

107. Über ein neues Glykosidierungsverfahren II. Glykoside des 4'-Demethylepipodophyllotoxins

23. Mitteilung über mitosehemmende Naturstoffe [1]

von **M. Kuhn** und **A. von Wartburg**

Pharmazeutisch-chemische Forschungslaboratorien
SANDOZ AG., Basel

(20. III. 69)

Summary. 4'-Demethylepipodophyllotoxin- β -D-glucopyranoside (VIII) and 4'-demethylepipodophyllotoxin- β -D-galactopyranoside (X) have been synthesized by reaction of the aglycones III and IV with the corresponding tetra-O-acetyl- β -D-hexopyranose in the presence of BF_3 -etherate. The suggested configurations at C-1 of the aglycone moiety in the new glycosides could be confirmed by NMR.-spectra.

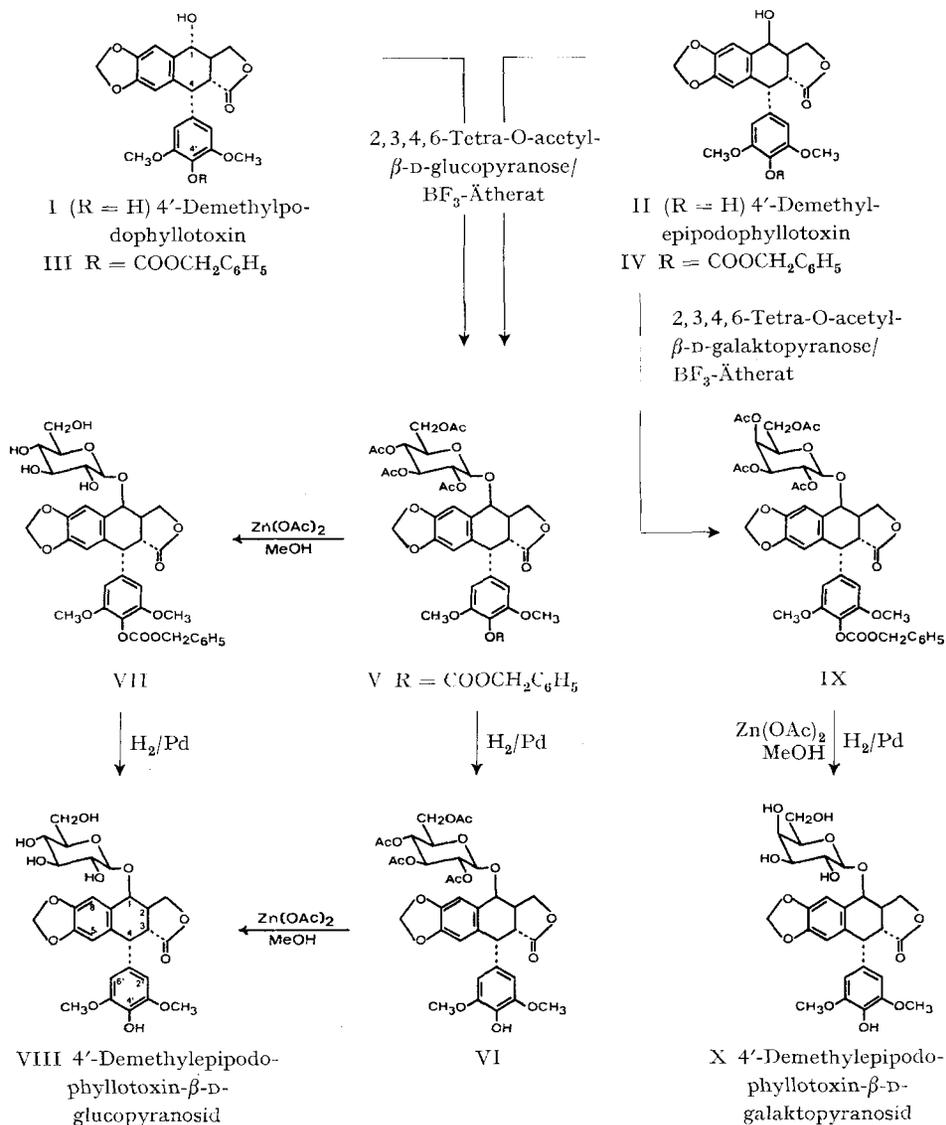
Wie wir kürzlich mitgeteilt haben, reagieren Podophyllotoxin (I, R = CH_3) und Epipodophyllotoxin (II, R = CH_3) mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranose unter dem Einfluss von BF_3 -Ätherat zu Tetra-O-acetyl-epipodophyllotoxin- β -D-glucosid (V, R = CH_3). Für den nachgewiesenen hoch stereoselektiven Verlauf dieser neuen Glykosidierungsreaktion bezüglich der glykosidischen Bindung und für die beim Podophyllotoxin beobachtete Inversion an C-1 wurde ein plausibler Reaktionsmechanismus abgeleitet [2].

Im folgenden berichten wir über die Anwendung des neuen Glykosidierungsverfahrens auf 4'-Demethyl-Aglykone vom Podophyllotoxin-Typ, sowie über NMR.-Befunde, die bei *Podophyllum*-Glykosiden eine eindeutige Zuordnung der Konfiguration an C-1 der Aglykonkomponente erlauben.

Zunächst setzten wir 4'-Demethylpodophyllotoxin (I) [3] und 4'-Demethylepipodophyllotoxin (II) [1] direkt mit Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranose um; dabei traten jedoch Nebenreaktionen auf, die zu einem schwer trennbaren Gemisch führten. Die störende phenolische Hydroxylfunktion wurde deshalb mit dem Benzyloxycarbonylrest blockiert; diese Schutzgruppe war unter den zur Glykosidierung benötigten Reaktionsbedingungen stabil und liess sich durch Hydrogenolyse leicht wieder entfernen. Umsatz von I bzw. II mit etwas mehr als der molaren Menge Benzyloxycarbonylchlorid in Gegenwart von Pyridin führte selektiv zu den Mono-acylderivaten III bzw. IV. Die 4'-Position der Schutzgruppe ging aus den NMR.-Spektren hervor: Die bei I und II in Dimethylsulfoxid auftretenden Protonensignale der phenolischen OH-Gruppen – scharfe Singulette bei 8,2–8,3 ppm – fehlen bei den Benzyloxycarbonylderivaten III und IV. Bei allen vier Aglykonverbindungen (I–IV) sind hingegen die dem Proton der sekundären OH-Gruppe an C-1 zuzuordnenden Dublette [4] im Bereich von 5–6 ppm ($J = 6$ –7 Hz) festzustellen.

4'-Benzyloxycarbonyl-4'-demethylepipodophyllotoxin (IV) reagierte mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranose und BF_3 -Ätherat bei -15° glatt und lieferte in hohen Ausbeuten das acetylierte Glucosid V mit weniger als 10% der entsprechenden α -Glucosidverbindung [2]. Durch Kristallisation des Rohproduktes wurde ein-

heitliches Tetra-O-acetyl-4'-benzyloxycarbonyl-4'-demethylepipodophyllotoxin- β -D-glucopyranosid (V) erhalten. V entstand auch bei der Glykosidierung von III als Hauptprodukt, wobei an C-1 der Aglykonkomponente die erwähnte Konfigurationsumkehr auftrat [2].



Die anschliessende Abspaltung der Schutzgruppen bei V konnte in beliebiger Reihenfolge durchgeführt werden. So lieferte die Hydrogenolyse von V mit Palladium quantitativ Tetra-O-acetyl-4'-demethylepipodophyllotoxin- β -D-glucopyranosid (VI). Anschliessende Entacetylierung von VI mittels Zinksalz-katalysierter Methanolyse

ergab das Glucosid VIII. Als Nebenprodukte traten der entsprechende, durch Öffnung des Lactonrings gebildete Hydroxysäure-methylester [5], sowie wenig Pikroverbindung auf. Beide Nebestoffe, die zusammen ca. 30% des Reaktionsproduktes ausmachen, wurden leicht bei der Kristallisation entfernt. Nach einer zweiten Variante unterwarfen wir das Tetraacetylglucosid V zuerst der Methanolyse in Gegenwart von Zinkacetat, wobei vollständige Entacetylierung eintrat und auch die Benzyloxycarbonylgruppe teilweise abgespalten wurde. Aus dem anfallenden Gemisch, zur Hauptsache VII und VIII, liess sich das Benzyloxycarbonyl-Derivat VII leicht abtrennen und dann zu VIII hydrogenolisieren.

Einheitliches, kristallisiertes 4'-Demethylepipodophyllotoxin- β -D-glucopyranosid (VIII) fällt in mehreren Modifikationen an, die bei 208–212°, 225–227° oder 232–236° schmelzen; $[\alpha]_D^{20} = -95^\circ$ (in Methanol). Die Struktur von VIII ist durch den früher diskutierten Reaktionsmechanismus der Glucosidierung [2] weitgehend gesichert. Eine weitere Bestätigung der postulierten 1-Epi-Konfiguration lässt sich aus dem Vergleich der NMR.-Spektren erhalten. Zur Erzielung gut strukturierter Signale wurden die Spektren in Dimethylsulfoxid bei erhöhter Temperatur (80–100°) aufgenommen (Tabelle).

Protonensignale in DMSO + D₂O bei 100°

Glucosid	δ in ppm des Protons an				
	C-8	C-5	C-2' C-6'		C-1
Podophyllotoxin- β -D-glucosid [5] [6]	7,38, s	6,50, s	6,37, s	5,97, s	5,02, d, $J_{1,2} = 8,5$ Hz
4'-Demethylpodophyllotoxin- β -D-glucosid [7]	7,35, s	6,47, s	6,33, s	5,94, s	5,00, d, $J_{1,2} = 8,5$ Hz
Epipodophyllotoxin- β -D-glucosid [2]	7,07, s	6,52, s	6,28, s	5,97, s	5,05, d, $J_{1,2} = 3$ Hz
4'-Demethylepipodophyllotoxin- β -D-glucosid (VIII)	7,02, s	6,48, s	6,23, s	5,95, s	5,02, d, $J_{1,2} = 3$ Hz

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, erscheint das Proton an C-1 im Aglykanteil der vier Glucoside als Dublett bei ca. 5 ppm. Bei den Podophyllotoxin-Derivaten wird die *trans*-Anordnung der Protonen an C-1 und C-2 durch die Kopplungskonstante $J_{1,2} = 8,5$ Hz deutlich gemacht; bei den 1-Epi-glucosiden beträgt $J_{1,2}$ lediglich 3 Hz und spricht eindeutig für die *cis*-Anordnung der diskutierten Protonen [8].

Aufschlussreich ist ferner die bei Podophyllotoxinglucosiden beobachtete Verschiebung des Signals von H C-8 um ca. 0,35 ppm nach tieferen Feldern. In diesen Verbindungen liegen der an C-1 pseudo-äquatorial angeordnete Sauerstoff der Glykosidbrücke und das Proton an C-8 des aromatischen Ringes annähernd in der gleichen Ebene, wodurch wahrscheinlich ein Entschirmungseffekt erzielt wird [9].

Wir haben schon in einer früheren Mitteilung darauf hingewiesen, dass sich das neue Glykosidierungsverfahren auch mit andern Hexosen ausführen lässt [2]: 4'-Benzyloxycarbonyl-4'-demethylepipodophyllotoxin (IV) reagierte mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galaktopyranose [10] unter dem Einfluss von BF₃-Ätherat zu Tetra-O-acetyl-4'-benzyloxycarbonyl-4'-demethylepipodophyllotoxin- β -D-galacto-

pyranosid (IX). Nach Abtrennung von ca. 5% α -Galaktosid wurde das Reaktionsprodukt zunächst durch Methanolyse entacetyliert und anschliessend der Benzyloxy-carbonyl-Rest hydrogenolytisch abgespalten. Aus dem anfallenden Rohprodukt konnte durch Kristallisation reines 4'-Demethylepipodophyllotoxin- β -D-galaktopyranosid (X) vom Smp. 270–272° erhalten werden; $[\alpha]_D^{20} = -145^\circ$ (in Pyridin).

Im Gegensatz zu den bisher geprüften *Podophyllum*-Glucosiden [11] besitzt das Galaktosid X praktisch keine cytostatische Aktivität mehr. Hingegen zeigte das Glucosid VIII eine signifikante Mitosehemmung, die durch geeignete Derivierung ganz beträchtlich verstärkt werden konnte. Über die Synthese und biologische Wirkung derartiger Präparate werden wir an anderer Stelle berichten.

Experimenteller Teil

Unter Mitarbeit von P. SCHÖPFLIN, W. HUBER und R. KUNCLER

Allgemeines. Die Smp. sind auf dem KOFLER-Block bestimmt und korrigiert. Dünnschichtchromatographien wurden auf Kieselgel-G-Platten mit 15 cm Laufstrecke des Fließmittels ausgeführt; Sichtbarmachung durch Besprühen mit einer Lösung von 0,2% Cer(IV)-sulfat in 50-proz. H₂SO₄ und Erwärmen auf 110–130° bis zum Erscheinen der Flecke. Die präparativen Chromatogramme erfolgten auf einem Kieselgel MERCK, Korngrösse 0,05–0,2 mm.

Die IR.-Spektren wurden auf einem PERKIN-ELMER-IR.-Spektrometer, Mod. 21 mit Gitter, aufgenommen; ν_{max} sind in cm⁻¹ angegeben.

Die NMR.-Spektren wurden auf einem VARIAN-Spektrographen, Mod. A-60, bei 60 MHz aufgenommen. Chemische Verschiebungen sind in ppm angegeben. Als interner Standard diente Tetramethylsilan mit $\delta_{TMS} = 0$ ppm. Kopplungskonstanten sind mit *J* bezeichnet und in Hz angegeben. *s* = Singulett, *d* = Dublett, *t* = Triplett, *q* = Quadruplett, *m* = Multiplett.

Abkürzungen: DC. = Dünnschichtchromatographie (-gramm), Flm. = Fließmittel, Chf = Chloroform, An = Aceton, DMSO = Dimethylsulfoxid, MeOH = Methanol, EtOH = Äthanol.

1. 4'-Benzyloxy-carbonyl-4'-demethylpodophyllotoxin (III). 15,0 g (37,5 mMol) 4'-Demethylpodophyllotoxin (I) wurden unter Erwärmen in 450 ml eines wasserfreien Gemisches von 1,2-Dichloräthan-Tetrahydrofuran-(1:1) gelöst, die Lösung bei 20° mit 6 ml (76 mMol) abs. Pyridin versetzt und auf –10 bis –12° abgekühlt. Unter Rühren und Feuchtigkeitsausschluss wurde nun innert 75 Min. 9,5 g Chlorameisensäure-benzylester (90-proz., 50 mMol) in 50 ml 1,2-Dichloräthan zutropft und noch weitere 30 Min. bei –10 bis –12° gerührt. Danach filtrierte man die ausgefallenen Kristalle (Pyridin-hydrochlorid) ab und dampfte das Filtrat im Vakuum auf ca. 200 ml ein. Nach dem Verdünnen mit 250 ml 1,2-Dichloräthan wusch man einmal mit 100 ml 1N HCl, dann dreimal mit je 200 ml Wasser, trocknete die organische Phase über Na₂SO₄ und dampfte im Vakuum ein. Den Rückstand (21,3 g weisser Schaum) chromatographierte man an der 20-fachen Menge Kieselgel. Chf-MeOH-(99:1) eluierte zuerst Nebenprodukte und danach reines III. Zweimalige Kristallisation aus MeOH lieferte 4'-Benzyloxy-carbonyl-4'-demethylpodophyllotoxin (III) in Form farbloser Nadeln vom Smp. 113–114°; $[\alpha]_D^{25} = -88,3^\circ$ (*c* = 0,515 in Chf) und –65,9° (*c* = 0,493 in An). – IR. (CH₂Cl₂): 3670, 3600 OH; 1775 (Schulter) γ -Lacton; 1768 O–COO–; 1600, 1510, 1502, 1482 arom. C=C. – NMR. (DMSO): 7,40 (5 H, *s*) C₆H₅-Gruppe; 7,13 (1 H, *s*) H–C(8); 6,51 (1 H, *s*) H–C(5); 6,43 (2 H, *s*) H–C(2'), H–C(6'); 5,98 (2 H, *s*) Methylendioxygruppe; 5,77 (1 H, *d*, *J* = 7 Hz) H der sek. OH-Gruppe¹⁾ (dieses Signal verschwindet bei Zusatz von D₂O); 5,23 (2 H, *s*) C₆H₅-CH₂–; 3,64 (6 H, *s*) 2 CH₃O-Gruppen; die Signale der H an C-1, C-4 und der CH₂-Gruppe des Lactonrings erscheinen als Multiplett im Bereich von 3,8–4,9 ppm.

C ₂₉ H ₂₆ O ₁₀	Ber.	C 65,2	H 4,9	O 29,9	2CH ₃ O 11,6%
(534,52)	Gef.	„ 65,5	„ 4,6	„ 29,8	„ 11,8%

2. 4'-Benzyloxy-carbonyl-4'-demethylepipodophyllotoxin (IV). Eine Suspension von 60 g (0,15 Mol) feinst gepulvertem 4'-Demethylepipodophyllotoxin (II) in 1000 ml abs. 1,2-Dichloräthan

¹⁾ Bei 4'-Demethylpodophyllotoxin (I) erzeugt das Proton der OH-Gruppe ein Signal bei 5,76 (*d*, *J* = 7 Hz), das H der phenolischen OH-Gruppe erscheint bei 8,23 (*s*).

versetzte man mit 19 ml (0,24 Mol) abs. Pyridin und tropfte unter Rühren und Feuchtigkeitsausschluss bei -8 bis -10° (Innentemperatur) eine Lösung von 34 g Chlorameisensäure-benzylester in 100 ml 1,2-Dichloräthan im Verlauf von 2,5 Std. zu. Man rührte noch 1 Std. und wusch dann die Lösung dreimal mit je 500 ml Wasser. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum auf 400 ml konzentriert. Zur Entfärbung filtrierte man durch 10 g Aluminiumoxid (WOELM, neutral, Aktivität 1) und wusch das Adsorbens mit 1,2-Dichloräthan nach. Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum eingedampft und der Rückstand im Hochvakuum bei $70-80^\circ$ von flüchtigen Anteilen befreit. Kristallisation des Rückstandes aus 50 ml An unter Zusatz von 100 ml Äther und danach zweimal aus MeOH ergab 57 g reines IV vom Doppelsmp. $117-119^\circ/202-205^\circ$ das noch Kristall-Methanol enthält. Zweimalige Kristallisation aus An-Äther lieferte reines 4'-Benzoyloxycarbonyl-4'-demethylepipodophyllotoxin (IV) vom Smp. $205-207^\circ$; $[\alpha]_D^{25} = -44,5^\circ$ ($c = 0,506$ in Chf). - IR. (CH_2Cl_2): 3600 OH; 1775 γ -Lacton (Schulter); 1768 $-\text{O}-\text{COO}$ -Gruppe; 1602, 1510 (Schulter), 1502, 1485 arom. C=C. - NMR. (DMSO): 7,44 (5 H, s) C_6H_5^- ; 7,02 (1 H, s) H-C(8); 6,59 (1 H, s) H-C(5); 6,40 (2 H, s) H-C(2'), H-(6'); 6,03 (2 H, breites s) Methylendioxygruppe; 5,50 (1 H, d, $J = 6$ Hz) sek. OH-Gruppe²⁾ (bei Zusatz von D_2O verschwindet dieses Dublett); 5,28 (2 H, s) $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2^-$; 4,75-4,9 (1 H, m) H-C(1) (bei Zusatz von D_2O wird das Multiplett zum Dublett bei 4,85 mit $J_{1,2} = 3$ Hz); 4,63 (1 H, d, $J_{3,4} = 5$ Hz) H-C(4); 3,67 (6 H, s) 2 CH_3O -Gruppen.

$\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$	Ber.	C 65,2	H 4,9	O 29,9	2 CH_3O 11,6%
(534,52)	Gef.	,, 65,0	,, 4,9	,, 29,9	,, 11,9%

3. *Tetra-O-acetyl-4'-benzyloxycarbonyl-4'-demethylepipodophyllotoxin- β -D-glucopyranosid* (V). - a) *Durch Glykosidierung von IV mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranose und BF_3 -Ätherat.* 267 g (0,5 Mol) 4'-Benzoyloxycarbonyl-4'-demethylepipodophyllotoxin (IV) wurden unter Erwärmen in 700 ml trockenem 1,2-Dichloräthan gelöst. Bei $+15^\circ$ gab man anschliessend unter Rühren 260 g (0,75 Mol) fein gepulverte 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranose zu. Sobald sich der grösste Teil des Zuckers gelöst hatte, kühlte man rasch auf -15° und tropfte dann unter starkem Rühren innert 15 Min. 175 ml (1,4 Mol) Bortrifluorid-Ätherat zu. Nach 30 Min. versetzte man langsam mit einer Lösung von 175 ml abs. Pyridin in 850 ml 1,2-Dichloräthan, wobei die Innentemperatur auf $0 \pm 5^\circ$ gehalten wurde. Dann verdünnte man mit 1500 ml 1,2-Dichloräthan und wusch viermal mit je 1000 ml Wasser. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Den im Hochvakuum bei 70° getrockneten Rückstand nahm man in 1250 ml EtOH unter Erwärmen auf und liess die warme Lösung unter kräftigem Rühren und Eiskühlung in 3750 ml Wasser laufen. Die entstandene Suspension wurde nach 1 Std. Rühren abgentscht und der Niederschlag mit 1000 ml EtOH-Wasser-(1:3) nachgewaschen. Das im Hochvakuum bei 75° getrocknete Glucosidierungsprodukt nahm man in 3000 ml heissem MeOH auf, filtrierte von wenig Unlöslichem ab und dampfte das Filtrat im Vakuum ein. Nach Wiederholung der Fällungsoperation aus EtOH-Wasser wurden 429 g rohes V, $[\alpha]_D^{21} = -41,8^\circ$ ($c = 1,550$ in Chf) erhalten. Im DC. (Flm. Benzol-Pyridin-9:1) zeigte dieses Produkt einen Hauptfleck (V); das entsprechende α -Glucosid läuft etwas rascher und ist nur in geringer Menge (ca. 5%) vorhanden. Zweimalige Kristallisation aus Benzol-Cyclohexan lieferte 341 g reines Tetra-O-acetyl-4'-benzyloxycarbonyl-4'-demethylepipodophyllotoxin- β -D-glucopyranosid (V) in Form farbloser Nadeln vom Smp. 172 bis 175° ; $[\alpha]_D^{22} = -50,1^\circ$ ($c = 1,984$ in Chf). - IR. (CH_2Cl_2): 1770 (Schulter) γ -Lacton; 1760 CH_3CO - und OCO -Gruppe; 1602, 1510, 1505, 1485 arom. C=C. - NMR. (CDCl_3): 7,45 (5 H, s) C_6H_5^- ; 6,92 (1 H, s) H-C(8); 6,61 (1 H, s) H-C(5); 6,34 (2 H, s) H-C(2'), H-C(6'); 6,04 (2 H, s) Methylendioxygruppe; 5,30 (2 H, s) $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{O}$; 3,71 (6 H, s) 2 CH_3O -Gruppen; 2,17 (3 H, s), 2,05 (3 H, s), 2,02 (3 H, s), 1,90 (3 H, s) 4 CH_3CO -Gruppen.

$\text{C}_{43}\text{H}_{44}\text{O}_{19}$	Ber.	C 59,7	H 5,1	O 35,2	2 CH_3O 7,2%
(864,81)	Gef.	,, 59,6	,, 5,2	,, 35,1	,, 7,2%

b) *Durch Glykosidierung von III mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranose und BF_3 -Ätherat.* 10,7 g (20 mMol) 4'-Benzoyloxycarbonyl-4'-demethylepipodophyllotoxin (III) wurden unter Erwärmen in 30 ml 1,2-Dichloräthan gelöst und bei $+15^\circ$ mit 14,0 g (40 mMol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranose versetzt. Man rührte 5 Min. unter Feuchtigkeitsausschluss, kühlte auf -15° und tropfte zur viskosen Lösung innert 5 Min. 7 ml (56 mMol) BF_3 -Ätherat. Nach 1-stündi-

²⁾ Beim 4'-Demethylepipodophyllotoxin (II) gibt das Proton der OH-Gruppe ein Signal bei 5,43 (d , $J = 6$ Hz), das H der phenolischen OH-Gruppe erscheint bei 8,25 (s) [1].

gem Rühren bei -15° gab man eine Lösung von 7 ml abs. Pyridin in 20 ml 1,2-Dichloräthan und danach 100 ml 1,2-Dichloräthan zu. Dann wurde die Lösung fünfmal mit je 50 ml Wasser ausgewaschen, die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Den Rückstand, gelöst in 50 ml warmem EtOH, tropfte man zu 150 ml kaltem Wasser und rührte bis sich ein körniger Niederschlag bildete. Nach dem Abfiltrieren und Nachwaschen mit EtOH-Wasser-(1:4) erhielt man 17,5 g rohes V. Mehrmalige Kristallisation aus Benzol-Cyclohexan lieferte reines Tetra-O-acetyl-4'-benzyloxycarbonyl-4'-demethylepipodophyllotoxin- β -D-glucopyranosid (V).

4. *Tetra-O-acetyl-4'-demethylepipodophyllotoxin- β -D-glucopyranosid (VI)*. Eine Suspension von 3,0 g Palladium-Kohle (10% Pd) in 125 ml EtOH versetzte man mit einer Lösung von 28,9 g (30 mMol) V in 125 ml An und 1 ml Eisessig und hydrierte bei 20° unter Atmosphärendruck. Nach beendeter Abspaltung der Benzyloxycarbonylgruppe (Produktekontrolle im DC. mit dem Flm. Chf-MeOH-99:1) wurde der Katalysator abfiltriert und mit 30 ml An nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate konzentrierte man im Vakuum auf EtOH, wobei 23,4 g VI auskristallisierten. Zur Analyse wurde aus An-EtOH umkristallisiert. Reines Tetra-O-acetyl-4'-demethylepipodophyllotoxin- β -D-glucopyranosid (VI) zeigte den Smp. $228\text{--}230^{\circ}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -63,8^{\circ}$ ($c = 1,019$ in Chf). – IR. (CH_2Cl_2): 3530 OH; 1775 (Schulter) γ -Lacton; 1755 CH_3CO ; 1620, 1518, 1503, 1485 arom. C=C. – NMR. (DMSO): 8,23 (1 H, s) H der phenolischen OH-Gruppe (das Signal verschwindet bei Zusatz von D_2O); 7,00 (1 H, s) H-C(8); 6,53 (1 H, s) H-C(5); 6,18 (2 H, s) H-C(2'), H-C(6'); 6,02 (2 H, *d* mit Feinaufspaltung, *J* ca. 1 Hz) Methylendioxygruppe; 3,60 (6 H, s) $2\text{CH}_3\text{O}$ -Gruppen; 2,05 (3 H, s), 2,00 (3 H, s), 1,93 (3 H, s), 1,80 (3 H, s) $4\text{CH}_3\text{COO}$ -Gruppen.

$\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{O}_{17}$	Ber. C 57,5	H 5,3	O 37,2	$2\text{CH}_3\text{O}$ 8,5%
(730,67)	Gef. „ 57,7	„ 5,1	„ 37,2	„ 8,5%

5. *4'-Benzyloxycarbonyl-4'-demethylepipodophyllotoxin- β -D-glucopyranosid (VII)*. Eine Lösung von 34,2 g (40 mMol) Tetra-O-acetyl-4'-benzyloxycarbonyl-4'-demethylepipodophyllotoxin- β -D-glucopyranosid (V) und 7,35 g (40 mMol) wasserfreiem Zinkacetat in 350 ml MeOH wurde 22 Std. unter Rühren und Rückfluss gekocht. Danach setzte man 2 ml Eisessig zu, erwärmte 2 Min. unter Rückfluss und dampfte die jetzt klare Lösung im Vakuum ein. Den Rückstand nahm man in 200 ml Chf-*n*-Butanol-(4:1) auf und wusch zweimal mit je 50 ml Wasser. Die Washwässer extrahierte man mit 50 ml Chf-*n*-Butanol-(4:1) nach. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand (28,0 g) zeigte im DC. (Flm. Isopropylacetat-MeOH-(4:1), wassergesättigt) 4 Flecke mit folgenden Rf-Werten: $\sim 0,49$ (VII). $\sim 0,42$, Hydroxysäure-methylester von VII; $\sim 0,35$ (VIII); $\sim 0,28$, Hydroxysäure-methylester von VIII. Kristallisation aus 70 ml MeOH lieferte 13,2 g fast einheitliches VII. Zur Analyse wurde das Kristallinat in Essigester-An gelöst, faserfrei filtriert und das An im Vakuum entfernt, wobei reines 4'-Benzyloxycarbonyl-4'-demethylepipodophyllotoxin- β -D-glucopyranosid (VII) vom Smp. 170 bis 176° , $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -95,7^{\circ}$ ($c = 0,658$ in Chf) anfiel (nach scharfer Trocknung im Hochvakuum bei 120°). – IR. (CHCl_3): 3400 (breit) OH; 1767 C=O; 1603, 1510, 1505, 1458 arom. C=C. – NMR. (DMSO): 7,45 (5 H, s) C_6H_5 ; 7,15 (1 H, s) H-C(8); 6,62 (1 H, s) H-C(5); 6,36 (2 H, s) H-C(2'), H-C(6'); 6,07 (2 H, s) Methylendioxygruppe; 5,27 (2 H, s) $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-O-}$; 3,65 (6 H, s) $2\text{CH}_3\text{O}$ -Gruppen.

$\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{O}_{15}\cdot\text{H}_2\text{O}$	Ber. C 58,8	H 5,4	O 35,8	$2\text{CH}_3\text{O}$ 8,7%
(714,67)	Gef. „ 58,9	„ 5,5	„ 35,5	„ 8,8%

6. *4'-Demethylepipodophyllotoxin- β -D-glucopyranosid (VIII)*. – a) *Durch Entacetylierung von VI*. Zu einer heissen Lösung von 14,61 g (20 mMol) Tetra-O-acetyl-4'-demethylepipodophyllotoxin- β -D-glucopyranosid (VI) in 600 ml MeOH gab man 8,80 g $\text{Zn}(\text{OOCCH}_3)_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sowie 0,5 ml Wasser und erwärmte unter Rückfluss. Nach einiger Zeit schied sich ein Bodenkörper aus, der bis zum Ende der Reaktion nicht mehr in Lösung ging. Nach 48 Std. konzentrierte man im Vakuum auf 200 ml, setzte 35 ml Wasser und 3 ml Eisessig zu, wobei sich der Bodenkörper auflöste. Man konzentrierte im Vakuum auf ca. 35 ml und extrahierte zweimal mit je 100 ml Chf-*n*-Butanol-(4:1). Die organischen Phasen wurden zweimal mit je 20 ml Wasser gewaschen und die Washwässer zweimal mit je 40 ml Chf-*n*-Butanol-(4:1) nachextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen ergaben nach Trocknung über Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum 7,80 g rohes Glucosid VIII das nach DC. (Flm. Isopropylacetat-MeOH-(4:1), wassergesättigt) noch geringe Anteile an nicht vollständig entacetyliertem VI enthielt. Aus den wässrigen Phasen schied sich im Verlauf der Extraktion eine gelatinöse Masse (Zn-Salze) aus, die durch tropfenweise Zugabe von Eisessig in Lösung gebracht wurde. Erneute Extraktion der so behandelten wässrigen Phasen gab noch weitere 2,73 g rohes

Glucosid VIII, das nach DC. aus VIII (Rf-Wert 0,31) und dem Hydroxysäure-methylester von VIII (Rf-Wert 0,25) bestand. Die 7,80 g Rohglucosid wurden an der 100-fachen Menge Kieselgel chromatographiert. Isopropylacetat-MeOH-(85:15), wassergesättigt, eluierte zuerst 582 mg Nebenprodukte, dann 6,10 g VIII das noch geringe Mengen Hydroxysäure-methylester enthielt. Dieses Material wurde mit den 2,73 g Rohglucosid aus den wässrigen Phasen vereinigt und zweimal aus MeOH kristallisiert, wobei 6,89 g (61% d.Th.) analysenreines 4'-Demethylepipodophyllotoxin- β -D-glucopyranosid (VIII) vom Smp. 225–227° (nach Trocknung im Hochvakuum bei 120°) und $[\alpha]_D^{20} = -94,5^\circ$ ($c = 1,006$ in MeOH) anfielen. – IR. (Nujol): 3320 (breit) OH; 1760 γ -Lacton; 1612, 1520, 1505, 1482 arom. C=C. – NMR. (DMSO): 8,25 (1 H, s) H der phenolischen OH-Gruppe (bei Zusatz von D₂O verschwindet das Signal); 7,10 (1 H, s) H-C(8); 6,55 (1 H, s) H-C(5); 6,22 (2 H, s) H-C(2'), H-C(6'); 6,04 (2 H, s) Methylendioxygruppe; 5,08 (1 H, breites s, $J_{1,2} =$ ca. 3 Hz) H-C(1) (nach Zusatz von D₂O); 3,62 (6 H, s) 2 CH₃O-Gruppen. – NMR. (DMSO + D₂O bei 100°): 7,02 (1 H, s) H-C(8); 6,48 (1 H, s) H-C(5); 6,23 (2 H, s) H-C(2'), H-C(6'); 5,95 (2 H, s) Methylendioxygruppe; 5,02 (1 H, scharf ausgebildetes d, $J_{1,2} = 3$ Hz) H-C(1); 3,65 (6 H, s) 2 CH₃O-Gruppen.

C ₂₇ H ₃₀ O ₁₃	Ber. C 57,6	H 5,4	O 37,0	2CH ₃ O 11,0%
(562,52)	Gef. „ 57,4	„ 5,3	„ 36,6	„ 11,0%

b) *Durch Hydrogenolyse von VII.* Eine Lösung von 6,97 g (10 mMol) 4'-Benzyloxycarbonyl-4'-demethylepipodophyllotoxin- β -D-glucopyranosid (VII) in 100 ml An-Wasser-(4:1) gab man zu einer Suspension von 1,0 g Palladium-Kohle (10% Pd) in 20 ml Wasser und hydrierte bei 20° unter Atmosphärendruck. Produktkontrolle im DC. mit dem Flm. Isopropylacetat-MeOH-(4:1), wassergesättigt. Nach beendeter Abspaltung der Benzyloxycarbonylgruppe wurde der Katalysator abfiltriert und mit 100 ml warmem An-Wasser-(3:1) nachgewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum auf Wasser konzentriert. Das auskristallisierte Produkt nutschte man ab und trocknete bei 80° im Hochvakuum: 5,07 g rohes Glucosid VIII. Zweimalige Kristallisation aus MeOH ergab 4,01 g reines 4'-Demethylepipodophyllotoxin- β -D-glucopyranosid (VIII) vom Smp. (223° sintern) 227–229°. Der Smp. hängt stark von Trocknungstemperatur und -dauer ab. Nach 5 Std. Trocknung im Hochvakuum bei 120° schmilzt VIII bei 232–236°; $[\alpha]_D^{21} = -93,0^\circ$ ($c = 1,021$ in MeOH).

C ₂₇ H ₃₀ O ₁₃	Ber. C 57,6	H 5,4	O 37,0	2CH ₃ O 11,0%
(562,52)	Gef. „ 58,0	„ 5,6	„ 37,3	„ 10,9%

7. *Tetra-O-acetyl-4'-benzyloxycarbonyl-4'-demethylepipodophyllotoxin- β -D-galaktopyranosid (IX).* 27 g (50 mMol) 4'-Benzyloxycarbonyl-4'-demethylepipodophyllotoxin (IV) löste man unter Erwärmen in 70 ml abs. 1,2-Dichloräthan, kühlte die Lösung auf +15° ab und setzte 28 g (80 mMol) fein gepulverte 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galaktopyranose zu. Man rührte bis sich der überwiegende Teil des Zuckers gelöst hatte, kühlte dann auf –15° ab und tropfte unter Rühren und Feuchtigkeitsausschluss innert 3 Min. 18 ml (144 mMol) eiskaltes Bortrifluorid-Ätherat zu. Nach 45 Min. Rühren bei –15° setzte man unter Kühlung eine Lösung von 18 ml abs. Pyridin in 35 ml 1,2-Dichloräthan tropfenweise zu, verdünnte mit 200 ml 1,2-Dichloräthan und wusch die Lösung viermal mit je 100 ml Wasser aus. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedampft. Den Rückstand (56,6 g) nahm man in 150 ml heissem EtOH auf und tropfte die Lösung unter intensivem Rühren und Eiskühlung in 450 ml Wasser ein. Nach 1 Std. wurde die entstandene Fällung abgenutscht und mit 100 ml EtOH-Wasser-(1:3) nachgewaschen. Das Reaktionsprodukt (45 g) nahm man in 300 ml heissem MeOH auf, entfernte ungelöstes Material (0,27 g) und dampfte das Filtrat im Vakuum ein. Nach Trocknung im Hochvakuum wurden 44,7 g rohes Tetraacetat IX ($[\alpha]_D^{20} = -33,1^\circ$, $c = 0,527$ in Chf) erhalten. Im DC. (Flm. Benzol-Pyridin-9:1) zeigte das Produkt einen Hauptfleck (IX) und das etwas schneller wandernde α -Galaktopyranosid. Zur Abtrennung dieses Nebenproduktes chromatographierte man an der 60-fachen Menge Kieselgel. Benzol-Pyridin-(95:5) eluierte zuerst das α -Galaktosid-Derivat, dann eine Mischfraktion und abschliessend reines IX. Die Kontrolle der Fraktionen erfolgte im DC. wie oben. Durch Nachchromatographie der Mischfraktionen wurden total 37,43 g reines IX erhalten, das nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. Amorphes Tetra-O-acetyl-4'-benzyloxycarbonyl-4'-demethylepipodophyllotoxin- β -D-galaktopyranosid (IX) zeigte den Smp. 125–127°; $[\alpha]_D^{21} = -44,0^\circ$ ($c = 0,534$ in Chf). – IR. (CH₂Cl₂): 1770 (Schulter) γ -Lacton; 1750 C=O; 1600, 1510, 1503, 1483 arom. C=C. – NMR. (CDCl₃): 7,38 (5 H, s) C₆H₅-; 6,88 (1 H, s) H-C(8); 6,59 (1 H, s) H-C(5); 6,30 (2 H, s) H-C(2'), H-C(6'); 6,01 (2 H, s) Methylendioxygruppe; 5,27 (2 H, s)

$C_6H_5CH_2-O$; 3,68 (6 H, s) $2CH_3O$ -Gruppen; 2,18 (3 H, s), 2,12 (3 H, s), 1,97 (3 H, s), 1,86 (3 H, s) $4CH_3COO$ -Gruppen.

$C_{43}H_{44}O_{19}$	Ber. C 59,7	H 5,1	O 35,2	$2CH_3O$ 7,2%
(864,81)	Gef. „ 59,8	„ 5,2	„ 35,2	„ 7,1%

8. *4'-Demethylepipodophyllotoxin- β -D-galaktopyranosid (X)*. Zu einer Lösung von 1,23 g (6,7 mMol) wasserfreiem Zinkacetat und 0,5 g (6 mMol) wasserfreiem Natriumacetat in 50 ml abs. MeOH gab man 8,65 g (10 mMol) Tetraacetat IX und erwärmte unter Rückfluss. Nach jeweils 2 Std. wurden ca. 10 ml abdestilliert und die Lösung durch Zugabe von MeOH wieder auf das ursprüngliche Volumen gebracht. Nach 15,5 Std. setzte man 1,5 ml Eisessig zu, dampfte im Vakuum bei 50° Badtemperatur ein und nahm den kristallisierten Rückstand in 100 ml Chf-Isopropanol-(4:1) auf. Man wusch die Lösung zweimal mit je 10 ml Wasser und schüttelte die Wasserphasen viermal mit je 10 ml Chf-Isopropanol-(4:1) aus. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand (7,0 g) zeigte im DC. (Flm. Isopropylacetat-MeOH-Wasser-80:20:12) zwei Hauptflecke; die langsamer laufende Verbindung entspricht X, der schneller laufende Anteil stellt 4'-Benzyloxycarbonyl-4'-demethylepipodophyllotoxin- β -D-galaktopyranosid dar. Zur vollständigen Abspaltung der Benzyloxygruppe nahm man das Gemisch der Entacetylierungsprodukte in 80 ml An auf, gab die Lösung zu einer Suspension von 1 g Palladium-Kohle (5% Pd) in 20 ml Wasser und hydrierte bei Atmosphärendruck und Zimmertemperatur (Produktekontrolle im DC. wie oben). Nach erfolgter Hydrogenolyse (ca. 20 bis 30 Min.) wurde der Katalysator abfiltriert und zuerst mit 30 ml warmem An-Wasser-(1:1) und dann mit 30 ml warmem An nachgewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum auf 20 ml konzentriert, wobei X auskristallisierte (4,095 g). Umkristallisation aus 400 ml MeOH-Wasser-(95:5) ergab 2,50 g 4'-Demethylepipodophyllotoxin- β -D-galaktopyranosid (X) in Form farbloser Nadelchen vom Smp. 270–272°; $[\alpha]_D^{25} = -145,0^\circ$ ($c = 0,531$ in Pyridin). – IR. (Nujol): 3500, 3400 OH; 1762 γ -Lacton; 1610, 1520, 1510, 1490 arom. C=C. – NMR. (DMSO): 8,20 (1 H, s) H der phenolischen OH-Gruppe (das Signal verschwindet bei Zusatz von D_2O); 7,04 (1 H, s) H-C(8); 6,52 (1 H, s) H-C(5); 6,20 (2 H, s) H-C(2'), H-C(6'); 6,00 (2 H, s) Methylenedioxygruppe; 5,03 (1 H, d, $J_{1,2} = 3$ Hz) H-C(1); 3,61 (6 H, s) $2CH_3O$ -Gruppen.

$C_{27}H_{30}O_{13}$	Ber. C 57,6	H 5,4	O 37,0	$2CH_3O$ 11,0%
(562,52)	Gef. „ 57,7	„ 5,2	„ 36,7	„ 11,2%

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 22. Mitt.: M. KUHN, C. KELLER-JUSLÉN & A. VON WARTBURG, *Helv.* 52, 944 (1969).
- [2] M. KUHN & A. VON WARTBURG, *Helv.* 51, 1631 (1968).
- [3] M. V. NADKARNI, P. B. MAURY & J. L. HARTWELL, *J. Amer. chem. Soc.* 74, 280 (1952); M. V. NADKARNI, J. L. HARTWELL, P. B. MAURY & J. LEITER, *J. Amer. chem. Soc.* 75, 1308 (1953).
- [4] O. L. CHAPMAN & R. W. KING, *J. Amer. chem. Soc.* 86, 1256 (1964).
- [5] M. KUHN & A. VON WARTBURG, *Helv.* 51, 163 (1968).
- [6] A. STOLL, J. RENZ & A. VON WARTBURG, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 3103 (1954); *Helv.* 37, 1747 (1954).
- [7] A. STOLL, A. VON WARTBURG, E. ANGLIKER & J. RENZ, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 5004 (1954).
- [8] E. SCHREIER, *Helv.* 47, 1529 (1964).
- [9] N. S. BHACCA & D. H. WILLIAMS, «Applications of NMR. Spectroscopy in Organic Chemistry», p. 189 ff., Holden Day Inc., 1964.
- [10] J. COMPTON & M. L. WOLFROM, *J. Amer. chem. Soc.* 56, 1157 (1934).
- [11] H. EMMENEGGER, H. STÄHELIN, J. RUTSCHMANN, J. RENZ & A. VON WARTBURG, *Arzneimittel-Forschung* 11, 327, 459 (1961).