		0,5		–
– 68		12		–		–
– 121		7		–		–
– 144		–		6		2
– 15–144		–		–		2,5
– 68–144		2		–		–
145 ⁺		100		100		100

R = CCCC(C)C(OTMS)C

<i>M</i> ⁺			9a		10a	
				4		21
– 15				2,5		100
– 29				0,5		–
– 15–68				1,7		–
– 144				100		94
– 144–15				1		7,5

R = CCCC(C)C(OTMS)C

<i>M</i> ⁺			11a	
				17
– 15				100
– 144				9
– 15–145				2
117 ⁺				6

R = CCCCCC(OTMS)C

<i>M</i> ⁺	12a		13a		14a	
		12		100		17
– 15		5,5		10		100
– 43		–		7		–
– 68		100		12		–
– 15–68		3		71		–
– 121		35		15		–
– 144		–		77		–
– 15–145		–		–		3
– 68–145		2		–		–

a) Alle Werte sind in Prozent rel. Intensität angegeben.

Der für die TMS (= Trimethylsilyl)-Äther der 1"-OH-Derivate typische Zerfall ist der Verlust eines Butylradikals, der bei **4a** in Kombination mit RDA zum Basissignal $M^+ - 57 - 68$, bei **5a** direkt zum Basissignal $M^+ - 57$ führt. Ein Verlust von 56 Masseneinheiten tritt nicht auf, die Abspaltung der Seitenkette erfolgt also ausschliesslich ohne Umlagerung. Bei den nicht silylierten Verbindungen **4** und **5** waren die Basissignale $M^+ - 15 - 68$ bzw. M^+ ; ein Seitenkettenfragment trat bei **4** nur in Kombination mit RDA und Umlagerung ($M^+ - 68 - 56$, rel. Intensität 19%) auf. Bei **5** erreichten die Fragmente $M^+ - 57$ und $M^+ - 56$ rel. Intensitäten von 55 bzw. 85%.

Bei den Verbindungen **6a**, **7a** und **8a** beherrscht das Fragment $(\text{CH}_3)_3\text{SiO}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3^+$ (m/e 145) bei allen Ionisierungsenergien die Massenspektren. 145 entsteht durch α -Spaltung zwischen C(1") und C(2") unter Retention der Ladung auf dem Si-haltigen Fragment. Das komplementäre Fragment $M^+ - 145$ tritt nicht auf, dafür aber in geringer Intensität das Ion $M^+ - 144$, bei **6a** kombiniert mit RDA, bei **8a** allein und in Kombination mit $M^+ - 15$. Das bei **6a** und **7a** mit je 0,5% rel. Intensität auftretende Ion $M^+ - 43$ dürfte, da es bei **8a** völlig fehlt, auf die bekannte Reaktion im Isoprenteil, nicht aber auf α -Spaltung zwischen C(2") und C(3") zurückzuführen sein. Es soll darauf hingewiesen werden, dass das Ion $M^+ - 15$ sowohl durch die beschriebenen Reaktionen als auch durch Verlust von $\cdot\text{CH}_3$ aus einer TMS-Gruppe erklärt werden kann. Bei den CBN-Derivaten dominiert die Aromatisierung von Ring B durch Verlust einer Methylgruppe an C(8), bei den CBD- und Δ^6 -THC-Derivaten kann keine Aussage über den Grad der Beteiligung der beiden Reaktionen gemacht werden. Ein Vergleich mit Tabelle 2 zeigt, dass bei **6**, **7** und **8** die Basissignale den Fragmenten $M^+ - 68 - 15$, $M^+ - 72$ (entspricht dem $M^+ - 144$ der TMS-Äther) bzw. $M^+ - 15$ entsprechen. Mit Ausnahme von **7** sind die Spitzen $M^+ - 72$ bzw. $M^+ - 73$ auch in Kombination mit anderen Zerfallsreaktionen wenig charakteristisch.

Das bereits erwähnte Fragment $M^+ - 144$ spielt bei den 3"-OH- Δ^6 -THC- und 3"-OH-CBN-TMS-Äthern **9a** und **10a** eine wichtige Rolle. Die Fragmentierung der Seitenkette erfolgt hier ausschliesslich unter Umlagerung und Retention der Ladung auf dem grösseren Fragment. Ionen bei m/e 144 oder 145 treten nicht auf. Bei **9a** ist $M^+ - 144$ Basissignal, bei **10a** erreicht das Fragment eine rel. Intensität von 94%. 3"-OH- Δ^6 -THC (**9**) hat zwar das entsprechende Fragment $M^+ - 72$ als Basissignal, bei 3"-OH-CBN (**10**) dagegen ist dieses Fragment schwach. Nur eines der vier möglichen, aus α -Spaltungen zwischen C(2") und C(3") oder C(3") und C(4") resultierenden Fragmente der TMS-Äther ($M^+ - 29$ bzw. m/e 29 und $M^+ - 131$ bzw. m/e 131), das Ion $M^+ - 29$, tritt bei **9a** mit sehr geringer Intensität auf.

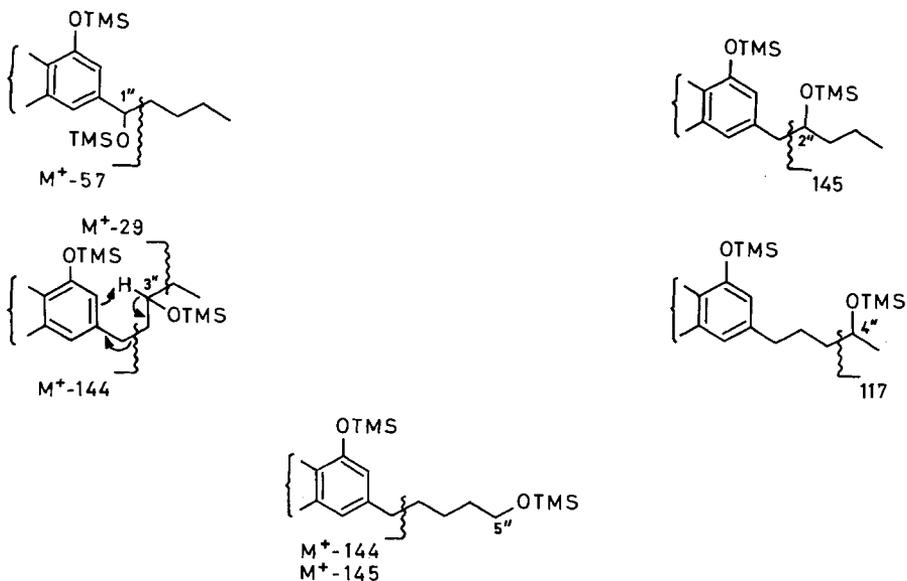
Das Spektrum des 4"-OH-CBN-TMS-Äthers **11a** zeigt ein typisches Signal bei m/e 117, das aus der α -Spaltung zwischen C(3") und C(4") hervorgeht und beim TMS-Äther von Pentan-2-ol beschrieben worden ist [16]. Dieses Fragment, das hier nur mit 6% rel. Intensität auftritt, dürfte bei den anderen Cannabinoiden, deren Massenspektren nicht von der Aromatisierung durch Verlust der Methylgruppe an C(8) beherrscht werden, mit höherer Intensität vorkommen. Das Spektrum von 4"-OH-CBN (**11**) zeigt kein spezifisches Fragment.

Bei den TMS-Äthern der 5"-OH-Derivate **12a**, **13a** und **14a** liessen sich erwartungsgemäss keine typischen Fragmente finden. Auf das Vorhandensein einer Hydroxyl- (bzw. Trimethylsiloxy-)Gruppe in der Seitenkette kann aus den Fragmenten

$M^+ - 68 - 145$, $M^+ - 144$ und $M^+ - 15 - 145$, auf die Stellung der funktionellen Gruppe jedoch nur indirekt geschlossen werden, da die für die 1'', 2'', 3'' und 4''-OH-Derivate (bzw. deren TMS-Äther) typischen Fragmente fehlen. Die relativen Intensitäten dieser Fragmente mit Ausnahme von **13a** sind sehr schwach. Im ganzen ähneln die Massenspektren von **12a**, **13a** und **14a** denen der nicht silylierten Grundkörper **12**, **13** und **14**.

Schema 4 fasst die typischen Fragmentierungen der TMS-Äther der drei Klassen zusammen. Die Kombination mit anderen Zerfällen ist hierbei nicht berücksichtigt.

Schema 4



Danach ist für die TMS-Äther der 1''-OH-Derivate das Ion $M^+ - 57$, der 2''-OH-Derivate das Ion m/e 145, der 3''-OH-Derivate das Ion $M^+ - 144$ und für die 4''-OH-Derivate das Ion m/e 117 charakteristisch. Auf die negative Beweisführung für die TMS-Äther der 5''-OH-Derivate ist bereits eingegangen worden.

6. Schlussbemerkung. – Aufgrund der somit erarbeiteten Daten scheint es uns möglich, mittels der NMR.-Spektren von in der Seitenkette hydroxylierten Metaboliten von Cannabis-Inhaltstoffen und der Massenspektren ihrer TMS-Äther eindeutige Zuordnungen betreffs der Stellung von Hydroxylgruppen vornehmen zu können. Wir halten es für wahrscheinlich, dass sich die Resultate der NMR.-Spektren und der Massenspektren auf Metabolite übertragen lassen, die zusätzliche Funktionen wie Hydroxyl-, Carbonyl- oder Carboxyl-Gruppen im Isopreneteil der Molekeln enthalten. Im Gegensatz zur NMR.-Spektroskopie, die verhältnismässig hohe Reinheiten der betreffenden Substanz verlangt, kann die massenspektroskopische Methode auch auf Gemische angewandt werden, da im allgemeinen eine gute Trennung der TMS-Äther auf gas-chromatographischem Weg möglich ist und μg -Mengen für die Aufnahme der Spektren genügen. Wir halten auch eine Identifikation von Meta-

boliten im ng-Bereich mittels Massenfragmentographie noch für möglich, was allerdings gewisse Kenntnisse über den Metaboliten wie Molekulargewicht und Grundtypus voraussetzt, womit ein Fokussieren auf die zu erwartenden spezifischen Ionen möglich wird. Eine Fortsetzung dieser Arbeiten wäre in einer systematischen Studie der Massenspektren der TMS-Äther von Cannabinoiden, die im Isoprenteil der Molekel Hydroxylgruppen tragen, zu sehen.

Wir danken dem «Swedish Medical Research Council» für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

1. *Allgemeines.* Für die Dünnschichtchromatographie verwendeten wir Fertigplatten (Kieselgel G), E. Merck A.G., Darmstadt. Die gleichen Platten dienten (z.T. nach Vorreinigung durch 3maliges Eluieren mit C_6H_6 /Methanol 1:1) zur präparativen Reinigung der Substanzen. Zur Sichtbarmachung dienten UV.-Licht oder Echtblau-Salz-Reagens. Alle Reinheitskontrollen wurden auf einem Gas-Chromatograph Typ Varian 2100 (FID.-Detektor) mit einer Säule (2 m × 3 mm) von 3% SE-30 an Gas-Chrom Q zwischen 180° und 240° ausgeführt. Die 100-MHz.-NMR.-Spektren wurden auf einem Varian XL-100 (mit F.T.)-Gerät aufgenommen. Zur Aufnahme aller Massenspektren diente ein Gas-Chromatograph/Massenspektrometer-Gerät vom Typ LKB 9000, wobei die gas-chromatographischen Trennungen wie oben erfolgten.

2. *Reinigung der Substanzen.* Die Verbindungen **4** bis **10** und **12** bis **14** wurden auf DC.-Platten 20 × 20 × 0,025 cm gereinigt (pro Platte maximal 10 mg). Als Eluens dienten Äther/Petroläther 4:1; 3 × $CHCl_3$ /Äthanol 98:2; $CHCl_3$ /Äthanol/Aceton 88:2:10; $CHCl_3$ /Äthanol/Methanol 96:2:2; C_6H_6 /Methanol 3:1 bzw. $CHCl_3$ /Methanol 96:4. Extraktion der Hauptzonen mit CH_2Cl_2 /Methanol 9:1 lieferte nach DC. und GC. einheitliche Substanzen, die in äthanolischer Lösung unter Lichtausschluss bei –20° aufbewahrt wurden.

3. *Darstellung der Trimethylsilyläther 4a bis 14a.* Je 250 µg der Verbindungen **4** bis **10** und **12** bis **14** und 50 µg **11** wurden mit 50 µl Bis-N,O-trimethylsilyl-trifluoracetamid versetzt, im geschlossenen Gefäß während 5 Min. auf 50° erwärmt, mit abs. CH_3CN auf eine Konzentration von 2,5 µg/µl (bzw. bei **11a** 0,5 µg/µl) verdünnt (bezogen auf Edukt). Unter diesen Bedingungen verliefen alle Silylierungen quantitativ.

Die Lösungen der TMS-Äther, die unter Feuchtigkeitsausschluss mehrere Tage lang stabil blieben, wurden direkt für die massenspektroskopischen Untersuchungen verwendet.

4. *Analytische Daten.* Die Daten der 100 MHz.-NMR.-Spektren von **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11**, **12**, **13** und **14** sind in Tab. 1 zusammengefasst. Die Massenspektren von **4** bis **14** bei 20 eV Ionisierungsenergie und die Massenspektren ihrer Trimethylsilyläther (**4a** bis **14a**) finden sich in den Tab. 2 und 3.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Y. Gaoni & R. Mechoulam, J. Amer. chem. Soc. 86, 1646 (1964).
- [2] R. Mechoulam & Y. Gaoni, J. Amer. chem. Soc. 87, 3273 (1965).
- [3] T. Petržilka, W. Haefliger, C. Sikemeier, G. Ohloff & A. Eschenmoser, Helv. 50, 719, 1716, 2111 (1967).
- [4] T. Petržilka, W. Haefliger & C. Sikemeier, Helv. 52, 1102 (1969).
- [5] I. M. Nilsson, S. Agurell, J. L. G. Nilsson, A. Ohlsson, F. Sandberg & M. Wahlqvist, Science 168, 1228 (1970).
- [6] M. E. Wall, D. R. Brine, G. A. Brine, C. G. Pitt, R. I. Freudenthal & H. D. Christensen, J. Amer. chem. Soc. 92, 3466 (1970).
- [7] S. Burstein, F. Menezes, E. Williamson & R. Mechoulam, Nature 225, 87 (1970).
- [8] R. Mechoulam & Y. Gaoni, Fortschr. chem. Org. Naturst. 25, 175 (1967).
- [9] K. Leander, S. Agurell, K. Pettersson & M. Binder, unveröffentlichte Versuche.
- [10] M. Widman & S. Agurell, unveröffentlichte Versuche.
- [11] R. A. Archer, D. B. Boyd, P. V. Demarco, I. J. Tyminski & N. L. Allinger, J. Amer. chem. Soc. 92, 5200 (1970).

- [12] *T. B. Vree, D. D. Breimer, C. A. M. van Ginneken, J. M. van Rossum, R. A. de Zeeuw & A. H. Witte*, *Clin. chim. Acta* **34**, 365 (1971).
- [13] *T. B. Vree, D. D. Breimer, C. A. M. van Ginneken & J. M. van Rossum*, *J. Pharm. Pharmacol.* **24**, 7 (1972).
- [14] *U. Claussen, H.-W. Fehlhaber & F. Korte*, *Tetrahedron* **22**, 3535 (1966).
- [15] *H. Budzikiewicz, R. T. Alpin, D. A. Lightner, C. Djerassi, R. Mechoulam & Y. Gaoni*, *Tetrahedron* **21**, 1881 (1965).
- [16] *J. Diekman, J. B. Thomson & C. Djerassi*, *J. org. Chemistry* **32**, 3904 (1967); *J. org. Chemistry* **33**, 2271 (1968).
- [17] *M. E. Wall*, *Annalen N.Y.A. Sciences*, (1974) im Druck.

178. Carotinoid-Glycoside

1. Mitteilung

Partialsynthese und Charakterisierung von Zeaxanthin Mono- und Diglucosid

von Hanspeter Pfander und Martin Hodler¹⁾

Institut für organische Chemie der Universität Bern, Länggass-Strasse 7, 3012 Bern

(20. VI. 74)

Zusammenfassung. Peracetyliertes Zeaxanthin Mono- und Diglucosid sowie die entsprechenden freien Glucoside wurden partialsynthetisiert und mit Hilfe von UV./VIS.-, IR.-, Massen- und NMR.-Spektren identifiziert. Mit den kristallinen freien Glucosiden wurden anschliessend Beständigkeitsversuche durchgeführt.

Die Partialsynthese erfolgte aus α -Acetobromglucose und Zeaxanthin (3,3'-Dihydroxy- β , β -carotin) nach der Methode von *Koenigs & Knorr*. Die freien Glucoside wurden durch Verseifen der peracetylierten Verbindungen in methanolischem Kaliumhydroxid erhalten.

Die kristallinen freien Glucoside liessen sich in Mengen von ungefähr 100 ppm (Monoglucosid) und 800 ppm (Diglucosid) in Wasser lösen. Die wässrigen Lösungen erwiesen sich als sehr beständig gegen Lichteinwirkung und Kontakt mit Luftsauerstoff. Das Diglucosid erwies sich sowohl gegenüber der sauren (pH 3) als auch gegenüber der basischen (pH 9) Hydrolyse als beständig.

1. Einleitung. – Das Crocin, der Di-gentiobiose-ester der C₂₀-Dicarbonsäure Crocetin, war lange das einzig bekannte Carotinoid-glycosid [1] [2].

In letzter Zeit wurden aus Algen [3] [4] und Bakterien [5]–[7] eine ganze Reihe von weiteren Carotinoidglycosiden isoliert.

Versuche zur Partialsynthese solcher Verbindungen sind bis heute, abgesehen von einer Ausnahme, nicht durchgeführt worden. Einzig *Jensen et al.* [5] haben mit der Methode nach *Koenigs & Knorr* [8] aus 1'-Hydroxy-2'-oxo-1',2'-dihydrotorulin und Acetobromglucose mit einer Ausbeute von 5% 2'-Oxo-phleixanthophyll-tetraacetat synthetisiert, wobei das Produkt jedoch nicht kristallin isoliert werden konnte.

Im Hinblick auf Vergleichsmöglichkeiten bei der Untersuchung natürlich vorkommender Carotinoidglycoside einerseits und zum Studium der Eigenschaften solcher Verbindungen andererseits, sind solche Partialsynthesen von grossem Interesse.

¹⁾ 2. Teil der Dissertation von *M. Hodler*, Universität Bern, 1973.