

wickelt zwei Chromatoplaten im Fliessmittel A; nach Zwischentrocknung (vgl. oben: Zweifachentwicklung) wird die Entwicklung im gleichen Fliessmittel in der gleichen Richtung wiederholt. Vor der Chromatographie in der zweiten Dimension werden beide Platten getrocknet (vgl. oben: Zweidimensionale Chromatographie); dann wird eine der Platten (Chromatogramm I) im Fliessmittel B aufsteigend und die zweite Platte (Chromatogramm II) durchlaufend im Fliessmittel C (3–4 Std. in der BN-Kammer¹⁴)¹⁸) entwickelt.

Zur Trennung der säurelöslichen DNP-Aminosäuren (Chromatogramm III) trägt man aus der Essigester/Eisessig/*n*-Butylalkohol-Lösung verschiedene Volumina, z. B. entsprechend 12,5, 25 und 50 μ l Sperma, auf die gleiche Platte auf. Zuletzt wird eine Modellmischung der säurelöslichen DNP-Aminosäuren aufgetragen. Die Chromatographie erfolgt eindimensional im Fliessmittel D.

Fliessmittel. A¹¹): Toluol/2-Chloräthanol/Pyridin/25-proz. Ammoniak (50:35:15:7 *v/v*). – B¹¹): Chloroform/Benzylalkohol/Eisessig (70:30:3 *v/v*). – C¹⁶): Chloroform/Methylalkohol/Eisessig (95:5:1 *v/v*)¹⁹). – D¹⁵): *n*-Butylalkohol mit 25-proz. Ammoniak bei Zimmertemperatur gesättigt.

SUMMARY

A thin-layer chromatographic method is described for separation and identification of free amino-acids in human ejaculate.

Laboratorium der Universitäts-Frauenklinik
(Direktor Prof. Dr. TH. KOLLER), Basel

¹⁸) Die Laufstrecken der Substanzen sind bei der Durchlaufchromatographie im Fliessmittel C oft unterschiedlich (vermutlich durch Schwankungen der Luftfeuchtigkeit; vgl. F. GEISS & H. SCHLITT, *Naturwiss.* 50, 350 (1963)). Manchmal besitzt deshalb Chloroform/Methylalkohol/Eisessig (98:2:1 *v/v*) bessere Trenneigenschaften.

182. Die Cardenolide von *Beaumontia grandiflora* WALLICH

2. Mitteilung: Strukturaufklärung von Wallichosid, Beaumontosid und Beauwallosid¹⁾

Glykoside und Aglykone, 250. Mitteilung²⁾

von A. F. KRASSO, Ek. WEISS und T. REICHSTEIN

(I. VI. 63)

Kürzlich wurde über die Isolierung von vier krist. Cardenolidglykosiden (A, B, C und D) aus den Samen von *Beaumontia grandiflora* WALLICH berichtet²⁾. Eines davon (D) war mit dem bekannten Oleandrin (VIII) identisch. Die drei andern waren neu und wurden als Wallichosid (A), Beaumontosid (B) und Beauwallosid (C) bezeichnet. Hier wird über ihre Konstitutionsermittlung berichtet.

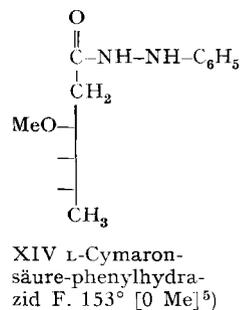
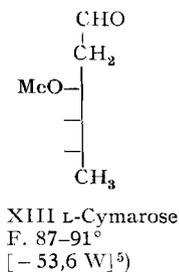
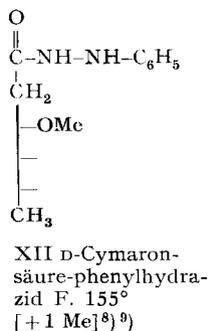
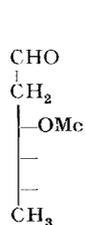
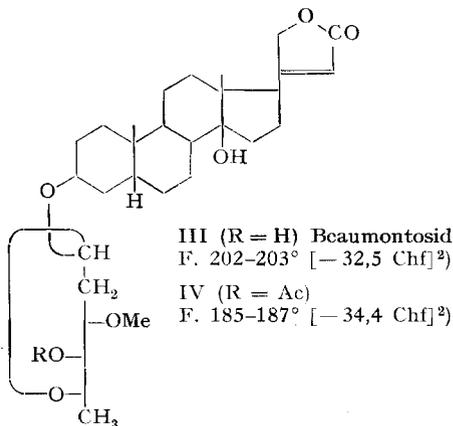
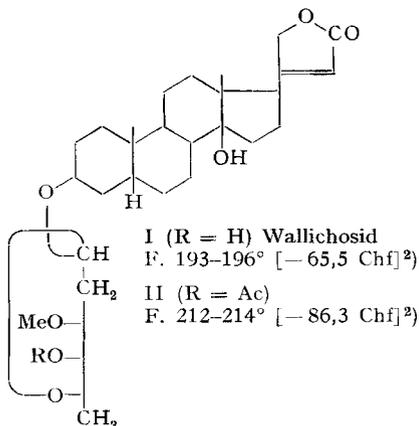
Alle drei Glykoside gaben positive Xanthidrol-Reaktion³⁾ und liessen sich dementsprechend bereits unter sehr milden Bedingungen hydrolysieren⁴⁾.

¹⁾ Auszug aus Diss. ANNA F. KRASSO, Basel 1963.

²⁾ 249. Mitteilung: A. F. KRASSO, Ek. WEISS & T. REICHSTEIN, *Pharmac. Acta Helv.*, im Druck.

³⁾ M. PESEZ, *Ann. pharmac. franç.* 70, 104 (1952), und frühere Lit. daselbst. Alle Glykoside von 2-Desoxyzuckern geben bei dieser Reaktion eine rote Färbung.

⁴⁾ Hydrolyse ausgeführt nach S. RANGASWAMI & T. REICHSTEIN, *Helv.* 32, 939 (1949).



⁵⁾ Exper. Teil dieser Arbeit.

⁶⁾ W. NEUMANN, Ber. deutsch. chem. Ges. 70, 1547 (1937). Konstitution und Konfiguration des Genins, vgl. J. A. MOORE, Helv. 37, 659 (1954), sowie H. HIRSCHMANN & F. B. HIRSCHMANN, J. Amer. chem. Soc. 78, 3755 (1956).

⁷⁾ D. A. PRINS, Helv. 29, 378 (1946), und frühere Lit. daselbst.

⁸⁾ R. C. ELDERFIELD, J. biol. Chemistry 117, 527 (1935).

⁹⁾ C. W. SHOPPEE & T. REICHSTEIN, Helv. 23, 990 (1940).

Wallichosid (I) lieferte bei milder saurer Hydrolyse krist. Digitoxigenin, das weiter als O-Acetylderivat charakterisiert wurde. Auch der Zucker liess sich kristallisieren. Es lag eine Mono-O-methyl-2,6-didesoxy-hexose vor. Aus Cardenolidglykosiden und verwandten Glykosiden sind bisher sechs raumisomere 3-O-Methyl-2,6-didesoxy-hexosen isoliert worden¹⁰⁾. Beim Vergleich der Eigenschaften¹⁰⁾ zeigte es sich, dass der Zucker aus Wallichosid mit keiner davon identisch war, dass es sich jedoch um den Antipoden der bekannten D-Cymarose (XI), also um L-Cymarose (XIII) handeln könnte. Dies liess sich durch Bereitung des Phenylhydrazids XIV der zugehörigen Säure bestätigen. Das Derivat XIV zeigte denselben Smp. wie die bekannte D-Form XII. Diese Derivate zeigen bei Na_D-Licht nur sehr schwache Drehungen. Beim gemeinsamen Umkristallisieren gleicher Teile beider Präparate wurden aber Kristalle erhalten, die bei 161–162°, also ca. 6° höher schmolzen als die optisch aktiven Formen. Es lag somit ein echtes Racemat vor. Die freien Zucker (XI und XIII) gaben dagegen bei der Mischprobe eine deutliche Depression. Von den 8 theoretisch möglichen Raumisomeren der Cymarose sind somit heute 7 bekannt; unbekannt ist lediglich noch L-Sarmentose.

Beaumontosid (III) gab bei der milden sauren Hydrolyse ebenfalls krist. Digitoxigenin. Der Zucker wurde nur papierchromatographisch als Oleandrose identifiziert. Da in den Samen auch Oleandrin (VIII) vorkommt, das sicher L-Oleandrose enthält, dürfte es sich beim Zucker aus Beaumontosid ebenfalls um die L-Form handeln, da noch nie in Cardenoliden die L- und die D-Form desselben Zuckers nebeneinander aufgefunden wurden. Für Beaumontosid kommt somit Formel III in Betracht; es unterscheidet sich demnach von Wallichosid (I) nur durch die räumliche Lage der Methoxylgruppe im Zuckeranteil.

Beauwallosid (V). Hier konnte die Hydrolyse nur im Mikromaßstab¹¹⁾ durchgeführt werden. Das Genin zeigte im Papierchromatogramm die Laufstrecke des Oleandrogenins⁶⁾ und der Zucker die der Cymarose. Aus den oben erwähnten Gründen dürfte es sich hier um L-Cymarose (XIII) handeln. Für Beauwallosid kommt somit Formel V in Betracht. Ein D-Cymaropyranosid von Oleandrogenin ist auch deswegen ausgeschlossen, weil dem bekannten Honghelosid A¹²⁾ eine solche Struktur zukommt und dieses von Beauwallosid nach den Kennzahlen sowie nach dem Papierchromatogramm²⁾ verschieden ist.

Die Eigenschaften des Beauwallosids stehen mit Formel V sehr gut in Einklang, besonders die positive Fluoreszenzreaktion nach PESEZ¹³⁾, eine starke Bande bei 8,1 μ im IR.-Spektrum (fest, in KBr), die für die Acetylgruppe charakteristisch ist. Im Einklang damit steht die Tatsache, dass Beauwallosid durch Einwirkung von KHCO₃ in wässrigem Methanol in genau gleicher Weise desacetyliert wird wie Oleandrin²⁾ und dabei offenbar in ein Desacetylderivat VI übergeführt wird, was sich im Papierchromatogramm leicht feststellen lässt.

¹⁰⁾ Vgl. die Zusammenstellung bei O. RENKONEN, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **42**, 182 (1959).

¹¹⁾ Ausführung nach HERB. JÄGER, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **42**, 977 (1959).

¹²⁾ A. HUNGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **33**, 76 (1950).

¹³⁾ A. PETIT, M. PESEZ, P. BELLET & G. AMIARD, *Bull. Soc. chim. France* [5] **77**, 288 (1950); P. BELLET, *Ann. pharmaceut. franç.* **8**, 471 (1950). Die Reaktion ist positiv bei allen 16-Hydroxy-, 16-Acetoxy- und 16-Dehydro-cardenoliden mit üblicher HO-Gruppe an C-14.

Wie eingangs erwähnt, wurde aus den Samen von *Beaumontia grandiflora* auch Oleandrin (VIII) isoliert. Beauwallosid (V) unterscheidet sich von letzterem ebenfalls nur durch die räumliche Stellung der Methoxygruppe im Zuckeranteil.

Nicht eindeutig bewiesen ist die Verknüpfung der Zucker; wir nehmen aber an, dass überall pyranoider Bindung vorliegt. In Übereinstimmung mit der Regel von KLYNE¹⁴⁾ liegt überall α -L-Konfiguration vor, wie dies aus den molekularen Drehungen (vgl. Tab. 1) hervorgeht.

Tabelle 1. Molekulare Drehungen

Glykosid [M] _D	zugehöriges Genin [M] _D	Differenz = Drehungs- beitrag des Zuckeranteils
Wallichosid (I) (518,67) - 339,6°	Digitoxigenin + 71,2° ¹⁵⁾	- 410°
Beaumontosid (III) (518,67) - 168,6°	+ 71,2°	- 239°
Beauwallosid (V) (576,71) - 465,2°	Oleandringenin ⁶⁾ - 42,4°	- 422°

Für α -Methyl-D-cymarosid wurde gefunden⁷⁾ [M]_D = + 370°, für α -Methyl-L-cymarosid ergibt sich daraus [M]_D = - 370°, was mit den Drehungsbeiträgen der L-Cymarose in I und V befriedigend übereinstimmt. Für den Drehungsbeitrag des α -L-Oleandroserestes wurde früher für Oleandrin und Desacetyl-oleandrin der Wert von - 263° bzw. - 228° gefunden¹¹⁾. Dies stimmt mit dem Drehungsbeitrag des Zuckeranteils im Beaumontosid ebenfalls sehr gut überein.

Die Herren Dr. CHEN und Dr. HENDERSON hatten die Freundlichkeit, die Toxizität der drei Glykoside an der Katze zu prüfen¹⁶⁾. Ihre Resultate sind in Tab. 2

Tabelle 2. Toxizität an der Katze bei intravenöser Infusion (je 10 Tiere)

Glykosid	Zusammengesetzt aus		Geometrisches Mittel der letalen Dosis in mg/kg ¹⁶⁾
	Genin	Zucker	
Somalin ¹⁷⁾	Digitoxigenin	D-Cymarose	0,2887 ± 0,0171 ¹⁸⁾
Wallichosid (I)	Digitoxigenin	L-Cymarose	0,2001 ± 0,0098
Honghcelosid A ¹²⁾	Oleandringenin	D-Cymarose	0,3871 ± 0,0251 ¹²⁾
Beauwallosid (V)	Oleandringenin	L-Cymarose	0,2002 ± 0,0130
Beaumontosid (III)	Digitoxigenin	L-Oleandrose	0,1734 ± 0,0113
Oleandrin (VIII) ⁶⁾	Oleandringenin	L-Oleandrose	0,3002 ± 0,0227 ¹⁹⁾

¹⁴⁾ W. KLYNE, *Biochem. J.* **47**, xli (1950).

¹⁵⁾ A. WINDAUS & G. STEIN, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **61**, 2436 (1928).

¹⁶⁾ Wir danken den Herren Dr. K. K. CHEN und Dr. F. G. HENDERSON, Indianapolis, auch hier bestens für die Ausführung dieser Bestimmungen und die Überlassung der Resultate. Es wurden für jedes Glykosid 10 Tiere eingesetzt.

¹⁷⁾ M. HARTMANN & E. SCHLITTLER, *Helv.* **23**, 548 (1940).

¹⁸⁾ J. C. HESS, A. HUNGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **35**, 2202 (1952).

¹⁹⁾ K. K. CHEN, R. C. ANDERSON & E. B. ROBBINS, *J. Amer. pharmac. Assoc.* **27**, 113 (1938); K. K. CHEN, *Annu. Rev. Physiol.* **7**, 677 (1945).

zusammengestellt, wo auch die früher von Dr. CHEN und Mitarbeitern gefundenen Werte für die entsprechenden D-Cymaroside sowie für Oleandrin (VIII) eingesetzt sind.

Es ist auffallend, dass L-Cymarose hier erstmals in einer Apocynacee aufgefunden wurde, die in Asien heimisch ist. Auch die L-Diginose¹⁰⁾ ist früher nur in einer asiatischen *Strophanthus*-Art aufgefunden worden²⁰⁾. Aus afrikanischen *Strophanthus*-Arten sind zahlreiche Cardenolidglykoside mit Diginose isoliert worden, wobei aber immer die D-Form vorlag.

Wir danken dem SCHWEIZ. NATIONALFONDS für einen Beitrag an die Kosten dieser Arbeit. Die eine von uns (A. K.) dankt ferner der Firma SANDOZ AG, Basel, und der DREYFUS-BRODSKY-STIFTUNG, Basel, für Stipendien, die ihr die Ausführung der Untersuchung ermöglichten.

Experimentelles. – Alle Smp. sind auf dem KOFLER-Block bestimmt und korrigiert; Fehlergrenze in benützter Ausführungsform bis 200° ca. $\pm 2^\circ$, darüber ca. $\pm 3^\circ$. Substanzproben zur Bestimmung der spez. Drehung wurden 1 Std. bei 60° und 0,01 Torr getrocknet. Abkürzungen: (Ac₂)O = Acetanhydrid, Ae = Diäthyläther, Be = Benzol, Bu = *n*-Butanol, Chf = Chloroform, Fmd = Formamid, Me = Methanol, Mek = Butanon, ML = eingedampfte Mutterlauge, Pchr = Papierchromatographie und Papierchromatogramm(e), Pe = Petroläther, Py = Pyridin, To = Toluol, W = Wasser. Verhältniszahlen bedeuten immer das Verhältnis der Volumina. Weitere allgemeine Angaben vgl. 2).

Hydolyse von Wallichosid (I). 188 mg I, nach früherer Vorschrift⁴⁾ hydrolysiert, gaben 141,2 mg rohes Genin und 52,8 mg destillierten Zucker (Molekularkolben, 30–110° Badtemp./0,01 Torr).

Digitoxigenin aus Wallichosid. Das rohe Genin gab aus Chf-Ae 104,9 mg farblose, zu Drusen vereinigte Prismen, Smp. 226–228°, $[\alpha]_D^{25} = +15,6^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,03$ in Me). Nach Misch-Smp., Farbreaktionen und Pchr (System Be/Fmd) identisch mit authentischem Digitoxigenin.

O-Acetyldigitoxigenin. 88 mg Digitoxigenin aus Wallichosid (ML von Kristallen) wurden in 2,0 ml abs. Py und 1,5 ml (Ac₂)O 48 Std. bei 20° stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung gab 97 mg neutrales Rohprodukt. Es wurde an 10 g SiO₂ chromatographiert. Die mit Chf-Me-(99:1) eluierten Anteile (93 mg) gaben aus Chf-Ae 60,7 mg farblose Prismen, Smp. 220–221°, $[\alpha]_D^{25} = +21,0^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,17$ in Chf). Nach Mischprobe identisch mit authentischem 3-O-Acetyldigitoxigenin.

L-Cymarose (XIII) aus Wallichosid (I). Der Zucker gab im Pchr. nur einen Fleck; die Laufstrecke in 2 Systemen (To-Bu-(4:1)/W und To-Mek-(1:1)/W)²¹⁾ war gleich wie diejenige von D-Cymarose. Der destillierte Zucker gab unter Feuchtigkeitsausschluss bei 0° Kristalle. Aus abs. Ae mit wenig Pe farblose Nadeln, Smp. 87–91°, $[\alpha]_D^{25} = -53,6^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,92$ in W), nach 5 Min. und nach 2 Std. gleich. Eine Mischung mit ungefähr gleichen Teilen krist. D-Cymarose (Smp. 83–90°) schmolz bei 78–80°.

L-Cymaronsäure-phenylhydrazid (XIV). 30,4 mg krist. L-Cymarose (XIII) wurden nach früherer Vorschrift⁹⁾ oxydiert und gaben 28,7 mg destilliertes L-Cymaronsäure-lacton. Es wurde mit 70 mg frisch dest. Phenylhydrazin 45 Min. auf 100° erhitzt, dann im Molekularkolben destilliert. Bei 0,01 Torr wurde bis 120° Badtemperatur ein Vorlauf (Phenylhydrazin) abgetrennt. Das Hydrazid XIV ging bei 0,01 Torr und 165° Badtemperatur über. Das Destillat (34,3 mg) gab aus Me-Ae farblose Nadeln, Smp. 153–154°, $[\alpha]_D^{24} = +0,3^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,68$ in Me). Trocknung zur Analyse 1 Std. bei 70° und 0,01 Torr über P₂O₅.

C₁₃H₂₀O₄N₂ (268,31) Ber. C 58,19 H 7,51 N 10,44% Gef. C 58,52 H 7,81 N 10,64%

Racemat XII + XIV. Das in gleicher Weise wie XIV frisch bereitete D-Cymaronsäure-phenylhydrazid (XII) zeigte Smp. 154–155°. Misch-Smp. mit XIV ohne Depression. 2,005 mg D-Form und 2,006 mg L-Form, zusammen aus Me-Ae kristallisiert, ergaben farblose Nadeln, Smp. 161–162°.

Hydolyse von Beaumontosid (III). 198 mg III vom Smp. 199–201° wurden wie oben hydrolysiert und gaben 151 mg rohes Genin sowie 29,5 mg destillierten Zuckersirup.

²⁰⁾ Sie dürfte auch in den Cardenolidglykosiden anderer asiatischen *Strophanthus*-Arten vorkommen, die aber heute sehr schwer zu beschaffen sind.

²¹⁾ O. RENKONEN & O. SCHINDLER, Helv. 39, 1490 (1956).

Digitoxigenin aus Beaumontosid (III). Das rohe Genin gab aus Chf-Ac 111,6 mg farblose, zu Drusen vereinigte Prismen, Smp. 243–246°, $[\alpha]_D^{23} = +15,8^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,4$ in Me). Nach Misch-Smp. und Pchr identisch mit authentischem Digitoxigenin.

Zucker aus Beaumontosid. Es gelang nicht, den Zucker in Kristallen zu fassen. Das rohe Destillat zeigte im Pchr in 2 Systemen (To-Bu-(4:1)/W und To-Mek-(1:1)/W) die Laufstrecke von authentischer L-Oleandrose.

Hydrolyse von Beauwallosid (V). Wegen Substanzmangel konnte die Hydrolyse nur im Mikromaßstab¹¹⁾ durchgeführt werden. Das Genin zeigte im Pchr (System Be/Fmd) die Laufstrecke des Oleandrigens. Der Zucker war nach Pchr identisch mit Cymarose.

Desacetylbeauwallosid (VI). Die Lösung von 50,1 mg Beauwallosid (V) vom Smp. 216–220° in 5 ml Me wurde mit der Lösung von 48 mg KHCO₃ und 2,5 mg K₂CO₃ in 2,5 ml W 4 Tage bei 20° stehengelassen. Nach Entfernung des Me im Vakuum wurde mit Chf ausgeschüttelt. Die mit wenig W gewaschenen und über Na₂SO₄ getrockneten Auszüge gaben beim Eindampfen 39,2 mg Rohprodukt. Aus Chf-Ac 22,3 mg Prismen, zum Teil in Drusen, Smp. 205–208°, $[\alpha]_D^{24} = -44,4^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,97$ in Me). Trocknung zur Analyse (5 Std. bei 100° und 0,01 Torr) gab 1,26% Gewichtsverlust.

C₃₀H₄₆O₈ (534,67) Ber. C 67,39 H 8,67% Gef. C 67,47 H 8,67%

Die Mikroanalysen wurden im Mikrolabor unseres Institutes von Herrn E. THOMMEN ausgeführt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Struktur der aus *Beaumontia grandiflora* WALLICH isolierten neuen Glykoside Wallichosid (A), Beaumontosid (B) und Beauwallosid (C) wurde ermittelt: Wallichosid (I) = Digitoxigenin- α -L-cymarosid, Beaumontosid (III) = Digitoxigenin- α -L-oleandrosid und Beauwallosid (V) = Oleandrigenin- α -L-cymarosid. Aus Wallichosid wurden nach milder saurer Hydrolyse sowohl das Genin als auch der neue Zucker krist. isoliert. Die Zucker von Beaumontosid und Beauwallosid sowie das Genin des letzteren wurden nur papierchromatographisch bestimmt. Von Beauwallosid wurde noch das Desacetylderivat = Gitoxigenin- α -L-cymarosid krist. bereitet.

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

183. Heilmittelchemische Studien in der heterocyclischen Reihe

42. Mitteilung¹⁾²⁾

2, 3, 4, 5-Tetrahydro-1, 4-benzoxazepine

von K. Schenker und J. Druey

(5. VI. 63)

Verbindungen mit dem 1,4-Benzoxazepin-Gerüst sind noch nicht lange bekannt; erst in jüngster Zeit sind einige davon in der chemischen Literatur beschrieben worden³⁾⁴⁾⁵⁾, darunter auch solche mit interessanten pharmakodynamischen Eigenschaften³⁾. Ausgangspunkte der Synthesen waren entweder Salicylalkohol³⁾⁴⁾ oder

¹⁾ Herrn Professor FRITZ KRÖHNKE zu seinem sechzigsten Geburtstag gewidmet.

²⁾ 41. Mitteilung: P. G. FERRINI & A. MARXER, Helv. 46, 1207 (1963).

³⁾ B. BELLEAU, U. S. Patent 2807628 (1957).

⁴⁾ L. M. MARSON, Il Farmaco, Ed. sci. 74, 159 (1959).