

Mikrobiologische Umwandlungen nichtsteroider Strukturen, IX¹⁾

Mikrobiologische Hydroxylierung von Δ^8 -Tetrahydrocannabinol

Hans-J. Vidic, Georg-A. Hoyer, Klaus Kieslich* und Douwe Rosenberg

Forschungslaboratorien der Schering AG, Berlin/Bergkamen,
Müllerstr. 170–178, D-1000 Berlin 65

Eingegangen am 12. März 1976

Δ^8 -Tetrahydrocannabinol (5) wird durch Fermentationen mit *Pellicularia filamentosa* oder *Streptomyces lavendulae* gleichzeitig am Ringsystem und in der Seitenkette hydroxyliert. *P. filamentosa* ergibt die Produkte 7 β ,3'- (1) und 7 β ,4'-Dihydroxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol (3) sowie 8 β ,9 α -Dihydroxy- (2a) und 8 β ,9 α ,4'-Trihydroxy-6a,10a-trans-hexahydrocannabinol (4a), während *S. lavendulae* zu 7 α -Hydroxy- (6), 7 α ,2'- (7), 7 α ,3'- (8), 7 α ,4'-Dihydroxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol (9) und 4'-Hydroxy-7-oxo- Δ^8 -tetrahydrocannabinol (10) führt.

Microbiological Transformations of Nonsteroidal Structures, IX¹⁾

Microbiological Hydroxylation of Δ^8 -Tetrahydrocannabinol

Δ^8 -Tetrahydrocannabinol (5) is hydroxylated at the ring system and at the side chain by fermentations with *Pellicularia filamentosa* or *Streptomyces lavendulae*. *P. filamentosa* yields the compounds 7 β ,3'- (1) and 7 β ,4'-dihydroxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol (3) as well as 8 β ,9 α -dihydroxy- (2a) and 8 β ,9 α ,4'-trihydroxy-6a,10a-trans-hexahydrocannabinol (4a), whereas *S. lavendulae* leads to 7 α -hydroxy- (6), 7 α ,2'- (7), 7 α ,3'- (8), 7 α ,4'-dihydroxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol (9), and 4'-hydroxy-7-oxo- Δ^8 -tetrahydrocannabinol (10).

Δ^8 -Tetrahydrocannabinol (5)²⁾ besitzt stark psychotrope Wirkungen³⁾ bei unerwünscht langer Halbwertszeit im Körper des Probanden. Eine Verminderung dieses Nachteils sollten möglicherweise Metaboliten zeigen, welche als erste Stufen der Stoffwechseloxidation für einen beschleunigten Abbau vorbereitet sind. Derartige Metaboliten können noch die volle Aktivität der Ausgangssubstanz besitzen, wie das aus Leberhomogenaten⁴⁾ isolierte 11-Hydroxytetrahydrocannabinol^{5,6)} zeigt. Zusätzlich sind durch derartige Strukturabwandlungen Veränderungen des vielfältigen Wirkungsprofils dieser Stoffklasse denkbar.

In dieser Zielrichtung ersetzen wir wiederum den Organstoffwechsel durch enzymatische Umwandlungen mit Hilfe von Mikroorganismen^{7,8)}.

¹⁾ VIII Mitteil.: H. J. Vidic, G.-A. Hoyer und K. Kieslich, Chem. Ber. 109, 2657 (1976).

²⁾ T. Petržilka und C. Sikemeier, Helv. Chim. Acta 50, 1416 (1967).

³⁾ L. G. Cortwright, Aust. J. Pharm. 51 (Suppl. 87), 33 (1970).

⁴⁾ R. L. Foltz, A. F. Fentiman jr., E. G. Leighty, J. L. Walter, H. R. Drewes, W. E. Schwartz, T. F. Page jr. und E. B. Truitt jr., Science 168, 844 (1970).

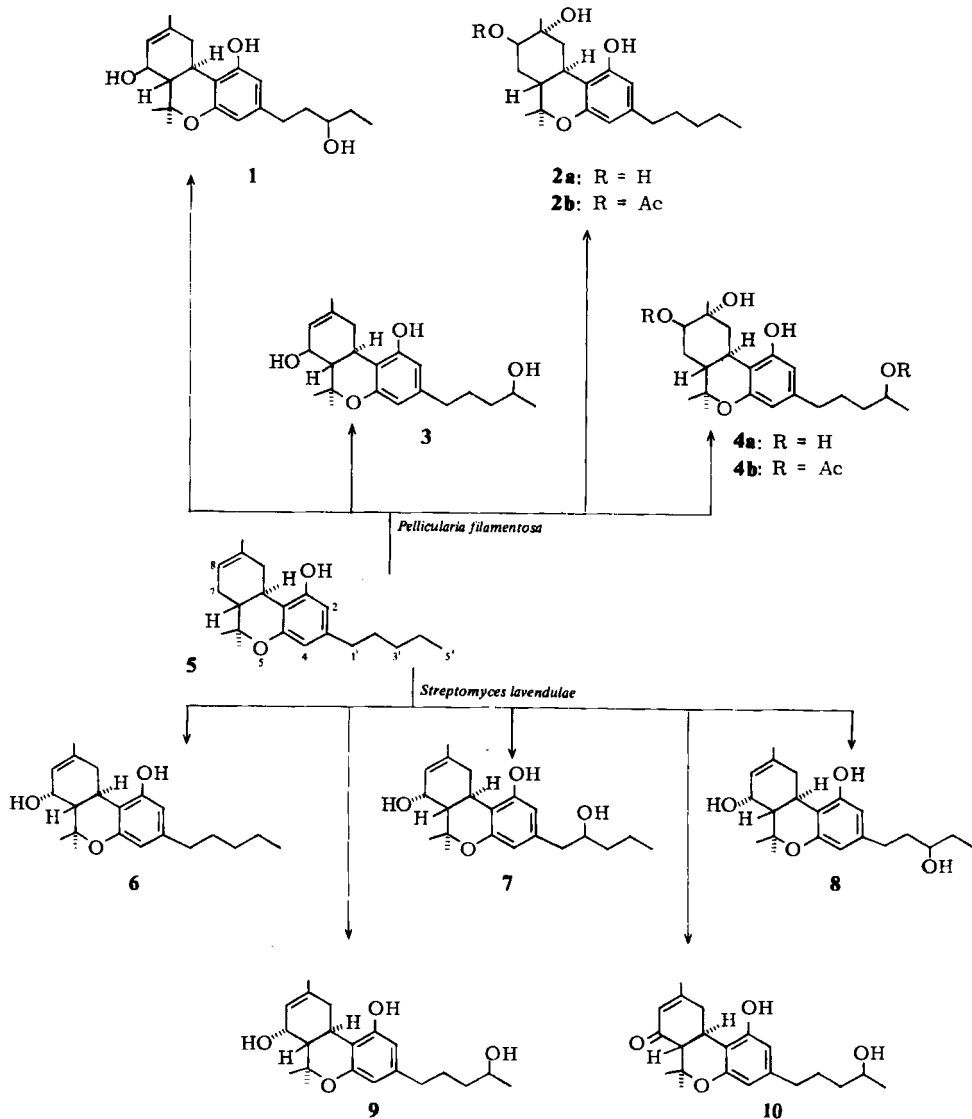
⁵⁾ L. Lemberger, S. D. Silberstein, J. Axelrod und I. J. Kopin, Science 170, 1320 (1970).

⁶⁾ R. Mechoulam, Science 168, 1159 (1970).

⁷⁾ Siehe vorhergehende Mitteilungen dieser Reihe.

⁸⁾ R. V. Smith und J. P. Rosazza, Biotechnol. Bioeng. XVII, 785 (1973).

180 unterschiedliche Bakterien-, Hefen- und überwiegend Streptomyceten- und Pilz-Spezies wurden als Schüttelkolbenkulturen untersucht. Viele der geprüften Stämme bauten das als Substrat zugesetzte Δ^8 -Tetrahydrocannabinol (5) mit unterschiedlicher Geschwindigkeit ab. Nur bei wenigen Fungi und Streptomyceten konnten geringe Mengen akkumulierter Metabolite in Dünnschichtchromatogrammen der Kulturbrühenextrakte beobachtet werden. Als bestgeeignete Stämme erschienen: *Pellicularia filamentosa* f. *sp. sasakii* (ATCC 13289) und *Streptomyces lavendulae* (ATCC 8664). Diese wurden ausgewählt für präparative Versuche in Zweiliter-Schüttelkolben und für die Isolierung und Konstitutionsaufklärung der Umwandlungsprodukte.



Pellicularia filamentosa greift Δ^8 -Tetrahydrocannabinol (**5**) in vier Positionen an, wobei stets neben einer Oxidation des Skeletts eine Hydroxylierung des Seitenketten-pentylrestes abläuft. Die Seitenkettenhydroxylierung erfolgt in 3'- oder 4'-Stellung. Das Ringgerüst wird in 7 β -Stellung angegriffen, was auch beim Stoffwechsel im menschlichen Körper⁹⁾ und beim in-vitro-Metabolismus von **5** mit einer Leber-Mikrosomenfraktion¹⁰⁾ beobachtet wurde. Alternativ bildet sich eine 8 β ,9 α -Dihydroxystruktur, die durch die *trans*-diaxiale Öffnung eines intermediären 8,9-Epoxids zum *trans*-Diol entstanden sein kann. Das 8 β ,9 α -Dihydroxy- (**2a**) bzw. 8 β ,9 α ,4'-Trihydroxy-6a,10a-*trans*-hexahydrocannabinol (**4a**) konnte nur als 8 β -Acetat **2b** bzw. 8 β ,4'-Diacetat **4b** isoliert werden.

Streptomyces lavendulae zeigt ohne Angriff der Δ^8 -Doppelbindung ein fast gleiches Umwandlungsbild. Anstelle der 7 β -Hydroxylierung wird jedoch hier die Hydroxylgruppe von der Rückseite des Skeletts in 7 α -Position eingeführt, die ebenfalls als Angriffsposition bei Stoffwechseluntersuchungen beschrieben wurde^{9, 10)}.

Der größere Anteil der 7 α -Monohydroxy-Verbindung **6** bei kurzen Fermentationszeiten deutet darauf hin, daß die Seitenkettenhydroxylierung in 2'-, 3'- und 4'-Stellung eine Folgereaktion ist. Hydroxylierungen der Pentylseitenkette sind bisher nur in 1'- und 3'-Stellung in der Säugetierleber¹¹⁾ und in 1'- und 2'-Stellung bei Metaboliten aus Kaninchenharn¹²⁾ beobachtet worden.

Außerdem konnte noch ein 4'-Hydroxy-7-oxo- Δ^8 -tetrahydrocannabinol (**10**) isoliert werden, das sehr wahrscheinlich aus **9** durch Oxidation der 7 α -Hydroxygruppe entstanden ist. Die entsprechenden Oxidationsprodukte von **6**, **7** und **8** konnten nicht gefunden werden.

Die Stellung der Hydroxygruppe am Skelett läßt sich leicht über die NMR-Spektren (s. Tab.) bestimmen. Wegen der starken paramagnetischen Verschiebungen der 6-Methylgruppen gegenüber den Signallagen bei der Ausgangsverbindung **5** kann die Hydroxygruppe bei **1**, **3**, **6**, **7**, **8** und **9** jeweils nur in 7-Position angeordnet sein. Die Konfiguration ergibt sich durch das Erscheinungsbild des zur Hydroxygruppe geminalen Protons. Bei **1** und **3** ist das Signal breit mit einer *trans*-diaxialen Kopplung von 10 Hz zum 6a-H. Deshalb steht die 7-Hydroxygruppe äquatorial, d. h. in 7 β -Stellung. Bei **6**, **7**, **8** und **9** ist das 7-H relativ schmal mit einer Halbwertsbreite von 11 Hz, was typisch für ein äquatorial-ständiges Proton ist. Deshalb steht die 7-Hydroxygruppe bei diesen vier Verbindungen axial, d. h. in 7 α -Stellung. Damit in Einklang ist die starke paramagnetische Verschiebung des 10 α -H, erkennbar durch sein charakteristisches Aufspaltungsmuster als doppeltes Triplett, bei **6**, **7**, **8** und **9**, die durch die 1,3-diaxiale Wechselwirkung mit der 7 α -Hydroxygruppe verursacht wird. Die gefundenen NMR-Daten für die Protonen in 7-Position und die charakteristischen Verschiebungen der 6-Methylgruppen stimmen gut mit Literaturwerten überein^{10, 13)}.

⁹⁾ H. C. Christensen, R. I. Freudenthal, J. T. Gidley, R. Rosenfeld, G. Boegli, L. Testino, D. R. Brine, C. G. Pitt und M. E. Wall, *Science* **172**, 165 (1971).

¹⁰⁾ O. Gurny, D. E. Maynard, R. G. Pitcher und R. W. Kierstead, *J. Amer. Chem. Soc.* **94**, 7928 (1972).

¹¹⁾ K. E. Fahrenholtz, *J. Org. Chem.* **37**, 2204 (1972).

¹²⁾ S. Burstein, J. Rosenfeld und T. Wittstruck, *Science* **176**, 422 (1972).

¹³⁾ R. Mechoulam, H. Varconi, Z. Ben-Zvi, H. Edery und Y. Grunfeld, *J. Amer. Chem. Soc.* **94**, 7930 (1972).

Bei **10** weist das Vorhandensein einer Carbonylbande bei 1660 cm^{-1} im IR auf das Vorliegen eines α,β -ungesättigten Ketons hin. Ein Vergleich der chemischen Verschiebungen von 8-H ($\delta = 5.84\text{ ppm}$) und 11-H ($\delta = 1.98\text{ ppm}$) mit Werten aus der Literatur ($\delta\text{ 8-H} = 5.83\text{ ppm}$; $\delta\text{ 11-H} = 1.98\text{ ppm}$)^{10,13} zeigt, daß die eingeführte Ketogruppe in 7-Stellung angeordnet ist. Auch die starke paramagnetische Verschiebung der 6 β -Methylgruppe auf $\delta = 1.68\text{ ppm}$ weist in diese Richtung.

Die Hydroxylierungsstellen der Pentylseitenkette wurden unter Bezug auf eine Publikation von *Binder et al.*¹⁴) bestimmt. Die Autoren haben in einer grundlegenden Arbeit die Zuordnungskriterien für Hydroxygruppen in verschiedenen Positionen der Pentylseitenkette mit NMR und MS untersucht. Bei den hier relevanten Hydroxylierungen in 2'-, 3'- und 4'-Stellung ergeben sich nach NMR die folgenden Kriterien:

2'-OH: Erscheinen der beiden 1'-H als AB-Teil eines ABX-Systems, des 2'-H als Multiplett bei $\delta = 3.80\text{ ppm}$ und der drei 5'-H als Multiplett bei $\delta = 0.94\text{ ppm}$.

3'-OH: Erscheinen der beiden 1'-H als Multiplett bei $\delta = 2.59\text{ ppm}$, des 3'-H als Pentett bei $\delta = 3.60\text{ ppm}$ und der drei 5'-H als klar ausgebildetes Triplet bei $\delta = 0.94\text{ ppm}$.

4'-OH: Erscheinen der beiden 1'-H als klares Triplet bei $\delta \approx 2.48\text{ ppm}$, des 4'-H als Multiplett bei $\delta = 3.66\text{ ppm}$ und der drei 5'-H als Dublett bei $\delta = 1.21\text{ ppm}$.

Die NMR-Daten in der Tabelle gestatten mit diesen Kriterien eindeutige Zuordnungen. Die MS-Daten der freien Hydroxycannabinole sind weniger aussagekräftig. Nach *Binder et al.*¹⁴) ist jedoch bei den 2'- und 3'-Hydroxyverbindungen das Fragment $M^+ - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHOH}$ bzw. $M^+ - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{C}(\text{OH})=\text{CH}_2$ jeweils der Basispeak, während es bei den 4'-Hydroxyderivaten nur schwach auftritt. Dieses Erscheinungsbild wird auch von unseren Verbindungen wiedergegeben.

Bei **2b** und **4b** zeigt die Signallage von 11-H im NMR bei $\delta = 1.25\text{ ppm}$ an, daß die Δ^8 -Doppelbindung verschwunden ist und an C-9 eine Sauerstofffunktion als Hydroxygruppe stehen muß. Da das 10 α -H durch 1,3-diaxiale Wechselwirkung stark paramagnetisch verschoben ist, muß die Hydroxygruppe in 9 α -Position angeordnet sein. Das zur Acetoxygruppe geminale Proton ist sehr schmal (Halbwertsbreite nur 6 Hz). Deshalb muß die Acetoxygruppe axial in 8 β -Position stehen.

Leider waren die Ausbeuten der Umwandlungsprodukte mit 1 bis 5% sehr gering. Versuche zur Optimierung durch Änderung der Fermentationsbedingungen, Einsatz von Acylderivaten des Substrates, Zusatz von Inhibitoren und Untersuchungen in 15- oder 30-Liter-Jar-Fermentern blieben erfolglos.

Die geringen Mengen der isolierten Metabolite **1**, **3**, **6**, **7**, **8** und **9** reichten jedoch aus, durch Dehydratisierung mit *p*-Toluolsulfonsäure vier neue Dihydrocannabinole **11**, **12**, **13** und **14** herzustellen. Diese Verbindungen besitzen aber nicht wie angestrebt ein Diensystem im Terpenring, sondern $\Delta^{7,9(11)}$ -Strukturen, die formal durch 1,4-Wasserabspaltung aus den Allylalkoholen entstanden sind. Die Wasserabspaltung von **1** und **8** führte zu **11** und die von **3** und **9** zu **12**, wie DC-analytisch gefunden wurde. Dies ist ein

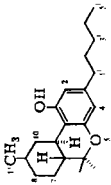
¹⁴) *M. Binder, S. Agurell, K. Leander und J.-E. Lindgren, Helv. Chim. Acta 57, 1626 (1974).*

¹⁵) *J. W. Wildes, N. H. Martin, C. G. Pitt und M. E. Wall, J. Org. Chem. 36, 721 (1971).*

¹⁶) *E. C. Taylor, K. Lenard und Y. Shvo, J. Amer. Chem. Soc. 88, 367 (1966).*

¹⁷) *K. E. Fahrenholtz, M. Luric und R. W. Kierstead, J. Amer. Chem. Soc. 89, 5934 (1967).*

¹⁸) *R. A. Archer, D. B. Boyd, P. V. Demarco, I. J. Tyminski und N. L. Allinger, J. Amer. Chem. Soc. 92, 5200 (1970).*

Tab.: NMR-Daten von Hexahydrocannabininderivaten^{a)}

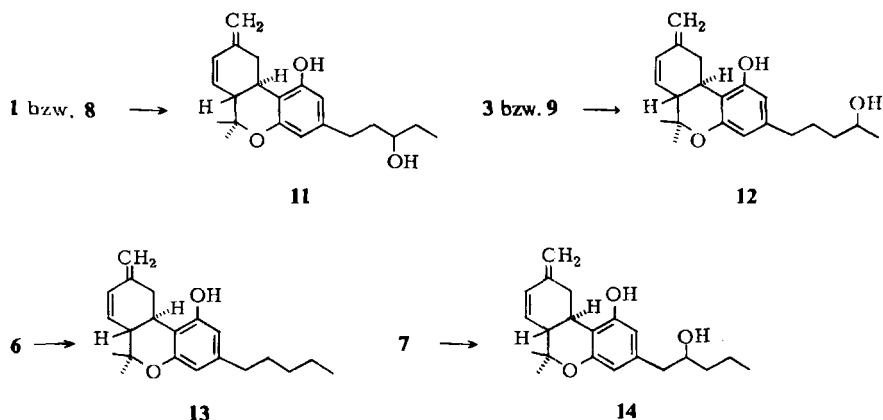
Verb.	Struktur	$\delta_{2\text{-H}}$	$\delta_{6\alpha\text{-CH}_3}$	$\delta_{6\beta\text{-CH}_3}$	$\delta_{7\text{-H}}$	$\delta_{8\text{-H}}$	$\delta_{10\alpha\text{-H}}$	$\delta_{10\alpha\alpha\text{-H}}$	$\delta_{11\text{-H}}$	$\delta_{1\text{-H}}$	$\delta_{2'\text{-H}}$	$\delta_{3'\text{-H}}$	$\delta_{4'\text{-H}}$	$\delta_{5\text{-H}}$	δ_{OCOCH_3}
1	$\Delta^8\text{-7}\beta,3\text{-di-OH}$	6.12 d (2)	1.17 s	1.62 s	4.12 dm (10; 8)	5.33 m (6)	3.24 dd (^{1/2})	1.74 s	2.58 m (18)	2.45 t (7)	3.56 p (6)	0.94 t (7)	0.88 m	2.04 s	
2b	8 β -OAc-9 α -OH	6.16 d (2)	1.05 s	1.32 s	4.90 m (6)	4.90 m (6)	3.24 dd (^{1/2})	2.93 m (26)	1.25 s (7)	2.47 t (7)	3.82 ^{ms} (6)	1.20 d (6)	4.94 m (20)	2.04 s	
3	$\Delta^8\text{-7}\beta,4\text{-di-OH}$	6.09 d (2)	1.17 s	1.62 s	4.12 dm (10; 8)	5.33 m (6)	3.24 dd (^{1/2})	2.93 m (26)	1.24 s (7)	2.44 t (7)	2.42 t (7)	1.20 d (6)	0.88 m	2.04 s	
4b	8 $\beta,4\text{-di-OAc}$ -9 α -OH	6.16 d (2)	1.04 s	1.30 s	4.89 m (6)	4.89 m (6)	3.19 dd (^{1/2})	2.69 dt (11)	1.70 s (7)	2.45 t (7)	2.45 t (7)	1.20 d (6)	0.88 m	2.04 s	
5 ^{b)}	Δ^8	6.06 d (2)	1.10 s	1.38 s	4.30 m (11)	5.40 m (10)	3.26 dd (^{1/2})	3.02 dt (11)	1.75 s (7)	2.45 t (7)	2.45 t (7)	1.20 d (6)	0.88 m	2.04 s	
6	$\Delta^8\text{-7}\alpha\text{-OH}$	6.10 d (2)	1.52 s	1.32 s	4.30 m (11)	5.63 m (10)	3.26 dd (^{1/2})	3.02 dt (11)	1.75 s (7)	2.45 t (7)	2.45 t (7)	1.20 d (6)	0.88 m	2.04 s	
7	$\Delta^8\text{-7}\alpha,2\text{-di-OH}$	6.19 d (2)	1.52 s	1.30 s	4.30 m (11)	5.63 m (10)	3.28 dd (^{1/2})	3.02 dt (11)	1.74 s (7)	2.45 t (7)	3.80 m (18)	1.20 d (6)	0.88 m	2.04 s	
8	$\Delta^8\text{-7}\alpha,3\text{-di-OH}$	6.14 d (2)	1.51 s	1.30 s	4.31 m (11)	5.63 m (10)	3.25 dd (^{1/2})	3.02 dt (11)	1.74 s (7)	2.58 m (18)	3.56 p (6)	0.94 t (7)	0.88 m	2.04 s	
9	$\Delta^8\text{-7}\alpha,4\text{-di-OH}$	6.13 d (2)	1.52 s	1.31 s	4.31 m (11)	5.62 m (10)	3.28 dd (^{1/2})	3.02 dt (11)	1.70 s (7)	2.48 t (7)	3.82 ^{ms} (6)	1.19 d (6)	0.88 m	2.04 s	
10	$\Delta^8\text{-7=O-4-OH}$	6.12 d (2)	1.22 s	1.68 s	5.84 m (5)	5.84 m (5)	3.94 dm (16; 5)	1.98 s (11)	1.98 s (7)	2.49 t (7)	3.56 p (6)	1.19 d (6)	0.88 m	2.04 s	
11	$\Delta^7,9(11),3\text{-OH}$	6.12 d (2)	1.08 s	1.48 s	5.74 dm (10; 4)	6.21 dd (10; 3)	3.95 dm (16; 5)	4.90 m (6)	4.90 m (6)	2.58 m (18)	3.80 m (18)	1.18 d (6)	0.88 m	2.04 s	
12	$\Delta^7,9(11),4\text{-OH}$	6.06 d (2)	1.08 s	1.48 s	5.73 dm (10; 4)	6.17 dd (10; 3)	3.95 dm (16; 5)	4.89 m (6)	4.89 m (6)	2.45 t (7)	3.80 m (18)	1.18 d (6)	0.88 m	2.04 s	
13	$\Delta^7,9(11)$	6.06 d (2)	1.08 s	1.48 s	5.74 dm (10; 4)	6.20 dd (10; 3)	3.97 dm (16; 5)	4.90 m (6)	4.90 m (6)	2.44 t (7)	3.80 m (18)	1.18 d (6)	0.88 m	2.04 s	
14	$\Delta^7,9(11),2\text{-OH}$	6.14 d (2)	1.08 s	1.48 s	5.75 dm (10; 4)	6.21 dd (10; 3)	3.94 dm (16; 5)	4.90 m (6)	4.90 m (6)	2.45 dt (14; 4)	3.80 m (18)	1.18 d (6)	0.88 m	2.04 s	

^{a)} Chemische Verschiebungen δ in ppm in Deuteriochloroform mit Tetramethylsilan als internem Standard; die eingeklammerten Zahlen sind die Kopplungskonstanten J in Hz; bei m bedeutet die Hz-Angabe die Halbwertsbreite $W_{1/2}$; p = Pentett; sex = Sextett.

^{b)} NMR-Daten siehe auch I.c. 16-18.

zusätzlicher Hinweis, daß bei **1** und **8** bzw. **3** und **9** die Hydroxygruppe jeweils am gleichen C-Atom nur in unterschiedlicher Konfiguration angeordnet ist.

Die exocyclische Methylengruppe erscheint bei $\delta = 4.90$ ppm als schmales 2-Protonenmultipllett, wie es für $\Delta^{9(11)}$ -Tetrahydrocannabinol ($\delta = \text{CH}_2 = 4.78$ ppm)¹⁵⁾ typisch ist. Außerdem ist noch eine *cis*-Doppelbindung mit 2 olefinischen Protonen und einer Kopplung von 10 Hz vorhanden, die nur zwischen C-7 und C-8 liegen kann.



Die pharmakologische Prüfung der hydroxylierten Δ^8 -Tetrahydrocannabinoide **1**, **3**, **6**, **7**, **8** und **9** sowie der Dehydratisierungsprodukte **11**, **12**, **13** und **14** zeigte teilweise eine verkürzte, jedoch auch stark verminderte Tetrahydrocannabinol-artige Wirkung.

Experimenteller Teil

Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-F₂₅₄-Platten (Fa. Merck AG, Darmstadt) verwendet. Es wurde in den Systemen Äther/Hexan (3 + 1) oder Chloroform/Methanol (9 + 1) (mit Kammersättigung) entwickelt. Zur Anfärbung wurde anfangs mit einem Reagenz aus 1 ml konz. Schwefelsäure und 9 ml 95proz. Äthanol angesprüht, 10 min bei 120°C getrocknet und im UV-Licht betrachtet. Später wurde eine Lösung von Echtblausalz in 2 N NaOH verwendet, wobei die Flecke als rote Azofarbstoffe erschienen. Für die Säulenchromatographien diente Kieselgel G. Die NMR-Spektren wurden im Varian HA-100 mit Tetramethylsilan als internem Standard, die IR-Spektren mit dem Perkin-Elmer 621 in getemperten KBr-Tabletten, wenn nicht anders angegeben, die UV-Spektren mit dem Cary 14 in Methanol und die Massenspektren im Varian MAT CH 7 bei 70 eV aufgenommen. Bei den MS-Daten werden nur die charakteristischen Fragment-Ionen mit einer Erklärung ihrer Entstehung angegeben. Die Basispeaks sind jeweils kursiv gedruckt.

Vorversuche zur Auswahl geeigneter Mikroorganismen

100-ml-Erlenmeyerkolben wurden mit 20 ml eines 30 min bei 120°C sterilisierten Mediums beschickt, mit 1.5 ml einer Abschwemmung einer Schrägagarkultur des entsprechenden Mikroorganismus mit 4 ml physiologischer NaCl-Lösung beimpft und 3–4 d bei 30°C auf einem Rotationschüttler (145 U/min) geschüttelt.

1 ml der vermehrten Kultur wurde unter sterilen Bedingungen in einen 100-ml-Erlenmeyerkolben, gefüllt mit 20 ml Medium, übergeführt und wie vorher geschüttelt. Nach 6 h wurde je 0.2 ml

sterilfiltrierte äthanolische Substratlösung (20 mg pro 1 ml Äthanol) zugesetzt und weitere 18 bzw. 42 h geschüttelt. Man extrahierte mit 4 ml Isobutylmethylketon/Hexan (3 + 1) und analysierte 10–20 µl der Extrakte dünn-schichtchromatographisch.

Nährlösungen:

Für Bakterien: 0.1 % Pepton, 0.2 % Cornsteep-liquor, 0.5 % Stärke-zucker, 0.5 % Hefe-extrakt; pH nach Sterilisation 7.0–7.2.

Für Streptomyceten: 1 % Stärke-zucker, 0.1 % Hefe-extrakt, 0.1 % Fleisch-extrakt, 0.2 % Tryptose; pH nach Sterilisation 7.2

Für Pilze: 3 % Stärke-zucker, 0.1 % KH_2PO_4 , 1 % Cornsteep-liquor, 0.05 % MgSO_4 , 0.2 % NaNO_3 , 0.002 % FeSO_4 , 0.2 % K_2HPO_4 , 0.05 % KCl .

Für Hefen: 5 % Stärke-zucker, 2 % Cornsteep-liquor.

Das Ergebnis der günstigsten Stämme war:

Pellicularia filamentosa f. sp. *sasaki* (ATCC 13289): 6–7 Umwandlungsprodukte, polarer als Ausgangsmaterial, jeweils 2–5%.

Streptomyces lavendulae (ATCC 8664): 7–8 Umwandlungsprodukte, polarer als Ausgangsmaterial, jeweils 2–5%.

Präparative Fermentationen in Zweiliter-Schüttelkolben

I. Mit *Pellicularia filamentosa* f. sp. *sasaki* (ATCC 13289)

Unter den bereits beschriebenen Bedingungen wurden in Zweiliter-Schüttelkolben Vorkulturen angezüchtet. Mit je 50 ml Vorkultur wurden Zweiliter-Schüttelkolben beimpft, die mit je 500 ml eines sterilen Mediums aus 3 % Stärke-zucker, 2 % Cornsteep-liquor, 0.5 % Pepton, 0.5 % Hefe-extrakt, 0.2 % NaNO_3 , 0.2 % KH_2PO_4 , 0.05 % MgSO_4 , 0.02 % FeSO_4 (pH 4.5) beschickt waren. Nach 3 h wurde pro Kolben 50 mg Δ^8 -Tetrahydrocannabinol (5) in 2.5 ml Äthanol zugesetzt. Die Umwandlung wurde durch DC-Analyse von Isobutylmethylketonextrakten von Intervallproben kontrolliert. Während bei 24 h Kontaktzeit ein Hauptmetabolit geringerer Polarität entstand, wandelte sich diese Verbindung bei längeren Kontaktzeiten (70 h) in ein polareres Produkt um. Nach Kontaktzeiten von 40 bis 70 h wurden die Kulturbrühen durch Filtration über Gaze vom Mycel befreit. Man extrahierte die Filtrate mit Isobutylmethylketon, engte die Extrakte i. Vak. ein und erhielt aus 40 Kolben 3.5 g Rohprodukt. Durch Chromatographie an 350 g Kieselgel mit einem Lösungsmittelgradienten von 5 Liter Hexan + 5 Liter Hexan/Aceton (1 + 1) und anschließend mit 2 Liter Hexan/Aceton (1 + 1) wurde in drei Hauptfraktionen getrennt:

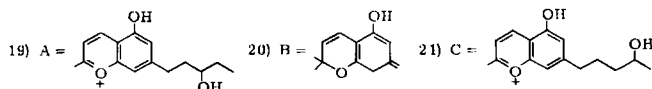
1. enthaltend unumgewandeltes Δ^8 -Tetrahydrocannabinol (5),
2. 500 mg Gemisch zweier Metabolite im Verhältnis 1 : 1,
3. 410 mg eines stark verunreinigten Produktes.

Die Fraktion 2. wurde durch präparative Dünnschicht auf 3 Platten mit Essigester als Laufmittel aufgetrennt. Man erhielt 35 mg ölige, aber einheitliche Substanz:

7 β ,3'-Dihydroxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol (1): UV: λ_{max} (ϵ_{max}) = 227 sh (9600), 276 (1530), 282 nm (1500). – IR: 3380 (OH), 1670 (C=C), 1620, 1580, 1515 cm^{-1} (ar C=C). – MS: m/e = 346 (M^+), 328 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$), 313 (328 – CH_3), 274 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{C}(\text{OH})=\text{CH}_2$), 256 (274 – H_2O), 247 (A^{19}), 214 (256 – $\text{CH}_2=\text{CHCH}_3$), 190 (B^{20}).

Nach 35 mg einer Mischfraktion 85 mg eines weiteren öligen und einheitlichen Produktes:

7 β ,4'-Dihydroxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol (3): UV: λ_{max} (ϵ_{max}) = 227 sh (9400), 275 (1370), 282 nm (1370). – IR: 3380 (OH), 1670 (C=C), 1620, 1580, 1510 cm^{-1} (ar C=C). – MS: m/e = 346



(M⁺), 328 (M⁺ - H₂O), 313 (328 - CH₃), 256 (328 - CH₃CH(OH)CH=CH₂), 247 (C²¹), 243, 214 (256 - CH₂=CHCH₃), 201 (243 - CH₂=CHCH₃).

Zusätzlich wurde eine polare Nebenzone abgetrennt und in Pyridin mit Acetanhydrid acetyliert. Nach anschließender selektiver Verseifung der phenolischen Acetatgruppe mit Kaliumcarbonat wurde das erhaltene Rohprodukt nochmals durch präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt zu geringen Mengen eines öligen Reinproduktes:

β-Acetoxy-9 α -hydroxy-6a,10 α -trans-hexahydrocannabinol (**2b**): IR: 3450 (OH), 1745, 1720 (C=O), 1625, 1575, 1510 (ar C=C), 1260, 1235 (O-COCH₃), 1040, 1030, 1015 cm⁻¹ (C-OCOCH₃). - MS: *m/e* = 390 (M⁺), 372 (M⁺ - H₂O), 357 (M⁺ - H₂O - CH₃), 330 (M⁺ - CH₃CO₂H), 312 (M⁺ - H₂O - CH₃CO₂H), 297 (312 - CH₃), 256 (312 - CH₃CH₂-CH=CH₂), 231 (D²²), 214 (256 - CH₂=CHCH₃), 193 (E²³), 43 (CH₃C \equiv O⁺).

Die Fraktion 3. enthielt neben einem Hauptprodukt mehrere Verbindungen ähnlicher Polarität als Verunreinigungen. Das Rohprodukt wurde in Pyridin mit Acetanhydrid acetyliert und anschließend zur Reverseifung der phenolischen Acetatgruppe mit Kaliumcarbonat behandelt. (Anderenfalls tritt Hydrolyse auf der Kieselgelplatte auf.) Das Produkt wurde danach durch präparative Dünnschichtchromatographie zu einem einheitlichen Öl gereinigt.

β,4'-Diacetoxy-9 α -hydroxy-6a,10 α -trans-hexahydrocannabinol (**4b**): IR: 3450(OH), 1735 (C=O), 1620, 1575, 1510 (ar C=C), 1245 (O-COCH₃), 1040, 1025 cm⁻¹ (C-OCOCH₃). - MS: *m/e* = 448 (M⁺), 430 (M⁺ - H₂O), 415 (M⁺ - H₂O - CH₃), 388 (M⁺ - CH₃CO₂H), 370 (388 - H₂O), 355 (370 - CH₃), 310 (370 - CH₃CO₂H), 295 (355 - CH₃CO₂H), 289 (F²⁴), 285, 256 (370 - CH₃CH(OAc)CH=CH₂), 243 (285 - CH₂=CHCH₃), 229 (289 - CH₃CO₂H), 214 (256 - CH₂=CHCH₃), 43 (CH₃C \equiv O⁺).

II. Mit *Streptomyces lavendulae* (ATCC 8664)

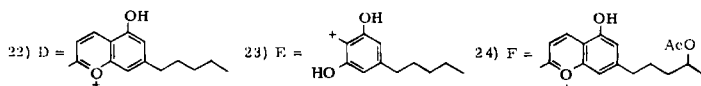
Mit je 50 ml Vorkultur wurden Zweiliter-Schüttelkolben beimpft, die mit 500 ml einer sterilen Nährlösung, bestehend aus 3% Stärkezucker, 0.1% Cornsteep-liquor, 0.1% Pepton und 0.1% Hefeextrakt (pH 7.5), gefüllt waren. Nach 17 h Anwuchszeit wurden jeweils 50 mg Δ^8 -Tetrahydrocannabinol (**5**) (in 2.5 ml Äthanol gelöst) zugesetzt. Nach 50 bis 70 h Kontaktzeit wurde, wie oben beschrieben, aufgearbeitet, wobei aus 40 Kolben 2.5 g Rohprodukt anfielen. Durch Säulenchromatographie an Kieselgel wurde in fünf Fraktionen getrennt: (1. = 260 mg, 2. = 152 mg, 3. = 112 mg, 4. = 176 mg und 5. = 93 mg), die durch präparative Dünnschichtchromatographie weiter aufgereinigt wurden. Man erhielt aus 1. 42 mg öliges 7 α -Hydroxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol (**6**): UV: λ_{\max} (ϵ_{\max}) = 228 sh (9720), 275 (1290), 282 nm (1310). - IR: 3400 (OH), 1670 (C=C), 1620, 1580, 1510 cm⁻¹ (ar C=C). - MS: *m/e* = 330 (M⁺), 312 (M⁺ - H₂O), 297 (312 - CH₃), 256 (312 - CH₃CH₂CH=CH₂), 231 (D²²), 214 (256 - CH₂=CHCH₃), 193 (E²³).

Aus Fraktion 2. wurden nach zweimaliger Reinigung 30 mg öliges **7** erhalten.

7 α ,2'-Dihydroxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol (**7**): UV: λ_{\max} (ϵ_{\max}) = 227 sh (9710), 275 (1250), 282 nm (1290). - IR: 3380 (OH), 1670 (C=C), 1620, 1580, 1510 cm⁻¹ (ar C=C). - MS: *m/e* = 346 (M⁺), 328 (M⁺ - H₂O), 313 (328 - CH₃), 274 (M⁺ - CH₃CH₂CH=CHOH), 256 (274 - H₂O), 247 (G²⁵), 214 (256 - CH₂=CHCH₃), 190 (B²⁰).

Fraktion 3. lieferte als Öl 25 mg **8**.

7 α ,3'-Dihydroxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol (**8**): UV: λ_{\max} (ϵ_{\max}) = 227 sh (9820), 276 (1420), 282 nm (1400). - IR: 3380 (OH), 1670 (C=C), 1620, 1580, 1515 cm⁻¹ (ar C=C). - MS: *m/e* = 346 (M⁺), 328 (M⁺ - H₂O), 313 (328 - CH₃), 274 (M⁺ - CH₃CH₂C(OH)=CH₂), 256 (274 - H₂O), 247 (A¹⁹), 214 (256 - CH₂=CHCH₃), 190 (B²⁰).



Fraktion 4. ergab ebenfalls eine ölige Substanz (33 mg):

7 α ,4'-Dihydroxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol (9): UV: λ_{\max} (ϵ_{\max}) = 227 sh (9470), 275 (1540), 282 nm (1520). – IR: 3380 (OH), 1670 (C=C), 1620, 1580, 1510 cm^{-1} (ar C=C). – MS: m/e = 346 (M^+), 328 ($M^+ - H_2O$), 313 ($328 - CH_3$), 256 ($328 - CH_3CH(OH)CH=CH_2$), 247 (C^{21}), 243, 214 ($256 - CH_2=CHCH_3$), 201 ($243 - CH_2=CHCH_3$).

Man erhielt aus Fraktion 5. 12 mg öliges Produkt:

4'-Hydroxy-7-oxo- Δ^8 -tetrahydrocannabinol (10): IR: 3430, 3240 (OH), 1660 (C=O), 1620, 1580, 1520 cm^{-1} (ar C=C). – MS: m/e = 344 (M^+), 329 ($M^+ - CH_3$), 326 ($M^+ - H_2O$), 301 ($M^+ - CH_3 - H_2O$), 272 ($M^+ - CH_3CH(OH)CH=CH_2$), 271 ($M^+ - CH_3CH(OH)CH_2CH_2$), 247 (C^{21}), 209 (H^{26}).

Wasserabspaltungen

1. Von 7 β ,3'-Dihydroxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol (1): 220 mg 1 wurden in 35 ml Benzol gelöst, unter Stickstoff mit einer Suspension von 95 mg *p*-Toluolsulfonsäure in 75 ml Benzol und mit 10 mg Hydrochinon versetzt und 40 min bei Raumtemp. gerührt. Nach Eingießen der Mischung in 100 ml Wasser und 15 min Rühren wurde mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt ergab nach dem Einengen ein Rohprodukt, das wiederum mit 10 mg Hydrochinon versetzt und durch präparative Dünnschichtchromatographie (System: Benzol/Essigester 2 + 1) gereinigt wurde. Man erhielt 75 mg öliges 11.

3'-Hydroxy- $\Delta^{7,9(11)}$ -dihydrocannabinol (11): UV: λ_{\max} (ϵ_{\max}) = 227 (18300), 276 (2370), 283 nm (2360). – IR (CHCl_3): 3590, 3350 (OH), 1670 (C=C), 1620, 1575, 1510 cm^{-1} (ar C=C). – MS: m/e = 328 (M^+), 313 ($M^+ - CH_3$), 256 ($M^+ - CH_3CH_2C(OH)=CH_2$), 243, 214 ($256 - CH_2=CHCH_3$), 201 ($243 - CH_2=CHCH_3$).

2. Von 7 α ,3'-Dihydroxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol (8): 22 mg 8 wurden nach gleichen Bedingungen behandelt. Man erhielt geringe Mengen eines öligen Produktes, das dünn-schichtchromatographisch identisch war mit dem vorstehend beschriebenen Dehydratisierungsprodukt 11.

3. Von 7 β ,4'-Dihydroxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol (3): 220 mg 3 wurden nach gleichen Bedingungen behandelt. Man erhielt 70 mg öliges 12.

4'-Hydroxy- $\Delta^{7,9(11)}$ -dihydrocannabinol (12): UV: λ_{\max} (ϵ_{\max}) = 227 (18300), 275 (3020), 282 nm (2900). – IR: 3360 (OH), 1670 (C=C), 1620, 1575, 1510 cm^{-1} (ar C=C). – MS: m/e = 328 (M^+), 313 ($M^+ - CH_3$), 256 ($M^+ - CH_3CH(OH)CH=CH_2$), 243, 214 ($256 - CH_2=CHCH_3$), 201 ($243 - CH_2=CHCH_3$).

4. Von 7 α ,4'-Dihydroxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol (9): 22 mg 9 wurden nach gleichen Bedingungen behandelt. Man erhielt geringe Mengen eines öligen Produktes, das dünn-schichtchromatographisch identisch war mit dem vorstehend beschriebenen Dehydratisierungsprodukt 12.

5. Von 7 α -Hydroxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol (6): 220 mg 6 wurden nach gleichen Bedingungen behandelt. Man erhielt 72 mg öliges 13.

$\Delta^{7,9(11)}$ -Dihydrocannabinol (13): UV: λ_{\max} (ϵ_{\max}) = 228 (21900), 276 (1910), 282 nm (1900). – IR (CHCl_3): 3590, 3330 (OH), 1670 (C=C), 1620, 1575, 1505 cm^{-1} (ar C=C).

6. Von 7 α ,2'-Dihydroxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol (7): 220 mg 7 wurden nach gleichen Bedingungen behandelt. Man erhielt 60 mg öliges 14.

2'-Hydroxy- $\Delta^{7,9(11)}$ -dihydrocannabinol (14): UV: λ_{\max} (ϵ_{\max}) = 227 (21400), 278 (2210), 284 nm (2200). – IR: 3400 (OH), 1670 (C=C), 1620, 1580, 1510 cm^{-1} (ar C=C).

