

120. Über die Partialsynthese von ^{14}C -Podophyllotoxin- β -glucosid und zur Darstellung von ^{14}C -Diazomethan.

6. Mitteilung über mitosehemmende Naturstoffe¹⁾

von A. Stoll, J. Rutschmann, A. von Wartburg und J. Renz.

(15. III. 56.)

Die wasserunlösliche Harzfraktion der Rhizome von Podophyllum-Arten (Fam. Berberidaceae), das sog. Podophyllin, hat neuerdings durch seine mitosehemmenden Eigenschaften Interesse gefunden. Der mengenmässig darin überwiegende Wirkstoff, das Podophyllotoxin, ist eine leicht kristallisierende, stickstofffreie Verbindung, die in ihrer Molekel einen sterisch besonders labilen Lactonring enthält. Ausser dem Podophyllotoxin konnten aus dem indischen *P. emodi* Wall. in kleinen Mengen noch das Demethyl-podophyllotoxin und aus dem nordamerikanischen *P. peltatum* L. noch zwei weitere, nahe verwandte Wirkstoffe, das α - und β -Peltatin, isoliert werden²⁾.

Vor kurzem gelang es uns, aus den Rhizomen der indischen und der amerikanischen Podophyllum-Droge mehrere einheitliche Glucoside zu isolieren, die sich von den aktiven Verbindungen der Harzfraktion ableiten, und die als Zuckerkomponente je ein Mol Glucose enthalten. Das Hauptglucosid dieser Drogen enthält Podophyllotoxin als Aglucon³⁾, während die den drei anderen Agluconen zugeordneten Glucoside mengenmässig zurücktreten. Mit Ausnahme des kristallisierten α -Peltatin- β -glucosids⁴⁾ sind diese Wirkstoffe, nämlich das Podophyllotoxin- β -glucosid, das 4'-Demethyl-podophyllotoxin- β -glucosid⁵⁾ und das β -Peltatin- β -glucosid⁶⁾, amorphe Verbindungen, die nicht leicht in einheitlicher Form zu gewinnen sind. Gegenüber den Agluconen zeichnen sich aber diese Glucoside durch eine gewisse Wasserlöslichkeit und durch geringere Toxizität aus.

Im Hinblick auf biologische Versuche interessierte uns besonders die Frage der Ausscheidung und Verteilung der Podophyllumglucoside im Organismus. Der chemische Nachweis dieser Verbindungen, insbesondere des am leichtesten zugänglichen Podophyllotoxin-

¹⁾ 5. Mitteilung, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1710 (1955).

²⁾ Vgl. die Zusammenfassung M. G. Kelly & J. L. Hartwell, J. Nat. Cancer Inst. **14**, 967 (1954).

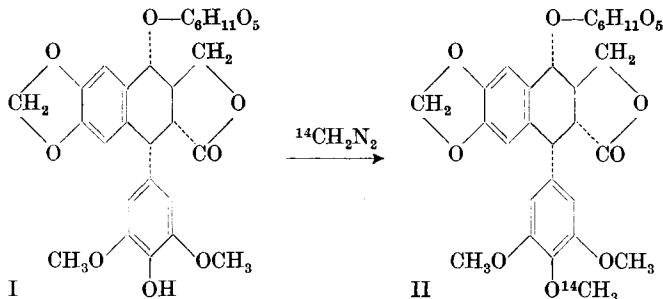
³⁾ A. Stoll, J. Renz & A. von Wartburg, J. Amer. chem. Soc. **76**, 3103 (1954); Helv. **37**, 1747 (1954).

⁴⁾ A. Stoll, A. von Wartburg & J. Renz, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1710 (1955).

⁵⁾ A. Stoll, A. von Wartburg, E. Angliker & J. Renz, J. Amer. chem. Soc. **76**, 5004 (1954).

⁶⁾ A. Stoll, A. von Wartburg, E. Angliker & J. Renz, J. Amer. chem. Soc. **76**, 6413 (1954).

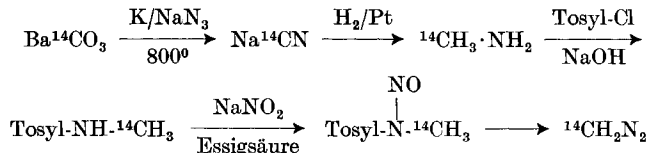
glucosids in biologischen Materialien, war aber infolge ihrer amorphen Natur, ihrer Labilität und infolge Fehlens einer geeigneten empfindlichen Farbreaktion unsicher und z. T. – besonders wenn es sich um sehr geringe Mengen handelte – auch nicht durchführbar. Wir erstrebten daher die Synthese einer mit ^{14}C markierten Verbindung. Dazu schien uns besonders die Methylierung von 4'-Demethyl-podophyllotoxin- β -glucosid (I) zum Podophyllotoxin- β -glucosid (II) geeignet, eine Reaktion, die wir bereits bei der Konstitutionsermittlung von I herangezogen hatten⁵⁾.



Bei Verwendung von ^{14}C -markiertem Diazomethan als Methylierungsmittel musste sich ein für biologische Versuche geeignet markiertes Podophyllotoxin- β -glucosid auf einfache Art gewinnen lassen.

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Diazomethan ist kürzlich das N-Nitroso-tosylmethylamin empfohlen worden⁷⁾. Wir konnten die ^{14}C -markierte Verbindung im Millimolmasstab auf die im experimentellen Teil ausführlich beschriebene Art in reiner kristallisierter Form herstellen. Die stabile Nitrosoverbindung lieferte bei der alkalischen Spaltung in ätherischer Lösung ^{14}C -Diazomethan mit einer Aktivitätsausbeute von 60–65% der Theorie, bezogen auf $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$.

Die Darstellung von ^{14}C -Diazomethan verläuft nach folgendem Schema:



In bezug auf Einfachheit und Gesamtausbeute dürfte diese Synthese von ^{14}C -Diazomethan den bisher veröffentlichten Verfahren^{8) 9)}, die vom leichter zersetzlichen Nitroso-methylharnstoff bzw.

⁷⁾ Th. J. de Boer & H. J. Backer, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **73**, 229 (1954).

⁸⁾ R. D. H. Heard, J. R. Jamieson & S. Solomon, J. Amer. chem. Soc. **73**, 4985 (1951); A. R. Jones & W. J. Skraba, Science **117**, 252 (1953).

⁹⁾ J. D. Cox & R. J. Warne, J. chem. Soc. **1951**, 1896.

von (Nitroso- β -methylamino-isobutyl)-methylketon ausgehen, vorzuziehen sein. Die Herstellung von ^{14}C -Methylamin erfolgte im wesentlichen nach bekannten Methoden⁸⁾ 10).

Für die Umsetzung des so hergestellten radioaktiven Diazomethans mit der freien phenolischen Hydroxylgruppe des 4'-Demethyl-podophyllotoxin- β -glucosids (I) wurden in Vorversuchen die besten Reaktionsbedingungen ermittelt, da die folgenden Anforderungen erfüllt sein mussten:

Es war, bezogen auf das ^{14}C -Diazomethan, eine möglichst hohe Ausbeute anzustreben. Die Methylierung des amorphen 4'-Demethylglucosids, die zu einem gleichfalls amorphen Reaktionsprodukt führt, sollte möglichst vollständig verlaufen, um so günstige Vorbedingungen für die Aufarbeitung und Reinigung des Methylierungsproduktes zu schaffen. Die Reaktionszeit war möglichst kurz zu halten, um der Umlagerung des biologisch aktiven Glucosids in die stereoisomere, biologisch inaktive Pikroverbindung vorzubeugen. Es zeigte sich, dass diese Bedingungen nicht ohne weiteres zu erfüllen waren, besonders da eine hohe Ausbeute in bezug auf beide Partner nicht mit einer zu kurzen Reaktionszeit in Einklang zu bringen war. Wir haben deshalb zuerst einige Modellversuche mit p-Brombenzoesäure und mit β -Naphthol ausgeführt, deren Ergebnisse in der folgenden Tab. 1 zusammengefasst sind:

Tabelle 1.

Methylierungen mit Diazomethan.

(Ausbeuten bezogen auf die Komponente im Überschuss).

	mMol	NTMA*) mMol	Lösungsmittel	Zeit	Farbe nach Reaktion	Aus- beute
p-Brom- benzoesäure	5	4	Äther	15 Min.	farblos	80%
	5	4	Dioxan	15 Min.	farblos	78%
	5	4	Methanol	15 Min.	farblos	16%
β -Naphthol	5	4	Äther	24 Std.	gelb	14%
	5	8	Äther	24 Std.	gelb	39%
	5	16	Äther	24 Std.	gelb	59%
	5	4	Äther + 10% Methanol	24 Std.	farblos	38%
	5	8	Äther + 10% Methanol	24 Std.	gelb	72%
	5	16	Äther + 10% Methanol	24 Std.	gelb	83%
	5	7,5	Dioxan + 10% Methanol	6,5 Std.	gelb	43%
	5	7,5	Dioxan + 10% Methanol	60 Std.	fast farblos	81%

*) Nitroso-tosyl-methylamin.

¹⁰⁾ F. L. J. Sixma, W. Hendriks, K. Helle, U. Hollstein & R. van Ling, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **73**, 161 (1954); V. E. Maimind, B. V. Tokarew & M. M. Schemjakin, Doklady Akad. Nauk. SSSR **81**, 195 (1951); Chem. Zbl. **1952**, 4289.

Wie aus der Tab. hervorgeht, reagieren Phenole erstaunlich langsam mit Diazomethan, besonders wenn im Reaktionsmedium kein Methanol vorhanden ist. In reinem Methanol scheint die Zersetzung des Diazomethans, selbst in Anwesenheit der sonst in Ätherlösung sehr rasch reagierenden Carbonsäure, der vorherrschende Vorgang zu sein.

Auf Grund der Modellversuche wurde die Methylierung des 4'-Demethyl-podophyllotoxin- β -glucosids in Dioxan-Methanol (9:1) mit einem kleinen Überschuss an ^{14}C -Diazomethan während 40 Std. durchgeführt. Das rohe Methylierungsprodukt wurde zur Reinigung in einer *Craig*-Apparatur zwischen Wasser und Essigester verteilt, wobei sich die noch unveränderte Demethylverbindung abtrennen liess (Fig. 1).

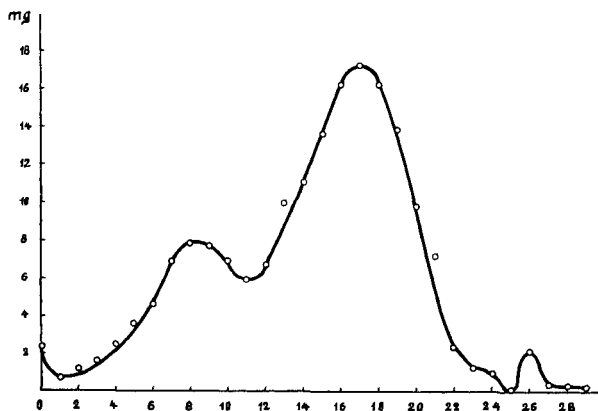


Fig. 1.

Craig-Verteilung des Methylierungsproduktes (29 Transfers).

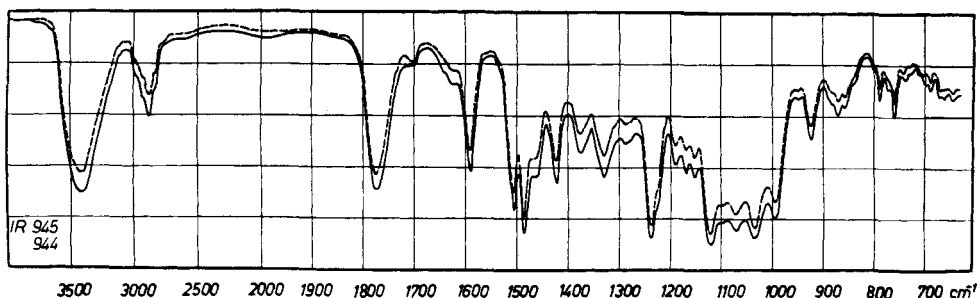


Fig. 2.

IR-Absorptionsspektren in KBr.

(1 mg Substanz auf 300 mg KBr, *Perkin-Elmer* Mod. 21). Gestrichelte Kurve: ^{14}C -Podophyllotoxin- β -glucosid. Ausgezogene Kurve: Podophyllotoxin- β -glucosid aus *P. emodi*.

Die Spitzenfraktionen 13–22 lieferten in ca. 47-proz. Ausbeute (bezogen auf die Aktivität) einheitliches ^{14}C -Podophyllotoxin- β -glu-

cosid, mit der spezifischen Aktivität von 0,942 mc/mM. Das markierte Glucosid schmolz bei 152–153° und besass in Methanol den optischen Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -74,8^\circ$, in guter Übereinstimmung mit dem natürlichen, aus *P. emodi* isolierten Podophyllotoxin- β -glucosid¹¹). Auch die Infrarotspektren des natürlichen und des partialsynthetisch hergestellten Glucosidpräparates sind identisch (Fig. 2).

Über Ergebnisse von Tierversuchen mit diesem markierten Podophyllotoxinglucosid soll später berichtet werden.

Experimenteller Teil.

Die ¹⁴C-Analysen sind mit einer für die nasse Verbrennung modifizierten Apparatur nach *Anderson et al.*¹²) und mittels Proportional-Gaszählrohren ausgeführt worden. Die hochaktiven Präparate wurden für die Aktivitätsbestimmungen mit der 300- bis 1000fachen Menge der entsprechenden inaktiven Verbindungen verdünnt. Die Mikroanalysen verdanken wir unserem mikroanalytischen Laboratorium (Dr. *W. Schöniger*) und die IR.-Spektren Dr. *M. Kohler* von unserem spektralanalytischen Laboratorium (Dr. *H. G. Leemann*).

1. Toluolsulfonyl-¹⁴C-methylamid. 197,5 mg Ba¹⁴CO₃ (1 mM, 5,17 mc) wurden zusammen mit 300 mg Natriumazid in ein einseitig zugeschmolzenes Supremaxrohr (20 × 250 mm) gebracht. Das senkrecht in einem elektrischen Ofen stehende Rohr wurde durch ein anfangs bis fast auf den Boden reichendes Glasröhrchen mit reinem Stickstoff gespült. Nach Einwerfen von 1,5 g möglichst sauberem Kalium erhitzte man unter weiterem Einleiten von Stickstoff in den oberen Teil des Rohres innerhalb 45 Min. auf 400° und darauf innerhalb 15 Min. auf 800°, welche Temperatur man noch 10 Min. einhielt. Nach dem Abkühlen schnitt man den von der Schmelze bedeckten Teil des Rohrs in ca. 2 cm lange Stücke, die in einen mit Tropftrichter und absteigendem Kühler versehenen Kolben von 300 cm³ Inhalt eingefüllt wurden. Nun fügte man 4 mM inaktives Kaliumcyanid und dann durch den Tropftrichter 100 cm³ n. Schwefelsäure zu und destillierte die Blausäure mit ca. 15 cm³ Wasser in die mit 6 cm³ n. Natronlauge beschickte, mit Eis gekühlte Vorlage. Die Aktivitätsausbeute war in Vorversuchen mit schwach aktivem Material zu 90–94% bestimmt worden, in Übereinstimmung mit der Literatur¹³).

Die so erhaltene Lösung von Na¹⁴CN (ca. 4,9 mM, 4,7 mc) wurde aus einem Tropftrichter durch leichten Unterdruck in ein mit 200 mg vorhydriertem Platin-Katalysator und 10 cm³ 2-n. Schwefelsäure beschicktes und mit Wasserstoff gefülltes Hydrierkölbchen von 100 cm³ Inhalt eingesogen. Die Lösung nahm beim Schütteln bei Zimmertemperatur und Atmosphärendruck innerhalb 5 Std. das berechnete Volumen Wasserstoff auf, worauf das entstandene Methylamin durch überschüssige Natronlauge freigesetzt und in Salzsäure abdestilliert wurde. Die saure Lösung hinterliess beim Eindampfen im Vakuum 320 mg kristallisiertes ¹⁴C-Methylamin-hydrochlorid (Ausbeute bei der Hydrierung ca. 96%).

Das Hydrochlorid löste man nun in einem mit Tropftrichter versehenen verschlossenen Kölbchen in 5 cm³ Wasser und 5 cm³ Dioxan, kühlte die Lösung auf ca. –10° und setzte 10 cm³ 2-n. Natronlauge zu. Zu der magnetisch gerührten Lösung tropfte man nun bei 15° innerhalb 15 Min. 1,5 g Toluolsulfochlorid in 5 cm³ Dioxan. Nach 30 Min. Rühren wurde auf dem siedenden Wasserbad kurz erwärmt und darauf die Lösung im Vakuum zur Trockne eingedampft. Den Rückstand löste man mit Hilfe von möglichst wenig 2-n. Natronlauge in Wasser, filtrierte die Lösung durch Hyflo klar und schüttelte nach An-

¹¹) *A. Stoll, J. Renz & A. von Wartburg, Helv. 27, 1747 (1954).*

¹²) *R. C. Anderson, Y. Delabarre & A. A. Bothner-By, Anal. Chemistry 23, 1298 (1952).*

¹³) *F. L. J. Sizma, H. Hendriks, K. Helle, U. Hollstein & R. van Ling, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 73, 161 (1954).*

säuern mit Schwefelsäure dreimal mit Äther aus. Nach dem Abdestillieren verblieben 775 mg Toluolsulfonyl-methylamid (= Tosyl-methylamid), das sind 88%, bezogen auf Methylamin-hydrochlorid.

Die spezifische Aktivität des Produktes betrug 0,942 mc/mM, die Aktivitätsausbeute, bezogen auf Ba¹⁴CO₃, 76,2%.

2. Nitroso-toluolsulfonyl-methylamid und Diazomethan. Der im folgenden beschriebene Versuch wurde zur Bestimmung der Diazomethanausbeute mit schwach aktivem Material durchgeführt.

750 mg Tosyl-methylamid wurden in 5 cm³ Eisessig gelöst und bei 0° unter magnetischem Rühren mit 1 cm³ 45-proz. Natriumnitritlösung tropfenweise versetzt. Nach 15 Min. verdünnte man die Lösung mit 100 cm³ Wasser, schüttelte dreimal mit Äther aus und wusch die Auszüge mit Wasser und Natriumhydrogencarbonat säurefrei. Nach dem Eindampfen erhielt man 840 mg hellgelbes, kristallisiertes Nitrosoprodukt. Dieses löste man in 25 cm³ Äther und fügte bei 0° eine Lösung von 200 mg Kaliumhydroxyd in 5 cm³ 90-proz. Alkohol zu. Nach 10 Min. wurde das freigesetzte Diazomethan abdestilliert und in einer ätherischen Lösung von 835 mg p-Nitro-benzoesäure aufgefangen. Der Äther wurde durch Schütteln mit Natriumcarbonat-Lösung von überschüssiger Säure befreit und eingedampft. Man erhielt durch Sublimation des Eindampfdruckstandes im Hochvakuum 590 mg reinen p-Nitro-benzoesäure-methylester vom Smp. 95–96° und der gleichen molaren Aktivität wie das Ausgangsmaterial. Dies entspricht einer Ausbeute von 80% der Theorie.

3. ¹⁴C-Podophyllotoxin-β-glucosid. 770 mg Tosyl-¹⁴C-methylamid (0,942 mc/mM) wurden, wie unter 2. beschrieben, nitrosiert und aus dem Nitrosoprodukt das ¹⁴C-Diazomethan freigesetzt. Dieses wurde in einer Lösung von 1,67 g reinem 4'-Demethylpodophyllotoxin-β-glucosid in 50 cm³ Dioxan und 5 cm³ Methanol aufgefangen (Quarzkolben)¹⁴⁾.

Die Lösung blieb 40 Std. bei Zimmertemperatur stehen und wurde dann im Vakuum zur Trockne eingedampft. Den Rückstand (1,80 g) verteilte man nach *Craig* in zwei gleichen Portionen zwischen je 40 cm³ Essigester und Wasser über 29 Stufen. Die vereinigten Fraktionen 13–22 (vgl. Fig. 1 im theoretischen Teil) aus beiden Verteilungen wurden konzentriert und nach wiederholter Zugabe von Aceton vollständig zur Trockne eingedampft. Anschliessend nahm man in trockenem Aceton auf, filtrierte die leicht trübe Lösung und dampfte das blanke Filtrat zum Schaum ein. Das reine methylierte Glucosid wurde auf diese Weise in wasserfreier Form als weisses amorphes Pulver gewonnen. Aus den Nebenfraktionen 9–12 und 23–29 liess sich nach erneuter Verteilung noch eine geringe Menge reinen Materials isolieren.

Zusammen erhielten wir nach dem Trocknen im HV. (15 Std. bei 95°) 1140 mg reines ¹⁴C-Podophyllotoxin-β-glucosid, das bei 152–153° (*Kofler*-Block) schmolz und in Methanol den optischen Drehwert $[\alpha]_D^{20} = -74,8^{\circ}$ (c = 0,5) besass.

C ₂₈ H ₃₂ O ₁₃	Ber. C 58,33	H 5,60	O 36,08	(3)CH ₃ O 16,15%
(576,536)	Gef. „ 58,36	„ 5,56	„ 35,86	„ 15,82%

Die IR.-Absorptionsspektren von natürlichem und ¹⁴C-Podophyllotoxin-β-glucosid sind im theoretischen Teil abgebildet (Fig. 2).

Die spezifische Aktivität betrug 0,942 mc/mM in Übereinstimmung mit der Aktivität des Tosyl-methylamids. Auf dieses bezogen berechnete sich die Ausbeute der Methylierungsstufe auf 47,5%.

Die Abwesenheit von radioaktiven Verunreinigungen wurde dadurch bewiesen, dass ein durch Verdünnung mit reinstem inaktivem Material erhaltenes Präparat bei einer weiteren *Craig*-Verteilung in der Spitzenfraktion keine Abnahme der spezifischen Aktivität zeigte.

¹⁴⁾ Vgl. die Modellversuche, die in Tab. 1 zusammengestellt sind. Dabei erwies sich das Gemisch von Dioxan-Methanol (9:1) am geeignetsten zur Methylierung einer phenolischen Hydroxylgruppe mit nur einem geringen Überschuss an Diazomethan.

Zusammenfassung.

4'-Demethyl-podophyllotoxin- β -glucosid wird mit radioaktivem Diazomethan in ^{14}C -Podophyllotoxin- β -glucosid übergeführt. Es wird über eine verbesserte Synthese von ^{14}C -Diazomethan berichtet.

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium
Sandoz, Basel

121. Zur Bedeutung der Metallkomplexbildung in der Biochemie.**Über das Komplexbildungsvermögen einer Ovalbuminfraktion**

von G. H. Wolff und S. Fallab.

(26. III. 56.)

Bei unseren Untersuchungen¹⁾ über das Cu^{2+} -Bindungsvermögen von Proteinen, Peptiden und Aminosäuren war das Verhalten von Ovalbumin²⁾ und Fibrinogen besonders aufgefallen. Die unerwarteten Messresultate liessen sich nur unter der Annahme deuten, dass diese Proteine als Komplexbildner eine gewisse Spezifität gegenüber Fe^{2+} besitzen.

Ein Vergleich der Komplexstabilitäten von zahlreichen einfachen Verbindungen der verschiedensten Strukturen mit M^{2+} -Ionen lässt erkennen, dass sie in erster Näherung unabhängig von der Ligandenstruktur sind³⁾. In der Reihe der 3-d-Elemente zeigt Cu^{2+} immer die stärkste Komplexbildungstendenz. Es folgen dann, mit abnehmender Elektronegativität⁴⁾, Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} und dann in der Reihe der Erdalkalien Mg^{2+} . Immerhin findet man Verbindungen, in denen der „Spreitungsfaktor“ $K_{\text{Cu}^{2+}}/K_{\text{Fe}^{2+}}$ erheblich von der Norm abweicht – z. B. in Dipyridyl und o-Phenanthrolin⁵⁾ –, woraus eine gewisse Fe^{2+} -Spezifität abzuleiten ist. Dennoch ist in jedem Fall $K_{\text{Cu}^{2+}} > K_{\text{Fe}^{2+}}$.

Wir hatten schon früher angedeutet⁶⁾, dass die strenge Gültigkeit dieser Regel für die ungehemmte Wirkungsweise von Metallfermenten eine Gefahr darstellen muss. Denn bei den im Serum stets vorhandenen Cu^{2+} wäre in diesem Fall die Erhaltung eines solchen Fermentes nur denkbar, wenn besondere sterische oder andere mor-

¹⁾ G. H. Wolff, S. Fallab & H. Erlenmeyer, Exp. 11, 440 (1955); G. H. Wolff & S. Fallab, Helv. 39, 837 (1956).

²⁾ Purissimum pulvis, Bohny & Co. AG., Basel.

³⁾ H. Irving & R. J. P. Williams, J. chem. Soc. 1953, 3192.

⁴⁾ D. Chapman, Nature 174, 887 (1954).

⁵⁾ P. G. Länger, S. Fallab & H. Erlenmeyer, Helv. 37, 1050 (1954).

⁶⁾ P. G. Länger, S. Fallab & H. Erlenmeyer, Helv. 38, 92 (1955).