

CHROM. 10,811

## NEUE CANNABINOIDE. II\*

HEINFRIED GROTE und GERHARD SPITELLER\*\*

*Lehrstuhl Organische Chemie der Universität Bayreuth, Am Birkengut, Postfach 3008, 8580 Bayreuth (B.R.D.)*

(Eingegangen am 28. November 1977)

---

### SUMMARY

#### *New cannabinoids. II*

Water-soluble cannabinoids —especially cannabinoid acids— were isolated from cannabis extracts by adsorption on XAD resins. In these extracts the previously unknown cannabinoids C<sub>3</sub>-cannabichromanone, C<sub>3</sub>-cannabielsoin and C<sub>3</sub>-cannabielsoic acid B were detected by gas chromatography–mass spectrometry. The main compound, an acid of so far unknown structure, has the same skeleton as the compound of mass 328 that has been isolated some time ago. The extract contained also its C<sub>3</sub>-homologue and the C<sub>3</sub>-homologous acid.

---

### EINLEITUNG

Gut wasserlösliche Verbindungen, insbesondere Glykoside, können aus wässrigen Extrakten durch Adsorption an XAD-Harzen<sup>1</sup> gewonnen werden. Wir haben diese Methode zur Isolierung bisher unbekannter Cannabinoide angewandt und anschließend das Verbindungsgemisch —gegebenenfalls nach vorhergehender Derivatisierung— mit der Kombination Glaskapillargaschromatograph–Massenspektrometer untersucht, ähnlich wie wir dies in einer vorangegangenen Arbeit beschrieben haben<sup>2,3</sup>.

### EXPERIMENTELLER TEIL

Eine Haschischprobe unbekannter Herkunft (107 g; grüner Afghan) wurde in einem Mixer zerkleinert und mit Methylenchlorid–Ethanol (1:1) zweimal mazeriert. Der nach dem Abdestillieren der vereinigten Lösungsmittel im Vakuum erhaltene Rückstand (31 g) wurde zwischen Essigester und Wasser verteilt. Die zur weitgehenden Entfernung von Neutralcannabinoiden noch zweimal mit Essigester ausgeschüttelte wässrige Phase wurde nach dem Durchleiten von Stickstoff (zur Entfernung von Essigesterresten) über eine XAD-4 Säule (500 g) gegeben. Das trockengelaufrne Säu-

\* Teil I, siehe Lit. 2.

\*\* An den Korrespondenz zu richten ist.

lenmaterial wurde anschliessend 48 h in einer Soxhlet-Apparatur mit Methanol extrahiert. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum ergaben sich 398 mg ( $3.7 \cdot 10^{-1}\%$ ) an amorphem Rückstand.

Nach dem AufschlÄmmen in Acetatpuffer (pH 4.7) und der Behandlung im Ultraschallbad konnte die Probe weitgehend gelöst werden. Eine darauffolgende Extraktion mit Essigester überführte 47% der Substanzmenge in die organische Phase, woraus sie durch Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum wiedergewonnen werden konnte.

Aus dem erhaltenen Stoffgemisch wurden nach Literaturangaben durch Umsetzung mit etherischer Diazomethanlösung Methylester<sup>4</sup>, durch Reaktion mit Methylborsäure Methylborsäureester<sup>5,6</sup> und mit N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid (MSTFA)-Pyridin Trimethylsilyl-(TMS-)Derivate<sup>7</sup> dargestellt.

Gaschromatogramme und Retentionsindices wurden an mit FID ausgestatteten Carlo Erba 2300-Gaschromatographen gemessen. Die Glaskapillarsäulen (25 m  $\times$  0.3 mm I.D.) waren mit SE-30 nach der statistischen Methode belegt. Die Injektortemperatur betrug 275°. Zur Aufnahme der abgebildeten Gaschromatogramme wurde die Ofentemperatur 3 min bei 170° (Fig. 1) bzw. 200° (Fig. 4) gehalten und dann bis 290° mit 2°/min programmiert. Als Trägergas diente Helium. Die Bestimmung der Retentionsindices erfolgte bei einem Temperaturprogramm ab 180° (3 min isotherm) mit 1°/min, als Trägergas diente Wasserstoff (0.6 kg/cm<sup>2</sup>).

Zur Feststellung der Retentionsindices wurden die Proben zusammen mit den geradzahligem *n*-Kohlenwasserstoffen von C<sub>16</sub>H<sub>34</sub> bis C<sub>32</sub>H<sub>66</sub> injiziert<sup>8</sup>. Die Berechnung der Indices erfolgte auf Grund der von einem Integrator (Spectra-Physics, Autolab System I) ausgedruckten Verweilzeiten der Kohlenwasserstoffe und der Cannabinoide ( $\Delta t_R \pm 0.02$ ).

Massenspektren wurden mit einer LKB 2091 Gaschromatograph-Massenspektrometer-Kombination (Glaskapillarsäulennendurchmesser 0.3 mm; SE-30 Dünnfilm) gekoppelt mit einem LKB 2130-Datensystem (mit PDP-11-Rechner) aufgenommen. Die Ionisierungsenergie betrug 70 eV, der Totalionenstrom wurde bei 20 eV registriert. Der Heliumfluss in der 25-m Glaskapillarsäule betrug 2 ml/min und die Injektortemperatur 275°. Programmiert wurde mit 2°/min.

Zum Nachweis metastabiler Ionen wurden Massenspektren an einer Varian MAT CH-7 Gaschromatograph-Massenspektrometer-Kombination auf Photopapier aufgenommen.

Hochauflösungswerte wurden an einer Varian MAT 731 Gaschromatograph-Massenspektrometer-Kombination (gepackte Säule, 3% SE-30 auf Chromosorb W AW DMCS) bestimmt. Dazu wurde die genaue Masse des erwarteten Ions berechnet und auf dem Sichtschirm eingestellt. Erschien die Verbindung im Verlauf des Gaschromatogramms, musste bei Übereinstimmung der berechneten und tatsächlichen Masse das Ion deutlich hervortreten.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die gaschromatographisch-massenspektrometrische (GC-MS) Untersuchung der underivatisierten Probe zeigt im Gegensatz zur Fraktion der mit Essigester extrahierbaren Cannabinoide, die als Hauptkomponenten Cannabidiol (CBD), Tetrahydrocannabinol (THC) und Cannabinol (CBN) aufweist, als Hauptbestandteil

TABELLE I

## GC-PEAKZUORDNUNG DER WASSERLÖSLICHEN CANNABINOIDE

Bei den kursiv gedruckten Ionen handelt es sich um die jeweiligen Basispeaks.

Peak-Nr.	$t_R$	$M^+$	Ionen	Lit.
1	21.35**	346	331, 273 (M-73)	
2	21.70	304	<i>C<sub>5</sub>-Cannabichromanon</i> (Fig. 2)	
3*	21.77**	300 (65)	285 (M-15;18), 282 (M-18;20), 267 (M-33;20), 257 (M-43;100), 243 (M-57;27), 242 (M-58;41), 230 (M-70;54), 229 (M-71;54), 43	
4	22.11	302	<i>C<sub>5</sub>-Cannabielsoin</i> (Fig. 3)	
5		300	285	
6	22.86	300 (50)	285 (44), 257	
7*	22.97	374	359, 301 (M-73)	
8	23.12	282	<i>C<sub>5</sub>-Cannabinol</i>	16
9	23.58	314	Cannabidiol	17
10	23.73	332	Cannabichromanon	2, 3
11	23.78	328 (65)	313 (M-15;16), 310 (M-18;17), 295 (M-33;11), 285 (M-43;100), 271 (M-57;20), 270 (M-58;19), 258 (M-70;50), 257 (M-71;43), 43 (45)	
12	24.13	330	Cannabielsoin	12
13*	24.52	314	Tetrahydrocannabinol	18
14*		310	295	
15		308	Dehydrocannabifuran	2, 3
16	24.96	(390)	Phthalsäurediisooctylester	19
17	24.99	402	387, 329 (M-73)	
18	25.17	310	Cannabinol	17
19*		328	285, 214	2, 3
20*		302	287, 246	
21*	25.76	330 (29)	315 (5), 262 (12), 247	
22	26.32	310	Cannabifuran	2, 3
23*		346	290	
24		330 (82)	315 (29), 299	
25*		346	290	
26	28.00	408	<i>C<sub>25</sub>H<sub>58</sub></i>	
27*	25.18	360	<i>C<sub>5</sub>-Cannabielsoinsäure-B-methylester</i> (Fig. 8)	
28	25.50	358	Fig. 6	
29*		390	375	
30*		384	342	
31*		388	373, 357	
32	26.81	388	Cannabielsoinsäure-B-methylester (Fig. 7)	14
33	27.32	386	Fig. 5	
34*		402	384, 371	
35		404	373, 348	
36		404	373, 348	

\* In diesen Fällen enthielten die GC-Peaks noch weitere Verbindungen.

\*\*  $t_R$  wurde graphisch ermittelt ( $\Delta t_R \pm 0.04$ ).

Cannabielsoin (12), deutlich weniger CBD (9) und CBN (18) und nur eine Spur THC (13); die letzten drei Cannabinoide werden wegen ihrer teilweisen Wasserlöslichkeit auch in der wässrigen Fraktion gefunden<sup>9</sup>.

Zusätzlich zu den bereits bekannten Cannabinoiden (siehe Tabelle I) liessen sich aus den Massenspektren der in Fig. 1 angezeigten Peaks die Strukturen der folgenden bisher unbekannt ableiten.

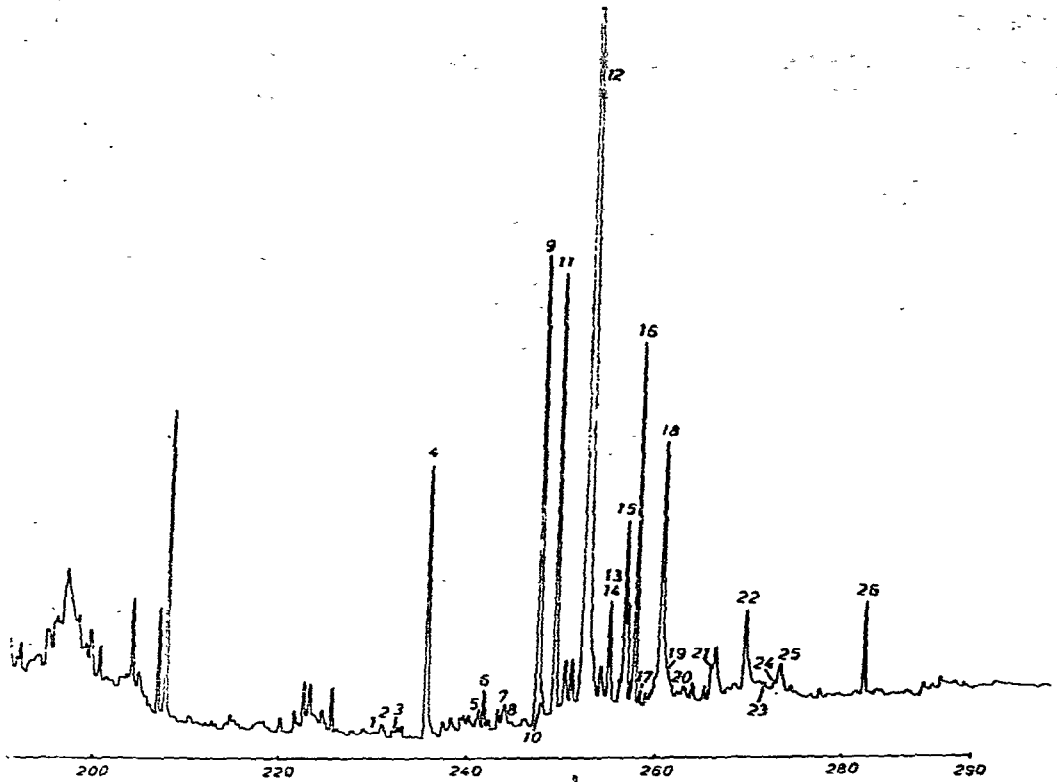


Fig. 1. Gaschromatogramm der Fraktion der wasserlöslichen Cannabinoide. Zur Peakzuordnung siehe Tabelle I.

Peak 2 enthält eine Verbindung mit dem Molekulargewicht (MG) 304 (Fig. 2). Die Summenformel wurde durch Hochauflösung zu  $C_{18}H_{24}O_4$  bestimmt. Im Massenspektrum liegen die Schlüsselionen bei den Massen 289 ( $M - 15$ ), 231 [ $M - (15 + 58)$ ], 219 [ $M - (15 + 70)$ ] und 179 ( $M - 125$ ). Molekülionen und Schlüsselionen

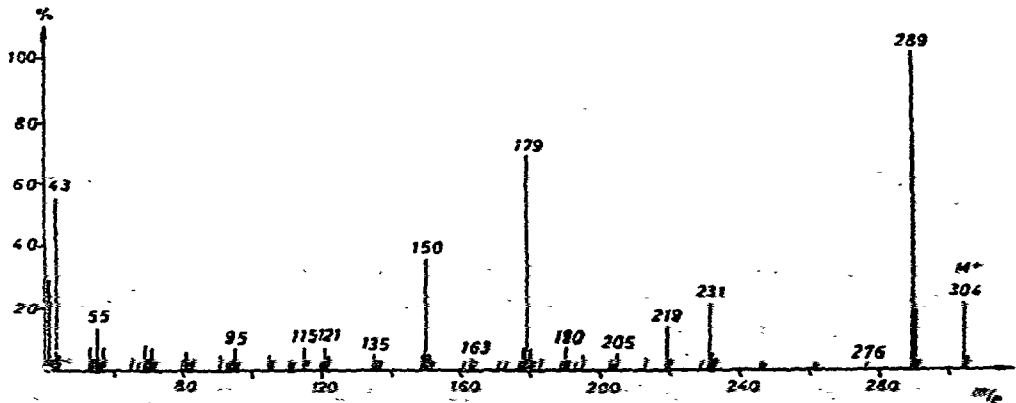


Fig. 2. Massenspektrum des  $C_{18}$ -Cannabichromanon.



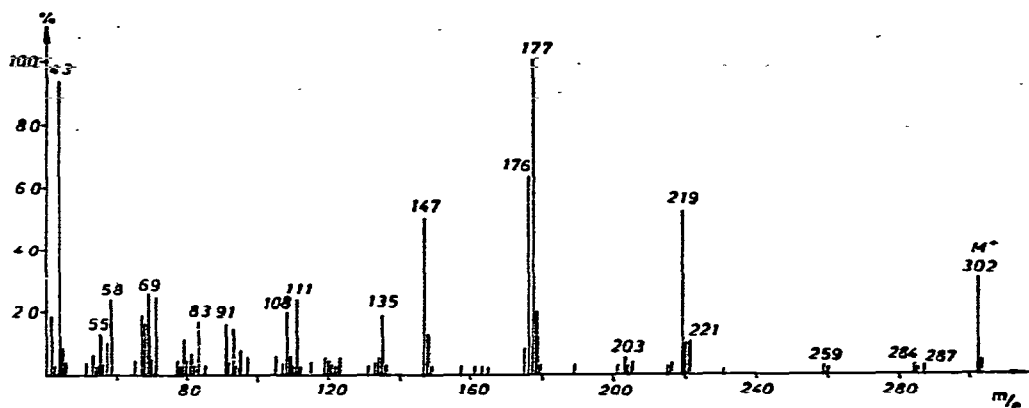


Fig. 3. Massenspektrum des  $C_3$ -Cannabidiol.

loge eines neuen Cannabinoidtyps. Sie lassen in den Massenspektren alle einen Basispeak bei  $(M - 15)$ , ein Molekülion von ungefähr 10% und ein  $(M - 73)$ -Bruchstück von etwa 40% erkennen.

Freie Cannabinoidsäuren erleiden im Gaschromatographen Zersetzung; zumindest werden sie decarboxyliert. Zur Prüfung auf ihr Vorhandensein wurde daher eine Probe des erhaltenen Extraktes vor der GC-Trennung mit etherischer Diazomethanolung umgesetzt<sup>4</sup>. Die anschließende Untersuchung in der Gaschromatograph-Massenspektrometer-Kombination zeigt das in Fig. 4 reproduzierte Gaschromatogramm. Die Massenspektren lassen unter anderem das Vorhandensein der folgenden Cannabinoidsäuremethylester erkennen.

Hauptkomponente ist ein Ester der Masse 386 (Peak 33;  $C_{23}H_{30}O_5$ ; Fig. 5). Basispeak ist das Ion der Masse 311 ( $C_{20}H_{23}O_3$ ), entsprechend der Abspaltung von  $C_3H_7O_2$  ( $CH_3OH$  und  $CH_3CO\cdot$ ). Dieses Ion wird über die primäre Abspaltung von  $CH_3CO\cdot$  aus dem Molekülion gebildet (belegt durch metastabile Ionen  $m/e$  305 und 282). Der bevorzugte Verlust von 43 ME ist typisch für die oben erwähnte Verbindung 11. Das Vorhandensein des gleichen Grundgerüsts wie bei der Verbindung 11 wird durch die Bildung der Ionen bei  $m/e$  328 ( $C_{20}H_{24}O_4$ ;  $M - C_3H_6O$ ),  $m/e$  316 ( $C_{19}H_{24}O_4$ ;  $M - C_4H_6O$ ) und  $m/e$  272 ( $C_{16}H_{16}O_4$ ;  $m/e$  328 -  $C_4H_8$ ) erkennbar.

Da dieser Carbonsäuremethylester in Fig. 4 als Hauptkomponente erscheint, muss man annehmen, dass im Gaschromatographen die underivatisierte Säure fast vollständig durch thermische Zersetzung zerstört wird, während sich unter Abspaltung von  $CO_2$  die Verbindung 11 nur zu einem geringen Teil bildet, so dass in Fig. 1 Cannabidiol als Hauptcannabinoid hervortritt.

Möglicherweise ist diese Säure identisch mit einer Cannabinoidsäure gleicher Summenformel (und unbekannter Struktur), die kürzlich von Hanuš und Krejčí<sup>13</sup> isoliert wurde.

Der Peak 28 enthält einen Cannabinoidsäure ester mit dem Molekulargewicht 358 ( $C_{21}H_{26}O_5$ ; Fig. 6). Das Fragmentierungsschema gleicht dem von Verbindung 33, das  $C_3$ -homologe Cannabinoid liegt also ursprünglich auch als Carbonsäure vor.

Die Umsetzung der Methylester 28 und 33 mit MSTFA verschiebt die Molekülionen um 72 ME nach  $m/e$  460 bzw. 432. Dabei wird allerdings keine freie phenolische

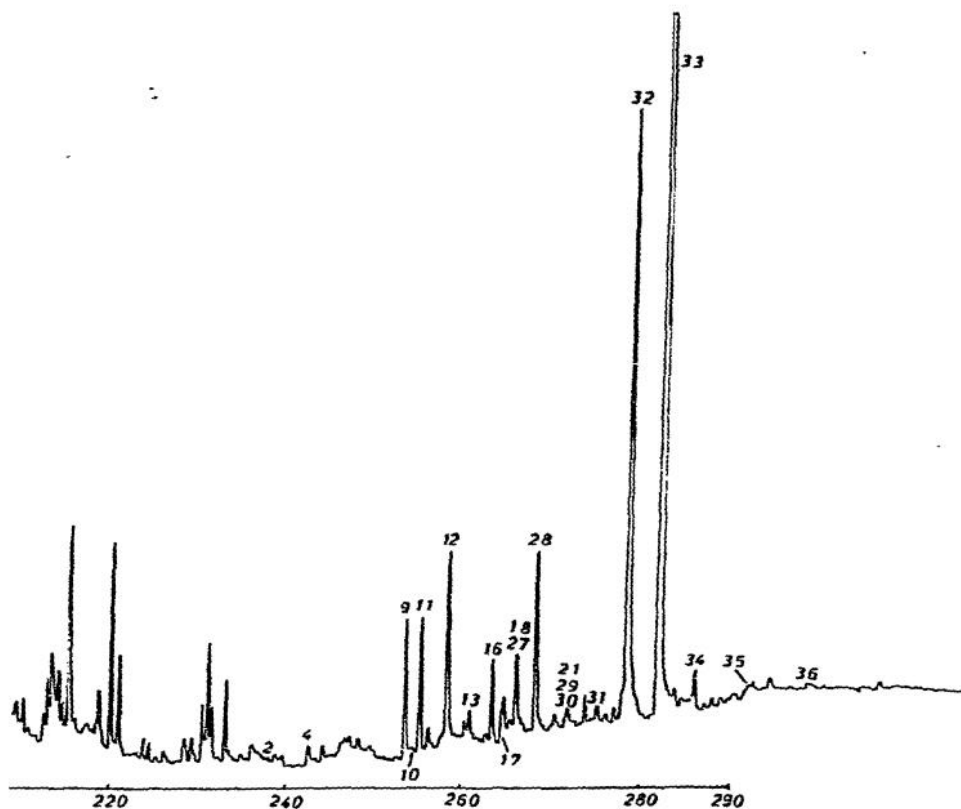


Fig. 4. Gaschromatogramm der Fraktion der wasserlöslichen Cannabinoide nach der Derivatisierung mit Diazomethan. Zur Peakzuordnung siehe Tabelle I.

OH-Gruppe umgesetzt. Der Basispeak bei  $m/e$  143, der auch bei dem monosilylierten Neutralcannabinoid 11 bei gleicher Masse hervortritt\*, deutet vielmehr darauf hin, dass sich die Ketogruppe zum Enol-TMS-Derivat umgesetzt hat.

Peak 32 enthält Cannabielsoinsäuremethylester ( $C_{23}H_{32}O_5$ ; MG 388; Fig. 7)<sup>14</sup>. Der Methylester aus Peak 27 ( $C_{21}H_{28}O_5$ ; MG 360; Fig. 8) zeigt das gleiche Bruchstückverhalten, auch hier erscheint der Basispeak bei  $M - 125$  ME. Demnach handelt es sich bei dieser Verbindung um  $C_3$ -Cannabielsoinsäuremethylester.

Die Derivatisierung der Cannabielsoinsäuremethylester mit MSTFA führt zur Einführung von zwei TMS-Gruppen, wobei sich die Molekulargewichte auf 532 bzw. 504 erhöhen. Die charakteristischen Spaltstücke erscheinen im Massenspektrum bei  $m/e$  108 ( $C_8H_{12}^+$ ) und  $m/e$  130 ( $C_3H_5OSiC_3H_9^+$ ), die dem alicyclischen Teil der Moleküle entstammen. Demgegenüber sind die für die Cannabielsoinstruktur typischen Ionen bei  $M - 83$  und  $M - 125$  ME oder der Verlust von  $CH_3O\cdot$  und  $TMSOH$  deutlich weniger intensiv.

\* Das Massenspektrum des TMS-Ether der Verbindung 11 wurde von der auf anderem Wege isolierten Substanz erhalten.

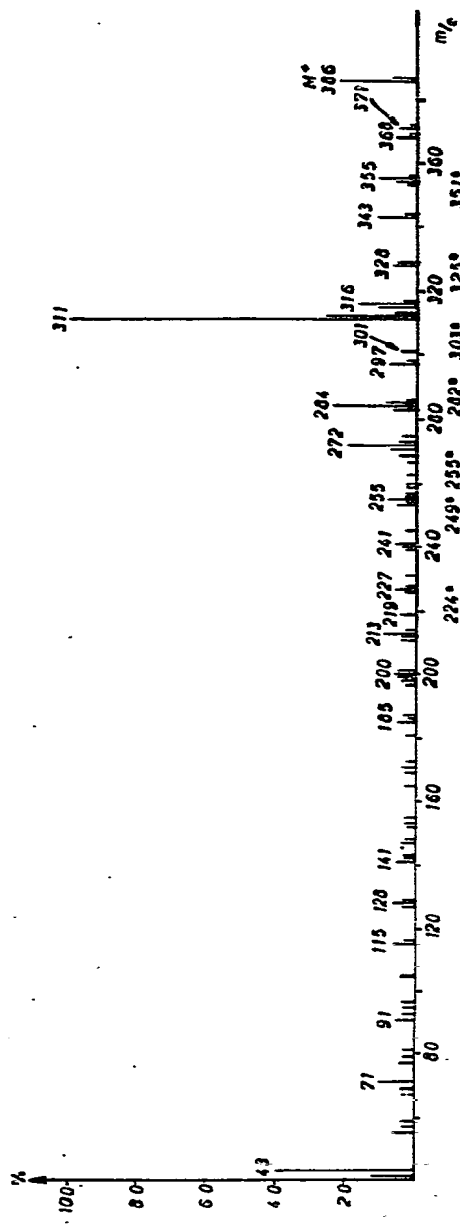


Fig. 5. Massenspektrum der Verbindung 33; siehe Text.

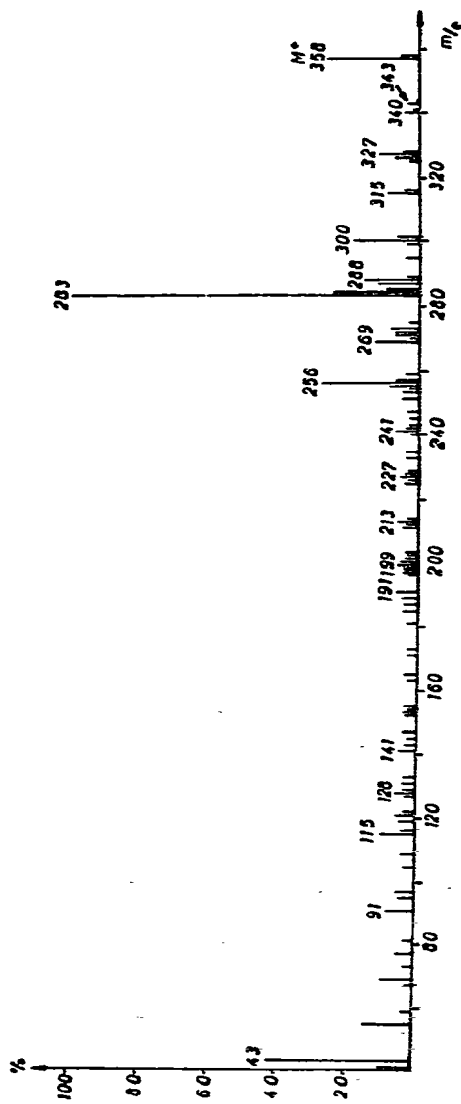


Fig. 6. Massenspektrum der Verbindung 28; siehe Text.



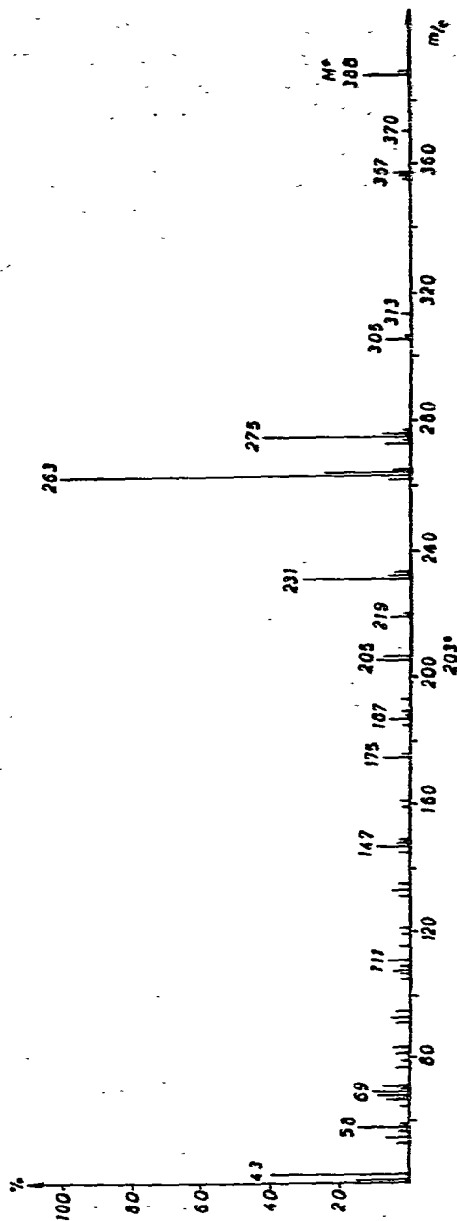


Fig. 7. Massenspektrum des Cannabielsoinsäure-B-methylesters.

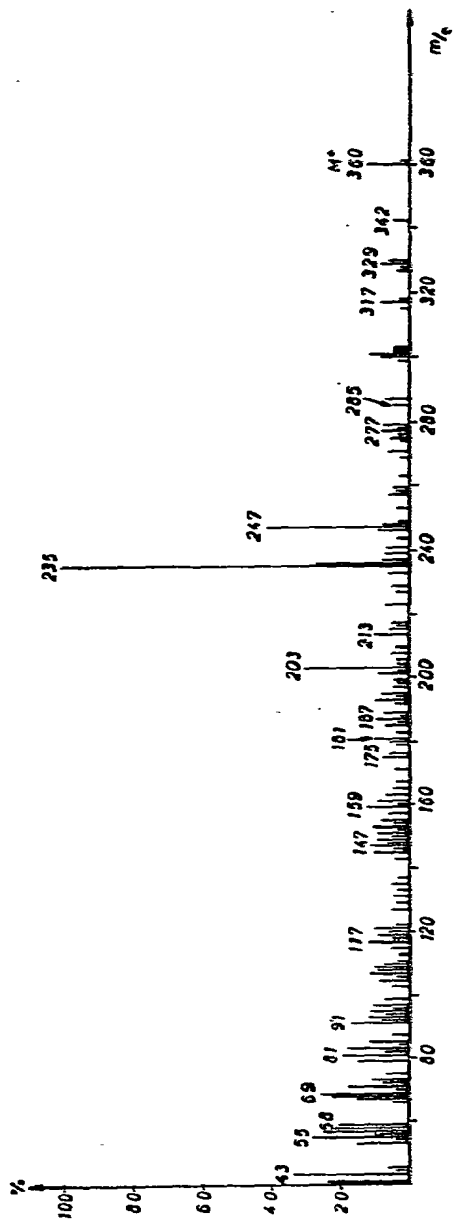
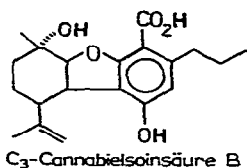


Fig. 8. Massenspektrum des  $C_3$ -Cannabielsoinsäure-B-methylesters (das Cannabinolmassenspektrum wurde vom PDP-11-Rechner substituiert).

Aus den bisher mitgeteilten Untersuchungsergebnissen lässt sich noch nicht die Stellung der Carboxylgruppe am Cannabinoidgerüst ableiten. Um zu entscheiden, ob diese als *o*- oder als *p*-Phenolcarbonsäure vorliegen, wurde ein Teil der Ausgangsprobe mit Methylborsäure umgesetzt. Bei dieser Reaktion entstehen nach Harvey<sup>5</sup> nur aus den *o*-Phenolcarbonsäuren cyclische Borsäurederivate.

Die GC-MS-Untersuchung der Reaktionsprodukte ergab nur die Anwesenheit der Cannabinoide 3 und 11, nach zusätzlicher Veresterung die der Verbindung 27 und 32. Danach ist die *o*-Ständigkeit von Phenol- und Carboxylgruppe auszuschliessen. Nach der Bezeichnungweise von Shani und Mechoulam<sup>14</sup> handelt es sich demnach bei 27 um C<sub>3</sub>-Cannabielsoinsäure B.



Auch die Säuren 28 und 33 bilden keine Borsäurederivate.

Die Cannabinoide 3 und 4 dürften ursprünglich auch als Säuren vorgelegen haben. Da Cannabinoidsäuren aber bei längerer Lagerung (insbesondere in Lösung) decarboxylieren können, muss mit ihrem Auftreten als Spurenbestandteil auch in Haschischextrakt-Neutralfraktionen gerechnet werden<sup>15</sup>.

Zur Prüfung auf Cannabinoidglykoside wurden die von der XAD-Säule eluierten Substanzen enzymatischen Verseifungsversuchen mit Enzymen aus *Helix pomatia* sowie mit  $\alpha$ - und mit  $\beta$ -Glucosidase unterworfen. Nach üblicher Aufarbeitung ergab sich ein im Cannabinoidbereich unverändertes Gaschromatogramm. Danach lagen hier offensichtlich keine Cannabinoidkonjugate vor.

#### SCHLUSSBETRACHTUNG

Aus einem Haschischextrakt wurden gut wasserlösliche Cannabinoide durch Adsorption an XAD-4 isoliert. Dabei wurden vor allem Cannabinoidsäuren abgetrennt, die ebenso durch Extraktion mit Natronlauge<sup>14</sup> gewonnen werden könnten. In diesem Falle steigt allerdings der Anteil an Fettsäuren stark an, so dass die Cannabinoide im Gaschromatogramm teilweise überlagert werden. Daneben treten in dieser Fraktion jedoch noch einige Neutralcannabinoide in Erscheinung, die bei der Untersuchung der Neutralfraktion der Haschischprobe in einer Gaschromatograph-Massenspektrometer-Kombination nicht mehr nachgewiesen werden können, weil hier ihre Konzentration gegenüber den anderen Neutralcannabinoiden zu gering geworden ist. Dieser Trennungsweg eröffnet somit die Möglichkeit der Isolierung weiterer gut wasserlöslicher Cannabinoide, die vielleicht in Haschischproben angereichert sind, die anderen Herkunftsländern oder anderen Cannabisarten entstammen.

#### DANK

Wir danken dem Landeskriminalpolizeiamt Hannover für die Überlassung der Haschischprobe, Herrn J. Reiner für die Herstellung der Glaskapillarsäulen und

Herrn Dr. G. Remberg für die Bestimmung der Hochauflösungswerte. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für Sachmittel. H. Grote dankt der Fritz ter Meer-Stiftung für ein Stipendium.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Durch Adsorption an XAD-Harz wurden aus Cannabisextrakt wasserlösliche Cannabinoide—vor allem Cannabinoidsäuren—gewonnen. Diese Extrakte enthalten, wie eine Untersuchung in einer Gaschromatograph–Massenspektrometer-Kombination ergab, die bisher unbekanntenen Cannabinoide C<sub>3</sub>-Cannabichromanon, C<sub>3</sub>-Cannabielsoin und C<sub>3</sub>-Cannabielsoinsäure B.

Die in Hauptmenge vorkommende Säure hat das gleiche Grundgerüst wie eine bereits früher isolierte Verbindung vom Molekulargewicht 328. Von dieser Verbindung wurden überdies das C<sub>3</sub>-Homologe und die C<sub>3</sub>-homologe Säure gefunden.

#### LITERATUR

- 1 G. A. Junk, J. J. Richard, M. D. Grieser, D. Witiak, J. L. Witiak, M. D. Arguello, R. Vick, H. J. Svec, J. S. Fritz und G. V. Calder, *J. Chromatogr.*, 99 (1974) 745.
- 2 J. Friedrich-Fiechtl und G. Spiteller, *Tetrahedron*, 31 (1975) 479.
- 3 J. Friedrich-Fiechtl, *Doktorarbeit*, Göttingen, 1974.
- 4 L. Änggård, B. Sjöquist und R. Sjöström, *J. Chromatogr.*, 50 (1970) 251.
- 5 D. J. Harvey, *Biomed. Mass Spectr.*, 4 (1977) 88.
- 6 C. J. W. Brooks und I. MacLean, *J. Chromatogr. Sci.*, 9 (1971) 18.
- 7 J. Drozd, *J. Chromatogr.*, 113 (1975) 303.
- 8 E. C. Horning, in K. B. Eik-Nes und E. C. Horning (Herausgeber), *Gas Phase Chromatography of Steroids*, Springer, Berlin, 1968, S. 32.
- 9 A. B. Segelman, R. D. Sofia, F. P. Segelman, J. J. Harakal und L. C. Knolboch, *J. Pharm. Sci.*, 63 (1974) 962.
- 10 K. Biemann, *Tetrahedron Lett.*, (1960) 9.
- 11 R. Mechoulam, K. McCallum und S. Burstein, *Chem. Rev.* 76 (1976) 75.
- 12 F. J. E. M. Küppers, R. J. J. Ch. Lousberg, C. A. L. Bercht, C. A. Salemink, J. K. Terlouw, W. Heerma und A. Laven, *Tetrahedron*, 29 (1973) 2797.
- 13 L. Hanuš und Z. Krejčí, *Acta Univ. Palacki. Olomuc., Fac. Med.*, 74 (1975) 161.
- 14 A. Shani und R. Mechoulam, *Tetrahedron*, 30 (1974) 2437.
- 15 R. N. Smith und C. G. Vaughan, *J. Pharm. Pharmacol.*, 29 (1977) 286.
- 16 T. B. Vree, D. D. Breimer, C. A. M. van Ginneken und J. M. van Rossum, *J. Pharm. Pharmacol.*, 24 (1972) 7.
- 17 H. Budzikiewicz, R. T. Alpin, D. A. Lightner, C. Djerassi, R. Mechoulam und Y. Goani, *Tetrahedron*, 21 (1965) 1881.
- 18 U. Claussen, H.-W. Fehlhaber und F. Korte, *Tetrahedron*, 22 (1966) 3535.
- 19 M. Spiteller und G. Spiteller, *Massenspektrensammlung von Lösungsmitteln, Verunreinigungen, Säulenbelegmaterialien und einfachen aliphatischen Verbindungen*, Springer, Wien, New York, 1973, Nr. 61.