

ZUR CHEMISCHEN KLASSIFIZIERUNG VON PFLANZEN—XXX. HASCHISCH—IX*

MASSENSPEKTROMETRISCHE BESTIMMUNG VON HASCHISCH- INHALTSSTOFFEN

U. CLAUSSEN und F. KORTE†
Organisch-Chemisches Institut der Universität Bonn

(Received 22 October 1965)

Zusammenfassung—Die Abhängigkeit der Fragmentierung von der Lage der Doppelbindung im Terpenring des Cannabidiol wird massenspektrometrisch untersucht, und der Fragmentierungsmechanismus mit deuterierten Verbindungen verfolgt.

Die Lage der Doppelbindung im alicyclischen Ring bestimmt eindeutig das Fragmentierungsschema. Dies trifft auch auf Verbindungen mit Tetrahydrocannabinol-Struktur zu.

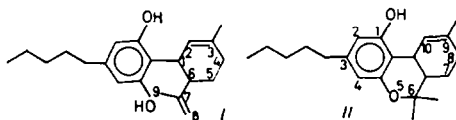
Abstract—The mass spectra of cannabidiol and its isomers are investigated in dependence of the position of the double bond in the terpene ring. The course of the break down has been studied with the aid of deuterated compounds. The position of the double bond is responsible for a typical fragmentation pattern. This is also due to tetrahydrocannabinol-structures.

Eine soeben erschienene Arbeit von Budzikiewicz *et al.*¹ über die massenspektrometrische Untersuchung von Haschisch-Inhaltsstoffen veranlasst uns, unsere Ergebnisse mitzuteilen.

Im Laufe der letzten 2 Jahre haben wir mehrfach Inhaltsstoffe aus Haschisch verschiedener Provenienzen isoliert und unter verschiedenen Bedingungen massenspektrometrisch untersucht. Im Falle des Cannabinol (CBN) und Cannabigerol (CBG)² stimmen unsere Ergebnisse mit denen von Budzikiewicz überein. So kann auch die Beobachtung bestätigt werden, dass der Zerfall des alicyclischen Rings bevorzugt eintritt.

Bei allen anderen von uns ebenfalls untersuchten Verbindungen haben wir jedoch unabhängig von der Herkunft der Substanz andere Ergebnisse erhalten.

Wir haben gefunden, dass die Fragmentierung durch Elektronenstoss des Cannabidiol (CBD, Formel I), seiner Derivate und Isomeren eindeutig von der Lage der Doppelbindungen im Terpenring abhängig ist. Für die Doppelbindungsisomeren des Tetrahydrocannabinol (THC, Formel II) besteht ein ähnlicher Zusammenhang zwischen Fragmentierungsschema und Lage der Doppelbindung im alicyclischen Ring.



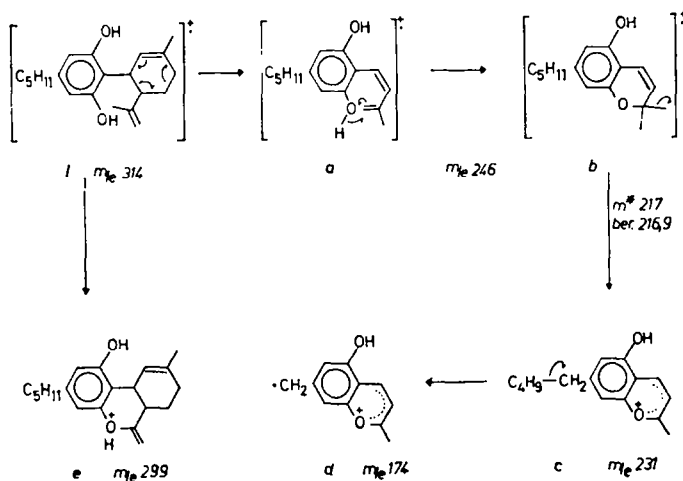
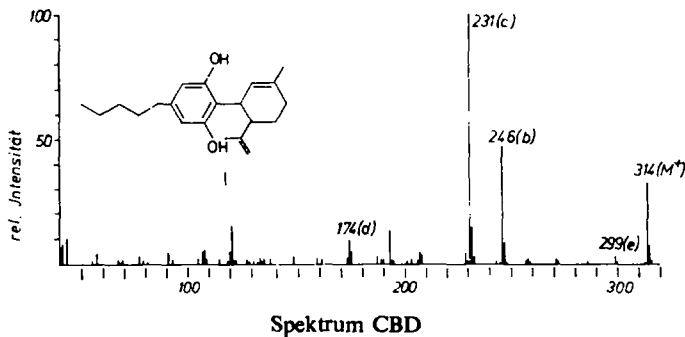
* XXIX. Mitteilung: F. Korte, E. Dlugosch, U. Claussen, *Liebigs Ann.* im Druck.

† This work is dedicated to the memory of Professor H. Stephen.

¹ H. Budzikiewicz, R. T. Alpin, D. A. Lightner, C. Djerassi, R. Mechoulam and Y. Gaoni, *Tetrahedron* 21, 1881 (1965).

² Herrn Prof. Dr. R. Mechoulam, The Weizman Institute of Science, Rehovoth, Israel, danken wir für die Überlassung einer Substanzprobe.

Die für natives und synthetisches Δ^2 -CBD (I) charakteristische Fragmentierung verursachen 2 isolierte Doppelbindungen, die gemeinsam mit dem aromatischen Kern die allylständige 1,6-Bindung aktivieren. Deren Lösung induziert einen Prozess, der sich als retro-Diels-Alder-Reaktion formulieren lässt (s. Schema 1). Im weiteren



Verlauf cyclisiert das Ion *a* zu einem Dimethylchromenyl-Ion *b*, das sich unter Verlust einer Methylgruppe zu *c*³ stabilisiert.

Dies lässt sich mit Hilfe von CBD, dessen Hydroxylprotonen gegen Deuterium ausgetauscht wurden, zeigen. Die Änderung des Deuteriumgehalts durch den Verlust der Methylgruppe entspricht dem vollständigen Umsaltz von *a* zu *b* (s. Tabelle 2).

Das Fragment *c* erleidet einen dem Amylbenzol entsprechenden Zerfall⁴ und ergibt unter Verlust des Butylrestes das Ion *d* (*m/e* 174). Besondere Beachtung bedarf die Frage, ob in der Ionenquelle eine Cyclisierung von I zu II erfolgt, da sich CBD leicht thermisch cyclisieren lässt.⁵ Mit steigender Temperatur der Ionenquelle nimmt

³ C. S. Barnes and J. L. Occolowitz, *Austr. J. Chem.* **17**, 975 (1964); B. Willhalm, A. F. Thomas and F. Gautschi, *Tetrahedron* **20**, 1185 (1964).

⁴ H. M. Grubb and S. Meyerson in *Mass spectrometry of organic ions* (Edited by F. W. McLafferty) S. 453 ff. Academic Press, New York (1963).

⁵ F. Korte and H. Sieper, *J. Chromatog. Amsterdam* **13**, 90 (1964).

die relative Intensität der nach Schema 1 entstandenen Ionen ab. Dagegen steigt die Häufigkeit aller Bruchstücke, die durch Cyclisierung zum THC und dessen Zerfall entstanden sein könnten (Tabelle 1). Zudem treten bei höheren Temperaturen wie bei dem THC auch Peaks auf, die auf Dehydrierungen deuten. Auch diese Reaktion ist leicht möglich.⁶

TABELLE 1. ABHÄNGIGKEIT DER REL. INTENSITÄT VON DER IONENQUELLENTEMPÉRATUR BEIM CBD

Ionenquelle [°C]	<i>m/e</i>									
	314	299	297	295	286	271	258	246	243	231
70° ^a	31.8	2.8			1	2.3	1.8	47.8	1	100
110°	22.7	8.3				5.3	2.8	30.1	2.7	100 ^b
200°	18.5	14.3	3.6	4.2		10.0	4.2	18.5	4.2	100
250°	15.2	9.6	3.3	3.9	3.2	8.4	2.5	18.3	4.7	100
200° ^c	13.6	5.8	3.1	4.8	1.5	6.1	3.1	30.4	2.4	100 ^d

^a CEC 21, alle anderen Messungen mit Atlas CH4; Direkteinlaßteil nach Biemann.

^b Mittel aus 3 Messungen.

^c Hochtemperatureinlasssystem (HTE)

^d Mittel aus 2 Messungen.

Die Untersuchung der Fragmentierung von CBD mit deuterierten Hydroxylgruppen zeigt, dass eine Cyclisierung zum THC nicht erfolgt. Vielmehr hat man es mit einem über das Ion *e* zu formulierenden Mechanismus zu tun, der auch von Budzikiewicz¹ *et al.* als Alternative zur Cyclisierung angenommen wurde. Tabelle 2 gibt die berechneten und gefundenen Deuteriumgehalte der untersuchten Bruchstücke wieder.

TABELLE 2. GEFUNDENE UND BERECHNETE WERTE DER DEUTERIUMVERTEILUNG IN DEN FRAGMENTEN DES CBD. DIE BERECHNETEN WERTE ENTSPRECHEN EINER VOM THC-ION AUSGEHENDEN FRAGMENTIERUNG

<i>m/e</i>	Gefunden			Berechnet		
	<i>d</i> ₀	<i>d</i> ₁	<i>d</i> ₂	<i>d</i> ₀	<i>d</i> ₁	<i>d</i> ₂
314	16.6	46.9	36.6			
299	19.5	46.4	34.2		53.5	18.3
271	30.0	36.1	34.0	40.1	60.0	
246	12.0	44.1	43.6	16.6	46.9	36.6
231	15.1	53.0	31.9	28.3	53.5	18.3
229	16.0	44.5				
193	20.5	27.8	51.7			
174	27.8	38.8	33.6			

Bei der Bildung des M-15-Bruchstücks kann die Änderung des Deuteriumgehalts nur gering sein. Dagegen ist der Effekt bei dem Fragment *m/e* 271 (M-43) deutlich. Das Spektrum des CBD entspricht also nur bei niedrigen Temperaturen der Ionenquelle der Verbindung I mit einer Isopropenylseitenkette. Bei höheren Temperaturen geht der Zerfall zunehmend von einem mit dem Ion *e* zu beschreibenden Zustand aus. Da das Ion M-15 des THC gleichartig fragmentiert, erhält man mit steigender Temperatur eine Annäherung des Spektrums von CBD an das des THC. Identität wird aber nicht erreicht, da ab 200° andere Fragmentierungen möglich werden. Das Auftreten der Masse 295 ist daher ein sicheres Zeichen für eine zu heiße Ionenquelle.

Eine weitere Möglichkeit der Fragmentierung bei niedrigen Temperaturen ist die

⁶ vgl. R. Adams *The Harvey Lectures Series XXXVII* pp. 168–197. 1941–1942.

Abspaltung des alicyclischen Rings unter H-Übertragung und Bildung eines Benzyl- oder Tropyliumions (m/e 193). Ob das Bruchstück 229 durch Verlust von 17 Masseneinheiten aus dem Ion b entsteht, lässt sich durch Untersuchung der deuterierten Substanz nicht entscheiden, da die Isotopenpeaks der Ionen 229 und 231 sich überlappen.

Jedoch sind diese Wege von minderer Bedeutung, solange die Möglichkeit der Cyclisierung zu b besteht. Verhindert man diese durch Blockierung der OH-Gruppen, so werden die Nebenwege Hauptbahnen der Fragmentierung. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, die Temperaturabhängigkeit der Spektren durch Veräthern der OH-Gruppen zu umgehen. Zugleich lassen sich Einflüsse, die durch eine veränderte Lage der Doppelbindung hervorgerufen werden, besser übersehen.

Doppelbindungsisomere Terpene lassen sich massenspektrometrisch oft nur schwer unterscheiden.⁷ Die Untersuchung der Dimethyläther III und IV mit unterschiedlicher Lage der Doppelbindung im Terpenteil des Moleküls zeigte jedoch, dass beide Verbindungstypen eindeutig unterscheidbare Spektren liefern. Dies ist offensichtlich auf den Einfluss des Olivetylrestes zurückzuführen. Die Fragmentierung sei am Beispiel der CBD-Dimethyläther IIIa und IV a dargestellt.

Bei dem Δ^2 -Dimethyläther IIIa entsteht der *base peak* erwartungsgemäß durch retro-Dien-Spaltung und Bildung des Ions f (m/e 274). Diese wird fast ausschliesslich auf diesem Wege gebildet, wie das Spektrum der an C-8 deuterierten Verbindung zeigt (Tabelle 3). f ist wie sein Analoges a unbeständig und zerfällt unter Eliminierung einer Methoxylgruppe, wobei das Bruchstück g entsteht (Schema 2). Der einstufige Übergang von f nach g wird durch ein metastabiles Ion belegt.

TABELLE 3. DIE ISOTOPENVERTEILUNG IN DEN WICHTIGSTEN BRUCHSTÜCKEN DER IN 8-STELLUNG DEUTERIERTEN CBD-ÄTHER IIIa UND IVa

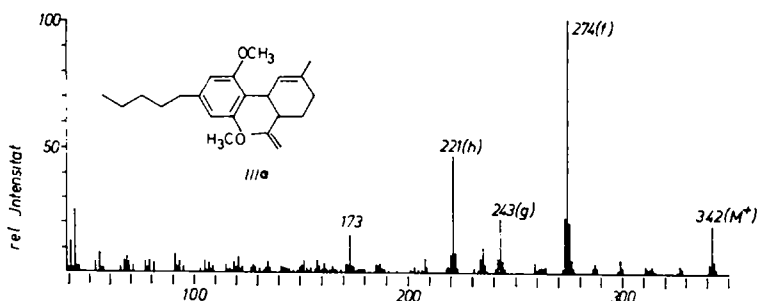
m/e	IIIa				IVa			
	d_0	d_1	d_2	d_3	d_0	d_1	d_2	d_3
342	9.8	26.8	53.6	9.8	6.4	25.0	46.9	21.8
299					63.6	17.5	10.3	8.7
287					93.0	3.4	3.6	
274	83.5	14.5	2.0		23.6	21.3	36.4	18.5
243	100				23.9	21.3	36.5	18.6
221	27.8	31.8	37.8	2.0	90.5	4.7	4.8	
173	100				24.1	28.0	33.8	13.3

Von besonderer Bedeutung ist der Zerfall des Terpenrings unter Bildung des Benzyl- oder Tropyliumions h (m/e 221). Dieses Bruchstück kann nur durch Verschiebung von Wasserstoff entstehen. Deuteriummarkierung an C-8 zeigt, dass bis zu 50% des Wasserstoffs von der Isopropenylgruppierung stammen. Jedoch lässt sich über die Bildungsweise des Ions darüberhinaus nichts Sicheres aussagen.

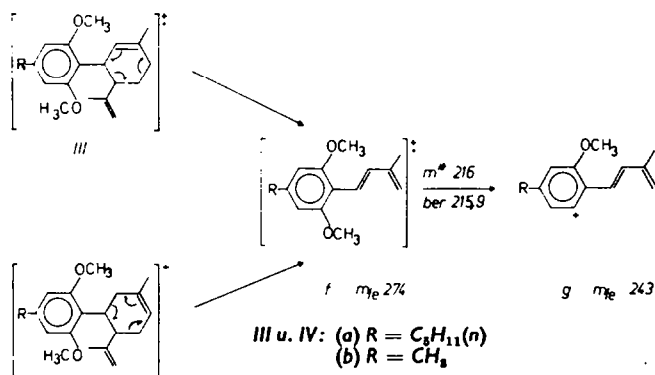
Das Fragmentierungsmuster des Δ^3 -CBD-Dimethyläther IVa ist durch die beiden fast gleich intensiven Peaks der Ionen f und h gekennzeichnet. Wie bei dem Äther IIIa kann der Abbau des Terpenrings durch retro-Dien-Spaltung beschrieben werden. Jedoch wird in diesem Falle Isopren zu etwa 80% aus dem Cyclohexenring eliminiert, während der Isopropenylrest mit der Deuteriummarkierung am aromatischen Rest

^{7a} A. F. Thomas and B. Willhalm, *Helv. Chim. Acta* **47**, 475 (1964); *Acta Chim. Scand.* **18**, 1573 (1964).

^b R. Ryhage, E. v. Sydow, *Ibid.* **17**, 2025 (1963); E. v. Sydow, *Ibid.* **18**, 1782 (1964).

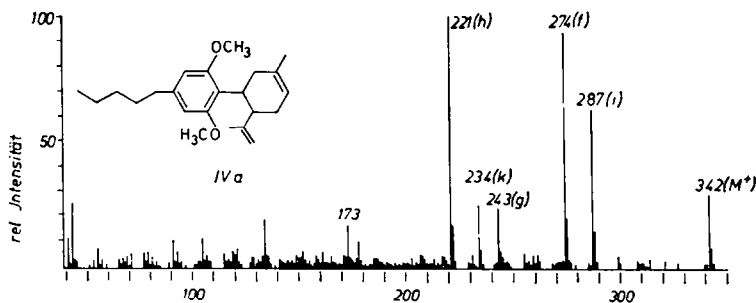


Spektrum IIIa



IV

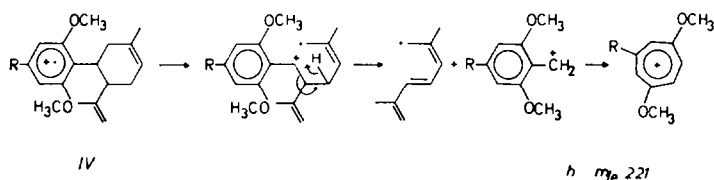
Schema 2



Spektrum IVa

verbleibt. Unter Verlust von 31 Masseneinheiten bildet sich dann das Ion *g*. Die zum Ion *h*, dem *base peak*, führende Fragmentierung ist wie bei III a mit der Verschiebung eines Protons verbunden. Allerdings ist hier die Isopropenylseitenkette nicht der Lieferant des Wasserstoffs. *h* könnte formal durch Verlust eines konjugierten Trienradikals entstehen (Schema 3). Die Bildung eines konjugierten Triens unter Verschiebung von allylständigem Wasserstoff ist bei Monoterpenen möglich.^{7a}

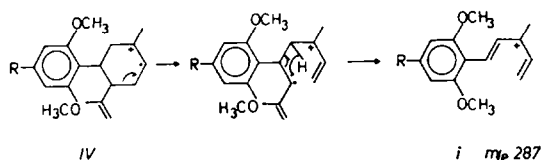
Nur bei den Isomeren IV tritt ein Fragment-Ion *i* auf. Es entsteht allein durch Verlust des Butylrestes aus der Isopropenyl-Seitenkette. Dieser wird durch die gegenüber III veränderte Aktivierung des Terpenrings möglich, da nicht nur die 1,6-sondern auch die 5,6-Bindung zu den aktivierenden Zentren β -ständig ist. Daher kann die



Schema 3

isolierte Doppelbindung nach Ionisierung die in Schema 4 wiedergegebene Fragmentierung einleiten.

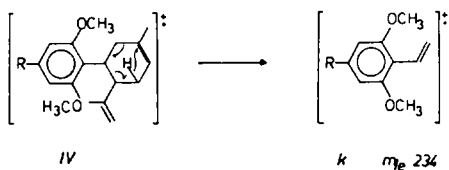
Es entsteht unter Verschiebung von Wasserstoff, der möglicherweise vom C-2 stammt, ein resonanzstabilisiertes Ion.



Schema 4

Auch die nur bei IV in nennenswertem Masse auftretenden Fragmente M-43 entstehen durch Verlust der Isopropenylgruppe. Indessen ist ein C₃H₇-Bruchstück nur durch mindestens zweifache Wasserstoffverschiebung möglich. Durch hohe Temperaturen in der Ionenquelle wird diese Fragmentierung sehr begünstigt.

Die Doppelbindungsisomeren unterscheiden sich weiterhin durch ein Bruchstück *k*, das bei III in erheblich kleinerer Intensität als bei IV auftritt. Da die Isopropenylgruppe bei dieser Fragmentierung entfernt wird, entsteht das Ion also durch Abbau des Terpenrings. Das Schema 5 wäre eine mögliche Formulierung für diesen Vorgang.



Schema 5

Den Äthern IIIa und IVa ist gemeinsam ein Ion der Masse *m/e* 173. Den Spektren C-8-deutrierter Substanzen entnimmt man, daß dieses beim Δ³-Isomere IVa noch Deuterium und zwar in der ursprünglich vorhandenen Menge enthält. Nur die retro-Dien-Spaltung führt zu Fragmenten, bei denen die Isopropenylseitenkette und damit die Deuteriummarkierung entweder abgegeben (IIIa) oder behalten wird (IVa). Es liegt also nahe, das Ion *g* als Vorläufer dieses Bruchstückes anzunehmen. Diese Vermutung wird durch ein metastabiles Ion (*m*^{*} = 123·2, Ber: 123·3) gestützt. Demnach würde die Amylseitenkette durch α-Spaltung und Wasserstoffverschiebung eliminiert, da ein anderes Neutralteil von 70 Masseneinheiten unter den eben angeführten Voraussetzungen nicht formulierbar ist.

Um diese Fragen und den Einfluss der n-Amylseitenkette zu untersuchen, wurden

die Spektren der Methylhomologen IIIb und IVb der CBD-Dimethyläther gemessen. Ein Einfluss der Seitenkette auf die Fragmentierung ist nicht feststellbar. Die Fragmentierungsschemata dieser Verbindungen sind erwartungsgemäss mit denen ihrer Homologen IIIa und IVa identisch, was den Zerfall des Terpenrings angeht. In der folgenden Tabelle 4 sind die rel. Intensitäten der wichtigsten Ionen zusammengestellt:

TABELLE 4. DIE REL. INTENSITÄT IN % DER DURCH FRAGMENTIERUNG DES TERPENRINGS ENTSTEHENDEN BRUCHSTÜCKE HOMOLOGER ÄTHER

		Fragment-Ion					
		i	f	g	k	h	
m/e	a	342	287	274	243	234	221
	b	286	231	218	187	178	165
III	a	18.2	3	100.0	21.0	6.1	45.3
	b	20.8	2	100.0	68.6	4.2	34.6
IV	a	28.8	62.8	93.4	23.5	24.9	100.0
	b	26.7	44.1	57.4	54.7	9.4	100.0

Den Methylhomologen fehlt aber ein Peak, der dem Bruchstück 173 entspricht, der aber auftreten müsste, wenn die Seitenkette an dieser Reaktion nicht beteiligt wäre. Auch dieser Befund spricht für die α -Spaltung des Amylrestes.

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Doppelbindungswanderung im Terpenteil der Ionen nicht eintritt. Vielmehr werden durch die unterschiedliche Lage der Doppelbindung im Ring spezifische Fragmentierungen verursacht, die eine sichere Unterscheidung isomerer Verbindungen ermöglichen.

Diese Ergebnisse sollten auf die Fragmentierung des THC anwendbar sein. Budzikiewicz *et al.*¹ geben die Spektren des synthetischen Δ^8 - und des genuinen Δ^9 THC an; beider Spektren unterscheiden sich nur in den rel. Intensitäten von dem des CBD und sind untereinander sehr ähnlich. Unsere Untersuchungen an nativem THC und an synthetischen Produkten mit veränderter Lage der Doppelbindung im Ring zeigen aber, dass die Spektren ähnlich wie beim CBD von der Lage der Doppelbindung abhängig sind. Wir werden darüber an anderer Stelle berichten. Hier sei nur angemerkt, dass wir im Laufe mehrerer Jahre bei verschiedenen Haschischsorten die Erfahrung gemacht haben, dass THC von sehr schwer trennbaren phenolischen Substanzen gleichen Molekulargewichts begleitet ist. Die Unterschiede in den Spektren könnten durch ein solches Gemisch bedingt sein. Als eine dieser Begleitsubstanzen haben wir inzwischen die früher⁵ mit THC II bezeichnete Verbindung isoliert. Deren Spektrum stimmt mit dem veröffentlichten überein, wenn man annimmt, dass sie mit nativem THC im Gemisch vorgelegen hat. Jedoch sind die NMR-Daten nicht mit den von Mechoulam⁸ für natives THC angegebenen identisch.

Für ihre liebenswürdige Hilfe und die Anfertigung der Massenspektren danken wir den Herren Prof. Dr. H. A. Staab, Universität Heidelberg, Dr. H. J. Fehlhaber vom hiesigen Institut und Dr. A. Weitkamp, Shell Grundlagenforschung GmbH, Schloß Birlinghoven.

Die Spektren wurden mit einem Atlas CH4-Massenspektrometer entweder mit einem Hochtemperaturinlassteil (HTE) bei 200° (Ionisierungsenergie 70 eV, Ionisierungsstrom 20 μ A) oder dem Direkteinlass nach Biemann (Ionenquelle bis 250°, Ionisierungsenergie 70 eV) gemessen.

Die deuterierten Cannabidiol-Dimethyläther wurden durch Wittig-Olefinierung von [2',6'-

⁸ R. Mechoulam, Y. Gaoni, *J. Amer. Chem. Soc.* **86**, 1646 (1964).

Dimethoxy-4'-pentyl-3-methyl-6-acetyl]-1,6,5,4-tetrahydrodiphenyl⁹ oder dem 1,2,5,6-Isomeren mit Triphenylphosphinmethylenbromid (d_3) dargestellt, das deuterierte Cannabidiol durch Schütteln einer Lösung von 10% CBD in CCl_4 mit D_2O . Der Deuterierungsgrad der verwendeten Substanzen war:

	d_0	d_1	d_2	d_3
CBD	13.8	39.0	30.4	12.8
IIIa	9.8	26.8	53.6	9.8
IVa	5.6	20.5	41.3	20.6

Das Methylhomologe IVb erhält man IVa analog,¹¹ IIIb entsprechend analog IIIa.¹⁰ Das verwendete CBD war entweder kristallines aus Haschisch gewonnenes Material, oder öliges Syntheseprodukt (D,L-Gemisch). Der Stiftung Volkswagenwerk e.V. und der Research Corp. New York danken wir für Sachbeihilfen.

⁹ F. Korte, E. Dlugosch, U. Claussen, *Liebigs Ann.*, im Druck.

¹⁰ F. Korte, E. Hackel, H. Sieper, *Liebigs Ann.* **685**, 122 (1965).

¹¹ E. Hackel, *Diplomarbeit* Universität Bonn (1961).