

SPECIALIA

The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed in the authors' brief reports. – Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces brèves communications. – Für die Kurzmitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – Ответственность за короткие сообщения несёт исключительно автор. – Solo los autores son responsables de las opiniones expresadas en estas comunicaciones breves.

Glucoacetyldigoxosid und Glucodigoxosid, neue genuine Glykoside aus den Blättern von *Digitalis schischkinii* (Ivan.) Werner

Glucoacetyldigoxoside and glucodigoxoside, new primary glycosides from the leaves of *Digitalis schischkinii* (Ivan.) Werner

Z. Imre und Ö. Ersoy¹

Faculty of Pharmacy, University of Istanbul, Beyazit-Istanbul (Turkey), 3 March 1978

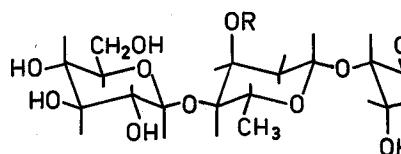
Summary. A new cardiotonic pentaglycoside with the structure glucoacetyldigoxoside (digoxigenin- β -D-glucosido-acetyltetradigitoxoside) was isolated from the leaves of *Digitalis schischkinii* (Ivan.) Werner. Its desacetyl product, glucodigoxoside has also been found in the fraction of most polar glycosides.

Bei der säulenchromatographischen Auftrennung der polaren Anteile des gereinigten Chloroform-Methanol (4:1)-Extraktes aus den unfermentierten Blättern von *Digitalis schischkinii* (Ivan.) an Silikagel, hatten wir 2 Digoxigenin-glykoside, C₁ und C₂ aufgefunden. C₁ war im Papierchromatogramm mit Chloroform-Tetrahydrofuran-Formamid (10:10:1)/Formamid (a) keinem der bekannten Glykoside zuzuordnen, und das C₂ konnte in den vorliegenden Mengenverhältnissen weder mit dem obigen System, noch mit dem Gemisch Äthylacetat-Athanol-Wasser (90:10:5)/Wasser (b) von Desacetyllanatosid C getrennt werden². Wir berichten hier über die Identifizierung dieser genuinen Glykoside.

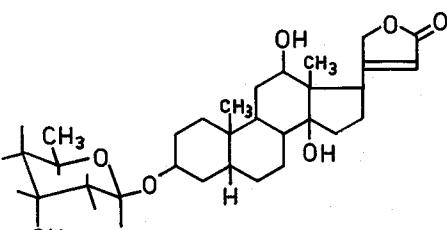
Die Isolierung von Glykosid C₁ erfolgte aus den Lanatosiden B und C und wenig Glucodigitoxigenintri- und bisdigoxoside enthaltenden Fraktionen der Silikagelsäule durch präparative DC auf Kieselgur G mit dem System a und SC an Silikagel mit Chloroform-Methanol, wobei nötigenfalls grössere Mengen von Lanatosid C vorher durch Kristallisieren aus Methanol/Wasser entfernt wurde. Die Substanz konnte nicht zur Kristallisation gebracht werden und wurde nach wiederholter Fällung aus methanolischer Lösung mit Äthylacetat als weisses, chromatographisch einheitliches amorphes Pulver erhalten. Durch Acetylierung mit Pyridin/Ac₂O konnte keine einheitliche Acetylverbindung gewonnen werden. Das Glykosid C₁ gibt starke Xanthylidol-Reaktion und verhält sich bei der Hydrolyse mit 0.05 N H₂SO₄ in 50% Methanol vollkommen identisch mit dem Lanatosid C. Als Geninanteil wurde Digoxigenin erhalten und in der Zuckerlösung wurden papierchromatographisch² Glucose, Digilanidobiose, Acetyl digilanidobiose,

Digitoxose und wenig Acetyl digitoxose nachgewiesen. Der Nachweis der Acetylgruppe erfolgte außerdem mit Hilfe von papierchromatographischer Analyse des aus C₁ hergestellten Hydroxamsäure-Fe(III)Komplexes der Acetyl-Gruppe³. Glucose-Bestimmung (Anthronmethode)⁴ ergibt 1.05 Mol Glucose. β -Glucosidasegemisch aus Schimmelpilzen (Präp. 33-63 Fa. Röhm, Darmstadt) greift das Glykosid schnell an und spaltet die Glucose ab. Das entstandene Desglucoprodukt liegt auf DC mit Xylool-Methyläthylketon (1:1)/Formamid (c) unter α -Acetyl digoxin ($R_f = 0.30$) und kristallisierte aus Methanol/Wasser, nach dem Abtrennen an Silikagelsäule mit Chloroform-Methanol (93:7), zu harten Drusen vereinigten Plättchen. Darin verhielt sich die Substanz analog den aus Lanatosiden erhaltenen Acetyl-Digitoxosiden und wird offensichtlich teilweise in β -Isomere umgewandelt. Die erhaltenen Kristalle waren laut DC (System c) ein Gemisch von ca. gleichen Mengen der α - und β -Acetylprodukte ($R_f \beta$ -Acetyl glykosid = 0.35), die wegen geringer Mengen nicht voneinander getrennt werden konnten.

Durch Behandlung mit schwachem Alkali wurde aus diesem Mischkristallat ein kristallines (Methanol) Glykosid erhalten, das in DC-System c und Chloroform/Formamid (d) den gleichen R_f -Wert wie Digoxosid zeigte ($R_f = 0.15$ bzw. 0.63). Seine Identität mit diesem früher von F. Kaiser aus *Digitalis lanata* Blättern isolierten Digoxigenintetradigitoxosid⁵ wurde durch Analyse und Vergleich mit einer authentischen Probe (Schmp., IR-Spektren) bewiesen. Das Glykosid C₁ ist demnach ein Glucosido-acetyl digoxosid. Chromatographischer Nachweis der Acetyl digilanidobiose nach schwach saurer Hydrolyse von C₁, sowie das Auftreten



I : R = COCH₃



II : R = H

von Desgluco- C_1 (=Acetyl digoxosid) in 2 Formen (α und β) beweisen die Bindung einer Acetylgruppe zu der vierten Digitoxoseeinheit, wofür auch die Ergebnisse der partiellen Hydrolyse⁶ von Acetyl digoxosid sprechen. Nach dieser Hydrolyse wurden neben dem Ausgangsglykosid (0,30; 0,90), Digoxigenin (0,28; 0,32), Digoxigenin-mono (0,22)- und bisdigoxoside (0,20; 0,39), sowie das Digoxin (0,18; 0,45) nachgewiesen (System c und d). Durch Behandlung mit schwachem Alkali wurde nur das Ausgangsglykosid gespalten und es entstand Digoxosid. Aus der molekularen Drehungsdifferenz von genuinen Glykosid und Acetyl digoxosid ist zu schliessen, dass die Glucose β -glykosidisch an das vierte Digitoxosemolekül gebunden ist. Aufgrund dieser Befunde muss dem neuen genuinen Glykosid C_1 die Struktur I zukommen. Glucoacetyl digoxosid ist in *Digitalis-schischkinti*-Blättern 0,04–0,05% enthalten. Sein Gehalt übertrifft meist den an Lanatosid E und D und stellt somit das vierte primäre Hauptglykosid der Droge dar.

Glykosid C_2 , das sich in den am stärksten polaren Glykoside enthaltenden Fraktionen der Silikagelsäule befindet, konnte durch weitere intensive Chromatographie an Cellulose mit System b und an Silikagel mit Äthylacetat + 2–20% Äthanol und mit Chloroform nicht vollkommen von Desacetyl lanatosid C getrennt werden, und die isolierte Substanz war noch stark verunreinigt. Das Glykosid liegt in den Chromatogrammen dicht über (System a) bzw. unter (System b) Desacetyl lanatosid C und zeigt den gleichen R_f -Wert mit desacetyliertem C_1 (=Glucodigoxosid). Identifizierung der Substanz als Glucodigoxosid II erfolgte über nach Fermentation erhaltenes sekundäres Glykosid. Aus der fermentierten Mischung über präparative DC auf Kie-

selgur G mit System d abgetrenntes Glykosid gibt mit dem des Digoxosids deckungsgleiches IR-Spektrum. Glucodigoxosid kommt in der Droge in Mengen von ca. 0,003% vor. Mit der Isolierung dieser Glucosido-tetradigitoxoside ist gezeigt worden, dass in der Pflanze nicht nur Mono-Bis- und Tridigitoxoside, sondern auch Tetradigitoxoside der Digitalisgenine mit endständiger Glucose verknüpft vorkommen.

Glucoacetyl digoxosid (Glykosid C_1): $C_{55}H_{86}O_{23} \cdot 3H_2O$ (1169.34). Ber.: C 56.49 H 7.93 Glucose 15.41; Gef.: C 56.30 H 7.20 Glucose 16.18, Schmp. 230–242 °C, $[\alpha]_D^{25} = +16.9^\circ$ ($c=0.213$ in Pyridin) $[M]_D = +197.6^\circ$, UV (Methanol) $\lambda_{max}^{218-219}$ nm ($\log \epsilon 4.15$). α/β -Acetyl digoxosid: $C_{49}H_{76}O_{18} \cdot 1H_2O$ (971.16) Ber.: C 60.60 H 8.10; Gef.: C 60.92 H 7.29, Schmp. 173–175 °C/268–273 °C, $[\alpha]_D^{25} = +27.1^\circ$ ($c=0.267$ in Pyridin), $[M]_D = +263.2^\circ$.

Digoxosid: $C_{47}H_{74}O_{17} \cdot 1H_2O$ (929.13) Ber.: C 60.76 H 8.25; Gef.: C 60.68 H 7.85, Schmp. 265–271 °C, $[\alpha]_D^{25} = +18.1^\circ$ ($c=0.418$ in Pyridin).

- 1 Wir danken Herrn Dr. F. Kaiser, Mannheim, für die Überlassung einer Probe von Digoxosid und Herrn Prof. Dr. H. Wagner, München, für die Durchführung der Elementaranalysen und optischer Drehungen.
- 2 Z. Imre und Ö. Ersoy, Arch. Pharm. Weinheim, 310, 142 (1977).
- 3 D. Henschler, Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 305, 34 (1956).
- 4 S. Mallov, M. McKibbin und J. S. Robb, J. biol. Chem. 201, 825 (1953).
- 5 F. Kaiser, E. Haack und H. Spingler, Naturwissenschaften 50, 668 (1963).
- 6 F. Kaiser, E. Haack und H. Spingler, Liebigs Ann. Chem. 603, 75 (1957).

Synthesis and antitumour activity of new daunorubicin and adriamycin analogues

F. Arcamone, L. Bernardi, B. Patelli, P. Giardino, A. Di Marco, A. M. Casazza, C. Soranzo and G. Pratesi

Farmitalia, Ricerca Chimica, via dei Gracchi 35, I-20146 Milano (Italy) and Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, via Venezia 1, I-20133 Milano (Italy), 28 March 1978

Summary. A new synthetic procedure for the preparation of daunorubicin and adriamycin analogues bearing different substituents on ring D, has been developed. The new compounds display outstanding efficacy against experimental tumours of mice.

Clinical usefulness of adriamycin (I) has prompted the study of new analogues of the antitumour anthracyclines with hopefully broader spectrum of activity and/or reduced cardiotoxicity^{1,2}. New derivatives modified in the C-9 side chain and in the sugar moiety have already excited pharmacological interest^{3–5}. However, it has recently been found that 4-demethoxydaunorubicin VIa and 4-demethoxy-adriamycin VIIa, obtained by total synthesis of the aglycone moiety, according to Wong's synthetic sequence⁶, display a considerable antitumour activity on experimental tumours of laboratory animals^{7,8}.

Synthetic approaches to the daunomycinone system have been developed in different laboratories after the original synthesis of racemic 4-demethoxy-7-O-methyldaunomycinone carried out by the Canadian authors⁶. These approaches include both Diels-Alder type reactions for the building of the tetracyclic chromophore^{9,10} as well as studies based on the Friedel and Crafts acylation of appropriate tetralines with phthalic acid derivatives^{11–13}. Racemic compounds were invariably obtained. Further developments have also been recorded in the glycosylation of the anthracyclines².

A simplified synthetic procedure for optically active Va has been developed and is reported here. This procedure is

based on the direct formation of 7-deoxy-4-demethoxydaunomycinone IIIa by condensation of the optically active tetralin II with phthalic anhydride, a reaction which is accompanied by an outstanding preservation of the chiral centre, notwithstanding the harsh conditions employed. In the present communication, we also report on the antitumour activity of a group of new daunorubicin and adriamycin analogues (VI-f and VIIb) carrying different substituents on the aromatic ring and synthesized according to this general procedure.

Chemistry. (S)-(-)-6-acetyl-1,4-dimethoxy-6-hydroxytetralin¹⁴ (II, 4 g, 16 mmoles), phthalic anhydride (4 g, 27 mmoles), NaCl (8 g) and AlCl₃ (40 g) were thoroughly mixed and transferred into a flask immersed in an oil bath at 180 °C. The resulting melt was stirred for 2 min and after cooling the solid was treated with an excess of a saturated aqueous solution of oxalic acid. The suspension was extracted with chloroform and the extract was evaporated to give a residue which was taken up in ether to give 4 g (11.3 mmoles) of IIIa, m.p. 228–230, $[\alpha]_D^{20} -87^\circ$ ($c=0.1$ CHCl₃) $\lambda_{max}^{460, 486, 520}$ nm (CHCl₃). This product was ketalized at C-13 with ethylene glycol (6 ml) in benzene (200 ml), in the presence of p-toluenesulphonic acid (0.2 g), for 5 h at reflux. The crude ketal was dissolved in a mixture