

ARZNEIMITTEL-FORSCHUNG DRUG RESEARCH



Arzneim.-Forsch. / Drug Res. **29** (II), 8, 1083–1088 (1979)

Editio Cantor · D-7960 Aulendorf

Aus den Pharmazeutischen Instituten der Universitäten Bern * (Schweiz) und Regensburg **

Untersuchungen zum Stoffwechsel antipsoriatisch wirksamer Anthron-Derivate¹⁾

Von W. Wiegrebe *, **, A. Gerber *, J. Kappler ** und Chr. Bayerl **

Herrn Professor Dr. Ing. Dr. mult. h. c. Karl Winnacker in Verbundenheit zum 75. Geburtstag gewidmet

Zusammenfassung: Der Metabolismus der antipsoriatisch wirksamen Verbindungen 1,8,9-Triacetoxyanthracen und 1,8-Diacetoxy-9-anthron wird untersucht. Es bilden sich 1,8-Dihydroxy-9-anthron, 1-Hydroxy-8-acetoxy-9-anthron, 1,8,1',8'-Tetrahydroxy-bianthron, 1,8-Dihydroxy-anthrachinon, 1,8-Diacetoxy-anthrachinon und 1-Hydroxy-8-acetoxy-

anthrachinon. Quantitative Bestimmungen dieser „Metaboliten“ zeigen, daß die hydrolytischen Reaktionen vor den Oxidationen stattfinden. Im Gegensatz zu 1,8-Dihydroxy-9-anthron lassen 1,8,9-Triacetoxyanthracen und 1,8-Diacetoxy-9-anthron psoriatische Läsionen verschwinden, ohne Entzündungen hervorzurufen. Die Unwirksamkeit des 1,8,9-Trimethoxyanthracens spricht ebenfalls dafür, daß es sich zumindest beim 1,8,9-Triacetoxy-anthracen um eine Verbindung mit „prodrug“-Charakter handelt. — Die hier beschriebenen 10,10-dialkylierten 1,8-Dihydroxy-9-anthrone sind in Übereinstimmung mit der Krebs'schen Hypothese unwirksam bei Psoriasis.

¹⁾ Vorgetragen beim 16th National Medicinal Chemistry Symposium auf Einladung der Medicinal Chemistry Division of the American Chemical Society, Kalamazoo, Michigan, Juni 1978.

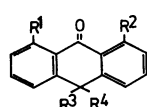
Summary: Studies on the Metabolism of Antipsoriatic Anthrone-Derivatives

The metabolism of the antipsoriatally active molecules 1,8,9-triacetoxy-anthrone und 1,8-diacetoxy-9-anthrone by serum is described. Under these conditions 1,8-dihydroxy-9-anthrone, 1-hydroxy-8-acetoxy-9-anthrone, 1,8,1',8'-tetrahydroxy-bisanthrone, 1,8-dihydroxy-anthraquinone, 1,8-diacetoxy-anthraquinone and 1-hydroxy-8-acetoxy-anthraquinone arise from both educts. Quantitative determina-

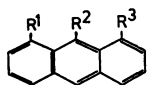
tions of these metabolites indicate that hydrolytic reactions occur prior to oxidation. Contrary to 1,8-dihydroxy-9-anthrone, 1,8,9-triacetoxyanthracene and 1,8-diacetoxy-9-anthrone are effective against psoriatic lesions without accompanying inflammations of the skin. 1,8,9-Trimethoxyanthracene, however, is ineffective, also indicating that at least 1,8,9-triacetoxy-anthrone is a prodrug. — In agreement with Krebs' hypothesis 10,10-dialkylated 1,8-dihydroxy-9-anthrone described in this paper are ineffective against psoriasis.

Krebs und Schaltegger [1—4] haben Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Dithranol (I) und dithranolähnlichen Substanzen bei der Psoriasisbehandlung untersucht. Danach ist ein Anthron antipsoriatisch wirksam, wenn es mindestens eine phenolische OH-Gruppe mit H-Brückenbindung trägt und wenn die Methylengruppe unsubstituiert ist: 1-Hydroxy-9-anthrone (II) wäre die antipsoriatisch wirksame Minimalstruktur. Die o. a. Autoren bezweifeln, daß die entzündungserregenden Eigenschaften dieser Substanzen zur Heilung der Psoriasis notwendig sind, wie es verschiedentlich behauptet wird [5—9], weil 1,8,9-Triacetoxy-anthracen (III) wirksam ist, ohne Entzündungen hervorzurufen.

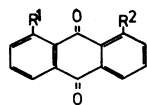
Wir sind der Frage nachgegangen, ob III in der Haut zu I hydrolysiert wird oder an sich wirksam ist. Als Metabolit des Dithranols (I) tritt Chrysacin (V) auf [10]. Es sollte geklärt werden, ob III und 1,8-Diacetoxy-9-anthrone (IV), ein mögliches Intermediat zwischen III und I, durch Serum-Enzyme zuerst oxidiert und nachher hydrolysiert werden oder — wahrscheinlicher — umgekehrt. In diesem Zusammenhang wurden 6 Metaboliten von III bzw. IV identifiziert, eine Methode zu ihrer quantitativen Bestimmung wurde erarbeitet.



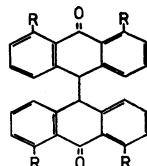
- I: $R^1=R^2=OH$
 II: $R^1=OH, R^2=H$
 IV: $R^1=R^2=O-CO-CH_3$
 XI: $R^1=OH, R^2=O-CO-CH_3$
 (XIII: $R^1=R^2=OH, R^3=H, R^4=CH_2-CH=CH_2$)
 XIV: $R^1=R^2=OH, R^3=R^4=CH_2-CH=CH_2$
 XV: $R^1=R^2=OH, R^3=R^4=nC_3H_7$
 XVI: $R^1=R^2=O-CO-CH_3, R^3=R^4=nC_3H_7$



- III: $R^1=R^2=R^3=O-CO-CH_3$
 VI: $R^1=R^2=R^3=O-CO-C_6H_5$
 XII: $R^1=R^2=R^3=OCH_3$



- V: $R^1=R^2=OH$
 VII: $R^1=R^2=O-CO-CH_3$
 X: $R^1=OH, R^2=O-CO-CH_3$



- VIII: $R=OH$
 IX: $R=O-CO-CH_3$

1. Herstellung potentieller Metaboliten

Versuche²⁾, die C-9-Acetylgruppe von III durch Umesterung zu entfernen und so zu IV zu gelangen, schlugen fehl*: Es wurden zwar IV und I identifiziert, doch ist das Verfahren

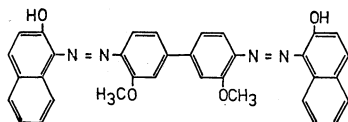
präparativ ungeeignet. Versuche, das zu IV analoge 1,8-Dibenzoyloxy-9-anthrone durch partielle Veresterung von I zu erhalten, führten zu 1,8,9-Tribenzoyloxy-anthracen (VI) [11]. Versuche zur partiellen Verseifung waren ebenfalls erfolglos*. Dagegen ließ sich das Acetylierungsgemisch aus III und IV säulenchromatographisch (sc) trennen: 2,3 g I liefern 600—700 mg IV. IV ist, dunkel und trocken aufbewahrt, stabil; Schmp. 195° C. Dünnschichtchromatographisch (dc) wurde über IV oft noch ein weiterer, gelber Fleck festgestellt, wenn die aufgetragene $CHCl_3$ -Lösung Luft und Licht ausgesetzt war. Das UV-Spektrum (MeOH) der fraglichen Substanz [$\lambda_{max} = 252$ ($\log \epsilon = 4,58$), 269 (Schulter; 4,13) und 336 nm (3,77)] und ihr IR-Spektrum (KBr) [1760 cm^{-1} (Phenylester), 1680 cm^{-1} und 1670 cm^{-1} (C=O-Schwingungen)] wiesen sie als Anthrachinon ohne H-Brücke aus. Massenspektrometrische (ms) Untersuchungen ergaben bei sehr großen Spaltbreiten (M^+ des 1,8-Diacetoxy-anthrachinons (VII) bei m/e 324 (0,1%), der 2mal Ketten zu m/e 282 (26%) bzw. zu V (m/e 240; Basepeak) verliert. Analog anderen Carbonyl-Verbindungen wird von hier aus 2mal CO zu m/e 212 (11%) bzw. m/e 184 (7%) abgespalten. Die Identität der fraglichen Substanz mit VII wurde durch IR- und DC-Vergleiche mit authentischer Substanz [12] erwiesen: IV wird in $CHCl_3$ -Lösung an Luft und Licht erwartungsgemäß zum entsprechenden Anthrachinon oxidiert.

2. Metabolisierungsversuche an III und IV

Nachlas u. Seligman [13] haben in gesunder Haut histochemisch Esterasen nachgewiesen. Eine quantitative Aussage ist mit ihrer Methode nicht möglich.

Wir beabsichtigten, den Arylesterasen-Gehalt in menschlicher Haut zu bestimmen, um den Metabolismus von III unter Einwirkung von Hauthomogenisat zu studieren. Dazu modifizierten wir die von Pilz [14] beschriebene Methode für Serum-Arylesterasen mit Phenylacetat als Substrat. Psoriasis-Schuppen wurden in Puffer pH 5,4 homogenisiert und anstelle des Serums eingesetzt, doch wurde keine Arylesterasen-Aktivität festgestellt*. Daraus folgt, daß III zumindest nicht im Stratum corneum metabolisiert wird. Ein Homogenisat gesunder, blutfreier Menschenhaut zeigt Arylesterase-Aktivitäten, die bei pH 5,4 bzw. 8,6 noch innerhalb der Fehlergrenzen der Methode [14] liegen*. — Die Methode von Nachlas et al. [13] sollte daraufhin zur quantitativen Erfassung der Esteraseaktivität in Hauthomogenisat modifiziert werden. Wir konnten zwar Esterase-Aktivität qualitativ nachweisen, eine quantitative Bestimmung war nicht möglich, da der Farbstoff nicht in Lösung blieb, sondern an Gewebepartikel adsorbiert war, von denen er sich nicht trennen ließ*. Zum Vergleich stellten wir den Farbstoff selbst her: Anstelle von β -Naphthylacetat, das durch die Esterasen gespalten werden soll, wurde β -Naphthol eingesetzt. Die Analysenwerte führten zu folgender Struktur, die als Komplexbildner für Zn^{2+} dient:

²⁾ Details der mit * gekennzeichneten Experimente: Dissertation A. Gerber, Medizinische Fakultät der Universität Bern (Schweiz), 1976. (Entsprechende Kopien sind beim Verfasser, s. Anschrift S. 1088, erhältlich.)



Wir versuchten daraufhin, die als Produkte der Esterspaltung erwarteten phenolischen Metaboliten von **III** bzw. **IV** als Azofarbstoffe mit Echtblausalz B abzufangen, um die Bildung von Sekundärmetaboliten zu unterbinden. Wir ersetzten β -Naphthylacetat durch **III**, mußten aber, um es wenigstens teilweise in Lösung zu bringen, dem Inkubationsansatz $\frac{1}{3}$ des Volumens an tertiärem Butanol zusetzen. Dieser Alkohol hemmt in dieser Konzentration die Arylesterasen weitgehend (Kontrolle mit β -Naphthylacetat und Serum nach [14]). — In einem Inkubationsansatz mit suspendiertem **III** und Hauthomogenisat ließen sich dc keine **III**-Metaboliten nachweisen*.

Wir schlossen aus diesen Versuchen mit blutfreien Hauthomogenisaten, daß nennenswerte Mengen **III**, wenn überhaupt, durch Fermentsysteme des Blutes, aber nicht durch zellgebundene Hautenzyme metabolisiert werden und wandten uns deshalb Serumversuchen zu.

III wurde mit Serum versetzt, dunkel unter N_2 2 h bei $37^\circ C$ inkubiert und dc untersucht: **IV** war nicht nachzuweisen, **I** und **V** wurden u. a. identifiziert. Aus **IV** entstehen ebenfalls **V** und **I**. — **III** bzw. **IV** werden folglich hydrolytisch und oxidativ metabolisiert. Wir versuchten u. a. mit Dithionit, Thioharnstoff, Cystein, 4-Chlormercuribenzoessäure [15] und EDTA-Na die Oxidasen im Serum zu hemmen, um so die entazetylierten Verbindungen als Vorstufen der Oxidationsprodukte zu finden, doch ließ sich die Oxidation so nur teilweise hemmen*. Ein unspezifischer Eiweißeffekt ist ausgeschlossen, da Eiereiweißlösung nach [14] keine Arylesterasen-Aktivität besitzt und **III** bzw. **IV** nicht metabolisiert*. Das Oxidationsmodell von Ullrich [16] mit 2-Mercaptobenzoessäure, Fe^{2+} und Luft erlaubte keine Aussage über die Reihenfolge von Hydrolyse und Oxidation, da **III** auch ohne Serum R^2 abgespalte und zu **VII** oxidiert wurde*.

Zur Esterasen-Hemmung verwendeten wir das Cyclohexylammoniumsalz der 3,5-Dichlorphenyl-p-nitrophenylphosphorsäure³⁾ und Paraoxon: Beide Substanzen hemmen nach [14] in Konzentrationen 10^{-4} bis 10^{-2} m die Arylesterasen des Serums nicht*.

Hinweise aus dem dc-Verhalten⁴⁾ der bisher untersuchten Verbindungen (z. B. unterschiedliche Fluoreszenz bei gleichem R_f -Wert) ließen uns nach 1,8,1',8'-Tetrahydroxy-10,10'-bianthron (**VIII**) [17], 1,8,1',8'-Tetraacetoxy-10,10'-bianthron (**IX**), 1-Hydroxy-8-acetoxy-anthrachinon (**X**) [18], 1,8-Diacetoxy-anthrachinon (**VII**) und 1-Hydroxy-8-acetoxy-9-anthron (**XI**) [19] aus Metaboliten suchen: **VII**, **VIII**, **X** und **XI** entstehen zusätzlich zu **I** und **V** unter Serumwirkung aus **III** und **IV**.

Da Versuche, Oxidation bzw. Hydrolyse selektiv zu unterbinden, mißlungen waren, bestimmten wir die bei den Seruminkubationen angefallenen Verbindungen **I**, **XI**, **VIII**, **X**, **VII** und **V** quantitativ nebeneinander, um festzustellen, wie sich die Konzentrationen der Abbauprodukte zeitabhängig ändern.

Wir gingen von einem spektroskopischen Verfahren aus, das Anthrachinone nach dc-Trennung und Elution bestimmt [20]: Von allen Metaboliten wurden wegen zu geringer Löslichkeit in Methanol quantitative UV-Spektren in $CHCl_3$ aufgenommen. Alle Substanzen weisen einen linearen Bereich in den Eichkurven zwischen 0,4 und 3,5 mg/100 ml $CHCl_3$ auf. Die maximale Abweichung in Gemischen aller 6 betrug 8,5 % (bei **VII**), die minimale 2,0 % (bei **V**) (Mittelwerte aus 10 Bestimmungen mit 3 Testgemischen).

³⁾ Wir danken Herrn Prof. Dr. J. Schnekenburger, Kiel, für diese Verbindung.

⁴⁾ Bei den Untersuchungen stellte sich heraus, daß handelsübliches **I VIII** enthält.

Mit diesem Verfahren wurden Inkubationsansätze mit **III** und **IV** untersucht: **III** ist erwartungsgemäß viel stabiler als **IV**. Nach $\frac{1}{4}$ h konnten bei **III** kaum bestimmbare Konzentrationen von Abbauprodukten festgestellt werden, während bei **IV** schon große Mengen an Metaboliten vorlagen. Die Ergebnisse der bis 4stündigen Inkubation sind in den Abb. 1 u. 2 dargestellt und geben das Verhältnis der Metaboliten zueinander zeitabhängig an.

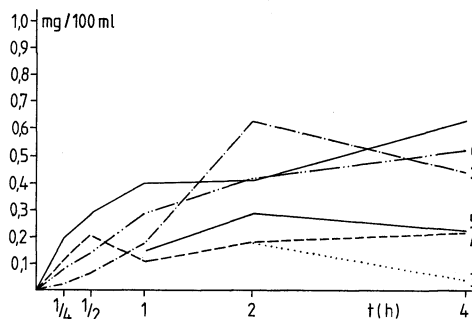


Abb. 1: Mengenmäßige Verteilung der Abbauprodukte von 1,8,9-Triacetoxy-anthracen (**III**) nach $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 2 und 4 h im Serum. 1 = 1-Hydroxy-8-acetoxy-9-anthron (**XI**); 2 = 1,1',8,8'-Tetrahydroxy-10,10'-bianthron (**VIII**); 3 = Dithranol (**I**); 4 = 1-Hydroxy-8-acetoxy-anthrachinon (**X**); 5 = 1,8-Diacetoxy-anthrachinon (**VII**); 6 = Chrysazin (**V**).

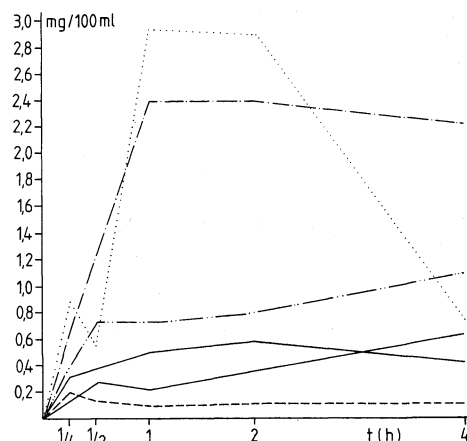


Abb. 2: Mengenmäßige Verteilung der Abbauprodukte von 1,8-Diacetoxy-9-anthron (**IV**) nach $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 2 und 4 h im Serum. 1 = 1-Hydroxy-8-acetoxy-9-anthron (**XI**); 2 = 1,1',8,8'-Tetrahydroxy-10,10'-bianthron (**VIII**); 3 = Dithranol (**I**); 4 = 1-Hydroxy-8-acetoxy-anthrachinon (**X**); 5 = 1,8-Diacetoxy-anthrachinon (**VII**); 6 = Chrysazin (**V**).

IV wird relativ schnell im Serum bevorzugt hydrolysiert, bevor es oxidiert wird (hohe Konzentration von **I**). Daher traten außer **V**, dem endgültigen Abbauprodukt, und dem Produkt der oxidativen Dimerisierung (**VIII**) wenig vorher schon oxidierte Produkt, wie z. B. **X**, auf. — Bei **III** war die Hydrolyse weniger ausgeprägt. Trotzdem wurden relativ viel **VIII** neben etwa gleichviel **XI** gefunden. Das deutet darauf hin, daß **III** evtl. über **IX** abgebaut wurde, das jedoch nicht nachgewiesen werden konnte: In einem getrennten Versuch war **IX** schon nach $\frac{1}{4}$ h stark zu **VII** abgebaut. Nach 1 h konnte **X** nachgewiesen werden, nach 4 h **V**. Wegen dieses schnellen Abbaus konnte **IX** nicht in dc erfassbaren Mengen in den Inkubationsversuchen mit **III** bzw. **IV** gefunden werden. — **VIII** weist auf jeden Fall darauf hin, daß auch **III** bevorzugt vor der Oxidation hydrolysiert wird. Unsere Ergebnisse sprechen dafür, daß **III**, wahrscheinlich auch **IV**, Transport- oder Depot-Formen von **I** sind. Einen unterstützenden Hinweis gibt die schlechte Wirkung von **XII** (s. u.) in den klinischen Versuchen, das im Serum überhaupt nicht angegriffen und allem Anschein nach auf der Haut nicht gespalten wird. Wir weisen darauf hin, daß diese Versuche Modellcharakter haben, vermuten aber, daß die

Verhältnisse in der Haut vergleichbar sind. Wäre 1,8,9-Triacetoxyanthracen (**III**) eine an sich wirksame Substanz, so sollte 1,8,9-Trimethoxy-anthracen (**XII**), für das ähnliche Permeationseigenschaften zu erwarten sind, ebenfalls antipsoriatisch wirken.

3. Synthese von 1,8,9-Trimethoxy-anthracen (**XII**)

I wurde analog Mahesh [21] methyliert. — Massen- und NMR-Spektrum des Rohproduktes zeigten, daß neben **XII** eine Verunreinigung mit zusätzlicher CH_3 -Gruppe, vermutlich an C-10, entsteht: ihr M^+ liegt bei m/e 282, im NMR-Spektrum tritt ein Singulett bei $\delta = 2,94$ mit der relativen Intensität von 0,3 Protonen auf. Die Methylierung von C-10 läßt sich als phenyloge α -Alkylierung zur C-9 Carbonylgruppe des **I** erklären.

4. 10,10-Disubstituierte Anthrone

Krebs u. Schaltegger haben darauf hingewiesen, daß die CH_2 -Gruppe des C-10 unsubstituiert sein müsse, wenn ein Anthron antipsoriatisch wirksam sein soll. — Zur Prüfung dieser These bot sich das von Schultz et al. [22] beschriebene 1,8-Dihydroxy-10-allyl-9-anthron (**XIII**) als Ausgangsmaterial an, das an C-10 nachalkyliert und dessen Allylgruppe zur Propylgruppe hydriert werden sollte. — Wir arbeiteten die Vorschrift [22] in bis zu 15fachen Ansätzen nach und fanden neben **V** nur das 10,10-Diallyl-Derivat **XIV**, das zu **XV** hydriert und anschließend zu **XVI** verestert wurde. **XIV** und **XV** wirken im Vergleich zu **I** sehr schwach. Dieser Befund stützt die von Krebs [4] aufgestellte Hypothese.

Experimenteller Teil

1. Herstellung potentieller Metaboliten

1.1. 1,8-Diacetoxy-9-anthron (**IV**)⁶⁾

In die Lösung von 4,5 g **I** in 50 ml Acetanhydrid wurde 10 min N_2 eingeleitet, der Rückflußkühler mit einem Luftballon verschlossen (N_2 -Blase) und die Lösung 4 h zum Sieden erhitzt. — Nach Abkühlen läßt man 12 h bei etwa 40°C stehen. Das Rohprodukt wird einmal aus Benzol umkristallisiert, um den größten Teil des nicht umgesetzten **I** zu entfernen. Das Kristallisat löst man in CHCl_3 , zieht es am Rotavapor auf 5–6 g Kieselgel zur SC (Korngröße 0,063–0,20 mm) auf und verwendet dieses Adsorbat als Säulenkopf. Mit Toluol/Aceton 9:1 wird an 200 g des o. a. Kieselgels fraktioniert. — **IV** kristallisiert aus Benzol in cremefarbenen, verfilzten Nadelchen oder derben, schwefelgelben Spießen. Beide Kristallformen schmelzen bei 195–196°C und unterscheiden sich nicht im IR-Spektrum (KBr)⁷⁾.

IR-Spektrum: 1760 cm^{-1} (Esterbande), 1660 cm^{-1} (Carbonylbande), 1605 cm^{-1} (Aromat). — Die Verschiebung der Esterbande zum Bereich höherer Wellenzahlen begründen wir damit, daß **IV**, **IX** und **XI** phenyloge gemischte Anhydride sind.

UV-Spektrum: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 241 nm ($\log \epsilon = 4,14$); 259 (4,49); 353 Schulter (3,09); 370 (3,29); 386 (3,20); 405 Schulter (3,04). — MS: $\text{M}^+ = \text{m/e}$ 310 (1,7%) verliert erwartungsgemäß 28 M.E. (CO) zu m/e 282 (1,7%) und Keten (42 M.E.) zu m/e 268 (29%), das seinerseits CO zu m/e 240 (6%) und ein 2. Keten zu m/e 226 (100%) abspaltet. Der Basepeak kann wiederum CO zu m/e 198 (9%) abspalten. Bei diesem Fragment handelt es sich vermutlich um Dihydroxyfluoren, das noch OH^+ zu m/e 181 (3%) verliert. m/e 43 (CH_3CO^+) erreicht 10% rel. Intensität. $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_5$ (310,3) Ber.: C 69,67 H 4,55

Gef.: C 69,62 H 4,65

1.2. 1,8,9-Tribenzoyloxy-anthracen (VI**):** nach Schultz [11] Schmp.: 268–269°C. — IR-Spektrum: 1740 cm^{-1} (verbreitert; Phenylester), 1630 cm^{-1} und 1595 cm^{-1} (Aromat). — UV-Spektrum: $\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ 260 nm ($\log \epsilon = 5,06$); 325 (3,34); 340 (3,54); 357 (3,83); 375 (4,01); 396 (3,94) (Anthracen-Typ). — MS: $\text{M}^+ = \text{m/e}$ 538 (12%) verliert 105 M.E. zu m/e 433 (1%) und 121 M.E. zu m/e 417 (0,1%) und von dort 105 M.E. zu m/e 312 (2%). m/e 312 entsteht auch durch Verlust von 121 M.E. aus m/e 433. Basepeak ist $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}^+$ (m/e 105), der 28 M.E. (CO) zu m/e 77 (38%) verliert.

Dem MS von **VI** entspricht weitgehend das von **III**: den Verlusten von 3 Benzoyl- bzw. Benzoatresten bei **VI** entsprechen die Abspaltungen von 3 Molekeln Keten bzw. Essigsäure in **III**: $\text{M}^+ = \text{m/e}$ 352 (6%) verliert 42 M.E. zu m/e 310 (5%), das wiederum 42 M.E. zu m/e 268 (11%) bzw. 60 M.E. zu m/e 250 (17%) verliert. Aus m/e 268 entsteht durch Keten-Verlust der Basepeak m/e 226, der 29 M.E. (CHO oder $\text{H}^+ + \text{CO}$) zu m/e 197 (11%) verliert. Aus m/e 250 bildet sich m/e 208 (<1%).

1.3. 1,8-Diacetoxy-9-anthrachinon (VII**)** wurde nach Naylor et al. [12] hergestellt.

1.4. 1,8,1'-Tetrahydroxy-10,10'-bianthron (**VIII**)

Herstellung nach Vogt u. Mühlemann [17] bzw. Auterhoff u. Scherff [23]. Umkristallisation aus Benzol [24]. Schmp.: 230°C; Lit. 224–225°C [17], 235–236°C [23], 230°C [24].

1.5. 1,8,1',8'-Tetraacetoxy-10,10'-bianthron (**IX**)

400 mg **VIII** wurden in 40 ml Acetanhydrid 30 min unter N_2 -Atmosphäre und leichtem Überdruck (Ballon) gekocht. Nach Abkühlen wurde über Nacht kühl gestellt: gelbe Kristalle, Umkristallisation aus Benzol, Schmp. 229–233°C. Ausbeute: 27%.

IR-Spektrum: 1760 cm^{-1} (Esterbande), 1670 cm^{-1} (Carbonylbande), 1605 cm^{-1} (Aromat). — UV-Spektrum: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 260 nm ($\log \epsilon = 4,27$); 273 Schulter (4,26): Anthron-Spektrum. — Das MS ist geprägt durch die Spaltung der bisbenzyliischen Bindung, die von $\text{M}^+ = \text{m/e}$ 618 zu m/e 309 und — unter H-Übertragung — zu m/e 310 führt. Die Acetylgruppen werden nur in untergeordnetem Maß vom nicht gespaltenen Molekül aus als Keten oder Acylrest zu m/e 576, m/e 534 bzw. m/e 533, m/e 492 und m/e 450 bzw. m/e 449 abgespalten. m/e 309 bzw. m/e 310 verlieren wieder zwei Acetylgruppen zu m/e 267 und m/e 268, bzw. zum Basepeak m/e 226, begleitet von m/e 225. $\text{C}_{36}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$ (618,6) Ber.: C 69,90 H 4,24 Gef.: C 70,09 H 4,31

1.6. 1-Hydroxy-8-acetoxy-anthrachinon (X**):** Dimroth et al. [18]

1.7. 1-Hydroxy-8-acetoxy-anthron (**XI**)

In Anlehnung an Schultz et al. [19] wurde wie folgt verfahren: 7 g **III** wurden unter Erwärmen in 300 ml CHCl_3 gelöst, mit 400 ml Methanol verdünnt und bei 0°C unter N_2 mit 2,26 g NaBH_4 in 40 ml Methanol/Wasser (1+1) langsam versetzt. Aufarbeitung nach [19], das Rohprodukt wurde durch SC an Kieselgel 60 (70–230 mesh ASTM) für die SC (Merck) mit Toluol/Aceton 9:1 gereinigt, anschließend aus Eisessig, dann aus Benzol umkristallisiert.

Schmp.: 156–162°C; Lit. [19]: 159°C. Ausbeute 1,8 g (26%), entspr. [19].

IR-Spektrum: 1760 cm^{-1} (Esterbande), 1635 cm^{-1} (Carbonylbande mit H-Brücke), 1605 cm^{-1} (Aromat). — UV-Spektrum: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 257 nm ($\log \epsilon = 4,13$); 283 (4,05); 359 (3,56): Anthron-Spektrum. — MS: Die bei **IV** beobachteten Fragmentierungen treten analog bei **XI** auf: $\text{M}^+ = \text{m/e}$ 268 (17%) verliert CO zu m/e 240 (2%) und Keten zum Basepeak m/e 226, dieser CO zu m/e 198 (17%), der H^+ zu m/e 197 (15%) und OH^+ zu m/e 181 (10%) abspaltet.

$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$ (268,3) Ber.: C 71,64 H 4,51 Gef.: C 71,48 H 4,57

2.1. Darstellung des blauen Farbstoffes von Nachlas u. Seligman [13]

Anstelle von β -Naphthylacetat [13] wurde β -Naphthol eingesetzt. Der Farbstoff fiel sofort aus und wurde aus Methanol/Aceton (1:1) umkristallisiert.

Schmp.: 292–294°C
 $\text{C}_{34}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_4$ (554,6) Ber.: C 73,63 H 4,72 Gef.: C 73,18 H 4,74.

Die Substanz hinterläßt beim Verbrennen einen klar schmelzenden Rückstand, in dem Zn^{+2} mit Merckoquant[®]-Zn-Test, als Zinkcyanoferrat(II) und als ZnS nachgewiesen wurde. — Der Zn-freie Farbstoff wird bereits in einem Patent der Fa. Bayer & Co. beschrieben [25].

⁶⁾ Die Vorschrift von P. Hofer u. R. Ott, Pharm. Acta Helv. 49, 35 (1974), konnten wir nicht nacharbeiten.

⁷⁾ B. L. Van Duuren et al., J. Med. Chem. 21, 26 (1978), beschreiben **IV** mit Schmp. 210–212°C. Die Autoren fanden für unsere Proben ähnlich hohe Schmp. und keine Depression im Misch-Schmp. — Automat. Bestimmung (Mettler FP 5) lieferte die Schmp. 193°C (Nadeln) bzw. 198°C (Spieße). — Zuverlässige Identifizierung durch ^1H -NMR.

⁷⁾ Alle IR-Spektren in KBr .

2.2. Umsetzung von III bzw. IV in menschlichem Serum

Da III und IV sehr schlecht benetzt werden, wurden 10 mg dieser Substanzen mit wenigen Tropfen Serum angerieben, die Suspensionen jeweils in 2 ml Serum eingebracht und dunkel unter N_2 (Ballonaufsatz) bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Nach 1/4, 1/2, 1, 2 und 4 h wurden je 0,2 ml entnommen, kurz zentrifugiert und in 2,0 ml eisgekühltes Aceton gegeben, um den größten Teil der Proteine zu fällen. Nach Zentrifugieren wurde der Aceton-Überstand i. Vak. eingedampft, der Rückstand in 8 Tr. $CHCl_3$ aufgenommen und dc in 2 Systemen untersucht: 1. Toluol/Aceton 8:2; 2. Toluol ohne Zusätze. Folgende Substanzen wurden identifiziert:

a) bei III:

nach jeder Zeit III; nach 1/4 h: X (sehr wenig); nach 1/2 h: V, VIII, X; nach 1 h: I, V, VIII, X; nach 2 und 4 h: gleiche Resultate wie nach 1 h.

b) bei IV:

Nach jeder Zeit IV, dazu I, V, VIII und X. Nach 1/2, 1, 2 und 4 h wurden zusätzlich VII, aber nicht IX gefunden.

2.3. Quantitative Bestimmungsmethode von I, V, VII, VIII, X und XI

Nach Vasilikiotis et al. [20] folgt V zwischen 4 und 20 ppm (0,4–2 mg/100 ml Lösungsmittel) dem Beer-Lambertschen Gesetz. Wir fanden bei den anderen o. a. Verbindungen, ausgenommen XI mit 0,8–4 mg/100 ml, ähnliche Konzentrationen. — Von jeder Verbindung wurden 5–6 Eichlösungen der o. a. Konzentrationen in $CHCl_3$ hergestellt und damit Eichgeraden aufgenommen (Punkte). Anschließend wurden die o. a. Substanzen dc getrennt (Glasplatten 20×20 cm, Kieselgel GF₂₅₄ nach Stahl, 0,3 mm, Cammaggerät). Die DC-Platten wurden vorgängig durch Entwickeln mit $MeOH/CH_2Cl_2$ 2:1 gereinigt, dann 1 h bei 100° C aktiviert.

Wegen der kleinen Strichlänge (15 mm) wurden Konzentrationen gewählt, die im Auftragsvolumen (50 μ l) die für die Meßlösung (2 ml) notwendigen Substanzmengen enthielten. Nach Auftragen der 50 μ l wurde entwickelt und unter dem Fön ohne Erwärmen getrocknet. Die Flecken wurden unter UV-Licht angezeichnet, ausgekratzt, in ein 10-ml-Rundkölbchen überführt, mit 5 ml $CHCl_3$ versetzt und auf dem Vortex-Genie-Schüttelapparat (Stufe 1) 1 min lang geschüttelt. Dann wurde auf einer Nutsche G 4 vom Kieselgel getrennt und die $CHCl_3$ -Lösung in einem 25-ml-Rundkölbchen aufgefangen. Kölbchen und Nutsche wurden mit 7 ml $CHCl_3$ portionsweise gewaschen und die vereinigten $CHCl_3$ -Extrakte i. Vak. bei 30° C eingengt, bei Anthronen unter Lichtausschluß. Nach Abdampfen wurde bei –20° C aufbewahrt, bis alle für eine Eichgerade notwendigen Konzentrationen vorhanden waren. Die Proben wurden in 2 ml $CHCl_3$ Uvasol® (Merck) gelöst und die Eichkurven aufgenommen (Kreise). Zwei Ergebnisse sind in den Abb. 3 u. 4 als Beispiele dargestellt*. Bei I werden dagegen, bedingt durch die hohe Zersetzlichkeit, große Unterschiede zwischen den Eichkurven aus Lösung und nach DC gefunden.

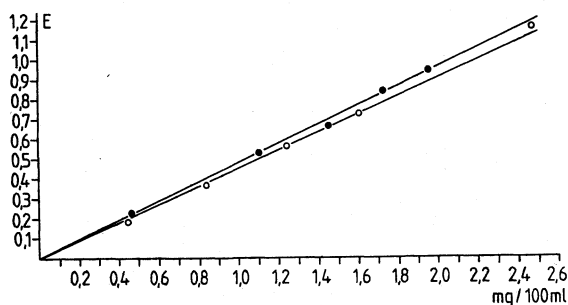


Abb. 3: 1,8-Dihydroxy-anthrachinon (Chrysazin) (V).

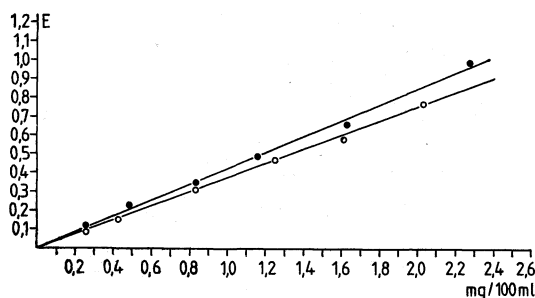


Abb. 4: 1,1',8,8'-Tetrahydroxy-10,10'-bianthron (VIII).

2.4. Ermittlung der Genauigkeit der quantitativen Bestimmungsmethode mit Testgemischen

Je 3 Testgemische mit den o. a. Substanzen wurden dc getrennt. Dabei stellte sich heraus, daß X und XI mit den Fließmitteln Toluol bzw. Toluol/Aceton 8:2 nicht hinreichend getrennt werden konnten, CH_2Cl_2 erwies sich als besser. VII wird aber im Fließmittel CH_2Cl_2 durch III und IV überlagert und mußte daher mit Toluol/Aceton 8:2 separat bestimmt werden, da III und IV nach 2.2 stets vorhanden sind. VII läßt sich auch mit CH_2Cl_2 nur schwierig von den anderen Substanzen trennen, daher die vergleichsweise starken Abweichungen vom theoretischen Wert.

Die 2 Werte mit der größten Abweichung aus jeweils 10 Versuchen wurden nicht berücksichtigt, aus den übrigen 8 wurde \bar{x} errechnet.

\bar{x} von	XI	= ± 5,9%
	XIII	= ± 5,7%
	I	= ± 7,2%
	X	= ± 4,0%
	VII	= ± 8,5%
	V	= ± 2,0%

2.5. Ablauf der Umsetzung von III und IV im Serum

Vgl. 2.2.: je 20 mg III bzw. IV wurden mit wenig Serum angerieben und mit 4 ml Serum vermischt. Nach den angegebenen Zeiten wurden je 0,7 ml Serum entnommen und kurz zentrifugiert, um III bzw. IV weitgehend zu entfernen. 0,6 ml Zentrifugat wurden zu 6 ml eiskaltem Aceton zugefügt, die dabei ausgefallenen Proteine abzentrifugiert, nochmals mit 6 ml eiskaltem Aceton 1 min auf dem Schüttelapparat geschüttelt und wieder zentrifugiert. Die Acetonauszüge wurden vereinigt. Da beim Abziehen i. Vak. Schaum entstand, wurden die Lösungen mit 12 ml Äthanol versetzt, so am Rotavapor eingedampft und bei –20° C aufbewahrt. — Direkt vor dem Auftragen wurden die Proben in 0,5 ml $CHCl_3$ gelöst und je 200 μ l auf 2 DC-Platten im N_2 -Strom aufgetragen. Eine Platte wurde in CH_2Cl_2 ohne Klimatisierung, die andere mit Klimatisierung in Toluol/Aceton 8:2 dunkel entwickelt. Anschließend wurde wie bei 2.3 vorgegangen. Wir erhalten mit diesem Verfahren keine absoluten Werte, da wir nicht festlegen können, wieviel von den Ausgangssubstanzen im Serum umgesetzt wurde.

3. Untersuchungen an 1,8,9-Trimethoxy-anthracen (XII)

3.1. Herstellung von (XII)

Durch das Gemisch von 800 ml Aceton (über $CaCl_2$ getrocknet), 36 ml Dimethylsulfat (entspr. 3 OH-Gruppen) und 32 g K_2CO_3 wurde während 15 min N_2 geleitet, um O_2 zu vertreiben. Dann wurde mit 8 g I unter N_2 (vgl. 1.1) 4 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Erkalten wurde anorganisches Material abgenutzt und die Lösung i. Vak. stark eingengt. Über Nacht fiel bei 4° C ein Rohprodukt aus, das einmal aus Benzol und zweimal aus Äthanol umkristallisiert wurde. Smp.: 173° C, Ausbeute 55%. (Technisches Dimethylsulfat läßt die Ausbeute auf unter 10% zurückgehen.) Methylierung mit Diazomethan analog [26] gelingt nicht.

UV-Spektrum: λ_{max}^{MeOH} 220 nm ($\log \epsilon = 4,14$); 257 (5,03); 369 (4,04); 384 (3,92); 404 (3,74); Anthracen-Typ.

Das MS von XII ist durch die Stabilität des Anthracen-Gerüsts charakterisiert: M^+ bei m/e 268 (91%) verliert 2 Methylgruppen (30 M.E.) zum Basepeak m/e 238, dem m/2e = 119 entspricht. $M^+ - CH_3$ bei m/e 253 erreicht nur 5% relative Intensität. Weitere Fragmente (< 20%) entstehen durch den Zerfall des Ringsystems.

$C_{17}H_{16}O_3$ (268,3) Ber.: C 76,10 H 6,01

Gef.: C 76,29 H 6,09

3.2. Verhalten von 1,8,9-Trimethoxy-anthracen (XII) gegenüber Serum

10 mg XII wurden analog 2.2 untersucht: Auch nach 4 h konnten dc keine Abbauprodukte festgestellt werden.

4. 10,10-Dialkylanthrone

4.1. 1,8-Dihydroxy-10,10-diallyl-9-anthron (XIV)

Enge Anlehnung an die Lit.-Vorschrift [22]: 1,5 l frisch destilliertes Aceton wurde zur O_2 -Entfernung in einem 3-Hals-Kolben 2 h unter N_2 -Spülung gekocht. Nach Abkühlen (alle Arbeiten streng unter N_2) wurden 33,9 g I (Handelsqualität) eingetragen und 27,3 g Allylbromid und 225 ml 1 N NaOH unter Rühren zugegeben. Gasdicht verschlossen, ließ man 20 h im Dunklen stehen. Die Lösung färbt sich währenddessen braun bis braunschwarz. Nach Zugabe von 500 ml Wasser wird Aceton i. Vak. weitgehend abdestilliert. Dabei fällt braunes Harz

aus. Überstehendes Wasser wird abgegossen, das Harz erneut in Aceton gelöst, mit Wasser verdünnt, Aceton i. Vak. entfernt. Diese Reinigung führt nach mehrfachem Wiederholen zu einem gelbbraunen Pulver, das mit Petroläther (Sdp. 90–100° C) 5mal extrahiert wird. Die Extrakte werden nicht vereinigt! Nach Einengen kristallisieren im Kühlschrank rote bis gelbgrüne Nadeln oder Würfel aus, deren Zusammensetzung dc (Kieselgel 60, F₂₅₄ „Merck“, Fließmittel CHCl₃, Rf ≈ 0,8) kontrolliert wird. Umkristallisation von XIV aus Methanol. Schmp. 174° C. Ausbeute an XIV 20–30%, stark schwankend. Zusatz von Hydrochinon, Erhitzen während der Umsetzung und Neutralisation mit HCl vor der Aufarbeitung sind ohne Vorteile. Die Rotfärbung ist durch V (Rf ≈ 0,7) bedingt. Enthält das Alkylierungsprodukt mehr als 10% V, so wird V sc an 100 g Kieselgel 60, 0,063–0,20 mm „Merck“/3 g Alkylierungsgemisch mit CHCl₃/CCl₄ 10 : 1 abgetrennt.

IR-Spektrum: 1630 cm⁻¹ (Carbonylbande), 1605 cm⁻¹ und 1590 cm⁻¹ (Aromat). — UV-Spektrum: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 258 nm (log ϵ = 3,95); 273 (3,89); 299 (4,03); 373 (4,01). — ¹H-NMR-Spektrum (60 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): 2,95 (d, J = 5,5 Hz, 4 H, 2 × —CH₂—); 4,4 — 5,4 (m, 6 H, olef. H); 6,8 — 7,9 (m, 6 H, arom. H). — MS: M⁺ = m/e 306 (19%) verliert 41 M.E. (C₃H₅) zu m/e 265 (100%); metastabiler Peak bei 229,45), der H₂O zu m/e 247 (51%) verliert. Peaks untergeordneter Intensität (< 10%) treten bei m/e 236, m/e 219 und m/e 201 auf. Keine nennenswerten Bruchstücke im Bereich der Massenzahlen unter 200.

C₂₀H₁₈O₃ (306,3) Ber.: C 78,41 H 5,92

Gef.: C 78,39 H 5,88.

4.2. 1,8-Dihydroxy-10,10-di-n-propyl-9-anthron (XV)

XIV wird in Eisessig gelöst und nach Zugabe von vorhydriertem PtO₂ bei Raumtemperatur und Normaldruck hydriert. Aufnahme 2 mol H₂. Umkristallisation aus Petroläther (90–110° C) unter Zusatz von Aktivkohle: braungelbe Kristalle: Schmp. 151–153° C.

IR-Spektrum: 1630 cm⁻¹ (Carbonylbande), 1615 und 1595 cm⁻¹ (Doppelbande, Aromat). — UV-Spektrum: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 258 nm (log ϵ = 3,95); 273 (3,89); 299 (4,03); 373 (4,01). — ¹H-NMR-Spektrum (60 MHz, CDCl₃, TMS) δ (ppm): 0,4 — 0,85 (m, mit t bei 0,47, —CH₂—CH₃); 2,05 (verbreitertes t, —C—CH₂—); 6,7 — 7,75 (m, arom. H.); 12,64 (s, OH-Gruppen). — MS: M⁺ = m/e 310 (31%) verliert 43 M.E. (C₃H₇) zum Basepeak m/e 267, der C₃H₈ zu m/e 225 (86%); metastabiler Peak bei 189,61), CO zu m/e 239 (8%) und Wasser zu m/e 249 (9%) abgespalten. m/e 225 verliert erwartungsgemäß CO zu m/e 197 (20%), außerdem CH₃ zu m/e 210 (6%). Bei m/e 165 tritt das Fluoren-Kation (8% relat. Intensität) auf.

C₂₀H₂₂O₃ (310,4) Ber.: C 77,40 H 7,14

Gef.: C 77,66 H 7,11

4.3. 1,8-Diacetoxy-10,10-di-n-propyl-9-anthron (XVI)

0,75 g XV wurden in 20 ml Acetanhydrid gelöst und mit 0,75 g frisch geglähtem Na-acetat 8 h unter Rückfluß erhitzt. Danach wurde das Acetanhydrid i. Vak. weitgehend abdestilliert, der Rückstand mit Wasser ausgewaschen und getrocknet. Umkristallisation aus Äthanol/Aktivkohle. Schmp. 198–200° C, Ausbeute: 0,48 g.

IR-Spektrum: 1755 cm⁻¹ (Ester), 1653 cm⁻¹ (Carbonylbande), 1595 cm⁻¹ (Aromat). — UV-Spektrum: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 212 nm (log ϵ = 4,36); etwa 245 Schulter (3,89); 273 (4,20), etwa 310 Schulter (3,61). — ¹H-NMR (60 MHz, CDCl₃, TMS) δ (ppm): 0,85 — 0,45 (m mit t bei 0,62 ppm, —CH₂—CH₃); 2,05 verbreitertes t, —C—CH₂—); 2,40 (s, CO—CH₃); 6,9 — 7,75 (m, arom. H).

C₂₄H₂₆O₅ (394,4) Ber.: C 73,07 H 6,64

Gef.: C 73,09 H 6,53

Literatur

- [1] Krebs, A., Schaltegger, H., *Dermatologica* (Basel) **131**, 1 (1965) — [2] Schaltegger, H., Krebs, A., Kuske, H., *Dermatologica* (Basel) **130**, 348 (1965) — [3] Krebs, A., Schaltegger, H., *Hautarzt* **20**, 204 (1969) — [4] Krebs, A., *Habilitations-Schrift*, Med. Fakultät, Universität Bern (1969) — [5] Hodara, M., *Mh. prakt. Dermat.* **30**, 53 (1900); **31**, 261 (1900); **32**, 381 (1901) — [6] Lutz, W., *Lehrbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten*, S. 61, Verlag Karger, Basel (1951) — [7] Nägeli, O., *Schweiz. med. Wschr.* **10**, 1197 (1929) — [8] Unna, P. G., *Derm. Wschr.* **62**, 116 u. 175 (1916) — [9] Weber, G., *Psoriasis vulgaris*; in: Riecke, E., *Lehrbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten*, Hrsg.: Bode, H. G., Korting, G. W., S. 80, Verlag Fischer, Stuttgart (1962) — [10] Ippen, H., *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **19**, 814 (1969) — [11] Schultz, O.-E., *Pharmazie* **5**, 605 (1950) — [12] Naylor jr., Ch. A., Gardner, J. H., *J. Amer. chem. Soc.* **53**, 4109 (1931) — [13] Nachlas, M. M., Seligman, A. M., *J. Nat. Cancer Inst.* **9**, 415 (1949) — [14] Pilz, W., *Arylesterasen*; in: *Methoden der enzymatischen Analyse*, Bd. I, 2. Aufl., S. 772; Hrsg.: Bergmeyer, H. U., Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. (1970) — [15] Pilz, W., *Die biochemischen Reagentien*; in: *Methoden der enzymatischen Analyse*, Abschn. D., 1. Aufl., S. 973, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1962) — [16] Ullrich, V., *Z. Naturforsch.* **24b**, 699 (1969) — [17] Vogt, E., Mühlemann, H., *Pharm. Acta Helv.* **46**, 657 (1971) — [18] Dimroth, O., Faust, Th., *Ber. dtsch. chem. Ges.* **54**, 3020 (1921) — [19] Schultz, O.-E., Schultze-Mosgau, H. H., *Arch. Pharm. (Weinheim)* **298**, 313 (1965) — [20] Vasilikiotis, G. S., Alexaki-Tzivanidou, H., *Mikrochem. J.* **17**, 655 (1972) — [21] Mahesh, V. B., Neelakantan, S., Seshadri, T. R., *J. Sci. Ind. Res. (India)* **15 B**, 287 (1956); ref. CA **51**, 3500 d. — [22] Schultz, O.-E., Schultze-Mosgau, H. H., *Arch. Pharm. (Weinheim)* **298**, 273 (1965) — [23] Auterhoff, H., Scherff, F. C., *Arch. Pharm. (Weinheim)* **293**, 918 (1960) — [24] Geiger, W., *Chem. Ber.* **107**, 2976 (1974) — [25] D.R.P. 38 802; Beilsteins *Handbuch der Organ. Chemie*, 4. Aufl., B. 16, S. 202 (Hauptwerk), Verlag Springer, Berlin (1933) — [26] Govindachari, T. R., Viswanathan, N., Pai, B. R., Ramachandran, V. N., Subramaniam, P. S., *Tetrahedron* **26**, 2905 (1970)

Danksagung

Den Firmen Siegfried, Zofingen, Ciba-Geigy, Basel, und Bayer, Leverkusen, gilt unser Dank für Dithranol bzw. 1,8,9-Triacetoxyanthracen, dem Schweizerischen Serum- und Impfinstitut, Bern, für Pool-Serum. Den Herren Prof. Schlunegger, Bern, und Dr. Mayer, Regensburg, danken wir für die Massenspektren.

Für die Verff.: Prof. Dr. W. Wiegrobe, Universität Regensburg, Fachbereich Chemie u. Pharmazie, Postfach 397, 8400 Regensburg 2