

as an internal standard. Solutions were prepared immediately before the measurements by dissolving weighed material in solvents at low humid condition.

Preparations

Schiff Base of Glycine (Potassium Pyridoxylidene-glycinate)—One mmole of pyridoxal was dissolved in 30 ml MeOH. To the pale yellow MeOH solution, MeOH solution of 1 mmole K glycinate was added slowly. The deep yellow mixture was stirred for 5 hr at room temperature and was evaporated to dryness under reduced pressure. The resulting yellow powder was recrystallized three times from MeOH. Very hygroscopic yellow crystals were obtained. *Anal.* Calcd. for $C_{10}H_{11}O_4N_2K$: N, 10.68. Found: N, 10.51.

Carbinolamine (Potassium N-(3-hydroxy-5-hydroxymethyl-2-methyl-4-pyridylhydroxymethyl)-sarcosinate)—Aqueous solution of sarcosine and an equimolar KOH was freeze-dried to give K sarcosinate. One mmole of the K salt dissolved in 20 ml MeOH was added to a MeOH solution of 1 mmole pyridoxal. The mixture, after sitting 1 hr at room temperature, was evaporated to dryness under reduced pressure. Pale yellow glassy material was obtained and was submitted for NMR study after verification of purity by UV spectra.

Cyclic Product from Histidine (Potassium 4-(3-Hydroxy-5-hydroxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)-4,5,6,7-tetrahydropyrido[3,4-c]imidazole-6-carboxylate)—One mmole of histidine hydrochloride was dissolved in MeOH containing two equimolar KOH. The K histidinate solution was added to one mmole MeOH solution of pyridoxal. The mixture immediately turned deep yellow but faded off in several hours. After stirring 24 hr, resulting colorless solution was concentrated in vacuum. White precipitate obtained was recrystallized twice from MeOH and twice from 80% MeOH to give white needles. *Anal.* Calcd. for $C_{14}H_{15}N_4K \cdot H_2O$: N, 15.54. Found: N, 15.60.

Thiazolidine Derivative (2-(3-Hydroxy-5-hydroxymethyl-2-methyl-4-pyridyl)thiazolidine)—In 10 ml MeOH, 1 mmole of cysteamine hydrochloride was dissolved and MeOH containing 1 equimolar KOH was added to the solution. After filtrating precipitated KCl, the filtrate was added to MeOH solution of 1 mmole pyridoxal. After stirring 1 hr at room temperature, the mixture was evaporated to dryness under reduced pressure. Obtained yellow powder was recrystallized three times from $CHCl_3$ to give colorless crystals. *Anal.* Calcd. for $C_{10}H_{14}O_2N_2S$: C, 53.07; H, 6.25; N, 12.38. Found: C, 53.08; H, 6.29; N, 12.62.

Acknowledgement The authors are indebted to Mr. T. Kondo of this Institute for NMR measurements and to the members of analytical laboratory, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, for elemental analysis. They also thank Dr. Ya. Karpeisky, Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of U.S.S.R. for discussion.

{Chem. Pharm. Bull.
16(11)2282-2286(1968)}

UDC 581.19 : 582.46 : 547.99

Sterische Struktur der Giftstoffe aus dem Fruchtfleisch von *Ginkgo biloba* L.

HIROSHI MORIMOTO, YUTAKA KAWAMATSU
und HIROSADA SUGIHARA

Forschungslaboratorien für Chemie, Takeda
Chemische Industrien A.G.¹⁾

(Eingegangen am 7. Juni 1968)

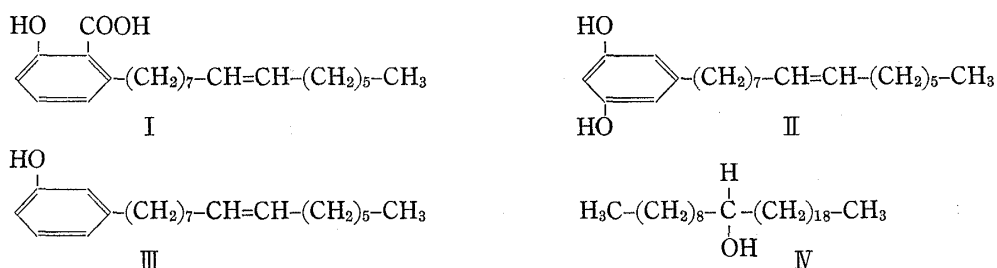
Als Giftstoffe des Fruchtfleisches von *Ginkgo biloba* L., die starke Hautentzündung hervorrufen, wurden die Ginkgolsäure (I) und Bilobol (II) vor etwa vierzig Jahren von Kawamura isoliert,²⁾ und deren Struktur mit Ausnahme der geometrischen Konfiguration an einer Doppelbindung in der Seitenkette von Furukawa aufgeklärt.³⁻⁶⁾

- 1) Standort: Juso-Nishino-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.
- 2) J. Kawamura, *Japan J. Chem.*, **3**, 89 (1928).
- 3) S. Furukawa, *Sci. Papers Inst. Phys. Chem. Res.*, **24**, 304 (1934).
- 4) S. Furukawa, *Sci. Papers Inst. Phys. Chem. Res.*, **24**, 314 (1934).
- 5) S. Furukawa, *Sci. Papers Inst. Phys. Chem. Res.*, **24**, 320 (1934).
- 6) S. Furukawa, *Sci. Papers Inst. Phys. Chem. Res.*, **26**, 178 (1935).

Die Autoren haben nun versucht, die unklaren Konfigurationen durch spektrometrische Untersuchungen zu ermitteln. Die Früchte von *Ginkgo biloba* L. wurden mit Methanol extrahiert und ausgearbeitet, wie in Experimentelles dargestellt, wobei die drei ätherischen Auszüge (Fraktion I—III) erhalten wurden.

Fraktion I war ein dunkelrotes Öl und bildete einen Hauptbestandteil der ätherischen Auszüge, in dem dünnschichtchromatographisch hauptsächlich zwei Substanzen A und B nachweisbar waren.

Die Substanzen A und B wurden durch Chromatographieren der Fraktion I rein erhalten und durch Schmelzpunkte, Elementaranalysen, sowie IR-, NMR- und Massenspektren als Substanzen I bzw. II aufgeklärt.



Schema 1

Die Fraktion II war ein braunes Öl, in dem dünnschichtchromatographisch hauptsächlich zwei Substanzen C und D nachgewiesen und chromatographischen Reinigungen unterworfen wurden. Dabei wurde die Substanz C als farbloses Öl rein erhalten. Durch die chemischen und physikalischen Daten konnte geschlossen werden, dass es sich bei C um Ginkgol (III) handelte, welches aus I nach einer Decarboxylierung abgeleitet worden war.^{2,9)} Das Verfahren zur Isolierung von III war hierbei relativ mild. Daraus kann man mit grosser Wahrscheinlichkeit schliessen, daß III nicht ein von I in Laufe der Isolierung gebildetes Artefakt, sondern ein Naturstoff ist.

Die Substanzen I, II und III stellen die giftigen Bestandteile dar und wurden aus den frischen Früchten in einer Ausbeute von 0.33, 0.12 bzw. 0.06% isoliert.

Es ist bekannt, daß sich das NMR-Spektrum zur Klärung der geometrischen Konfiguration der Doppelbindung als besonders geeignet erwiesen hat.^{7,8)} Nach der chemischen Verschiebung und Kopplungskonstanten kann man eine isolierte Doppelbindung von Typ -CH=CH- in aliphatischer Offenkette der *cis*- oder *trans*-Konfiguration zuordnen. Dabei sind die *cis*-Protonen als typisches Triplett bei *ca.* 4.70 τ ersichtlich, hingegen die *trans*-Protonen als breites Multipllett. Ferner zeigt *trans*-Doppelbindung im IR-Spektrum eine charakteristische γ -Schwingung bei *ca.* 970 cm^{-1} , jedoch fehlt dieser der *cis*-Konfiguration, wie man in der Tabelle I einige Beispiele ersehen kann.

Die Substanzen I, II und III zeigen in ihren NMR-Spektren ein Signal bei 4.76, 4.74 bzw. 4.67 τ als Triplett mit $J=5$ cps (Abb. 1) und in ihren IR-Spektren keine Bande der *trans*-Doppelbindungen. Deshalb schliesst man, daß die geometrischen Konfigurationen der Doppelbindungen der Substanzen I, II und III *cis*-Konfiguration haben.

Die Substanz D aus der oben erwähnten Fraktion II wurde nach den chemischen und physikalischen Daten als Substanz IV festgestellt, die zuerst von Kawamura²⁾ aus demselben Fruchtfleisch als Ginnol gefunden, danach aus den Äpfelschalen⁹⁾ als (+)-10-Nonacosanol identifiziert wurde.^{2,9)} Dabei wurde eine gewaltige Stützung für die Struktur durch das Massenspektrum erhalten, in dem neben einem Molekularpeak (M) die für sekundäre Alkohole charakteristischen Peaks, (M-H₂O, M-C₉H₁₉, M-C₁₉H₃₉) deutlich ersichtlich sind.

7) C.R. Smith, Jr., T.L. Wilson, R.B. Bates und C.R. Scholfield, *J. Org. Chem.*, **27**, 3112 (1962).

8) S.A. Barker, A.B. Foster, D.C. Lamb und L.M. Jackman, *Tetrahedron*, **18**, 177 (1962).

9) A.C. Chibnall, S.H. Piper, A. Pollard, J.A.B. Smith und E.F. Williams, *Biochem. J.*, **25**, 2095 (1931).

TABELLE I. NMR-Signal und IR-Bande der Isolierten Doppelbindung

| | NMR ^{a)} | | | IR cm ⁻¹ |
|---|-------------------|---|---------|------------------------|
| | τ | | J cps | |
| I | 4.76 | t | 5 | — ^{b)} |
| II | 4.74 | t | 5 | — ^{b)} |
| III | 4.67 | t | 5 | — ^{b)} |
| <i>cis</i> -Substanz | | | | |
| Erucasäure CH ₃ -(CH ₂) ₇ -CH=CH-(CH ₂) ₁₁ -COOH | 4.75 | t | 5 | — ^{b)} |
| Ölsäure CH ₃ -(CH ₂) ₇ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -COOH | 4.64 | t | 5 | — ^{b)} |
| Linolsäure CH ₃ -(CH ₂) ₄ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -COOH | 4.65 | t | 5 | — ^{b)} |
| Linolensäure-methylester CH ₃ -(CH ₂ -CH=CH) ₃ -(CH ₂) ₇ -COOCH ₃ | 4.62 | t | 5 | — ^{c)} |
| <i>trans</i> -Substanz | | | | |
| Vaccensäure CH ₃ -(CH ₂) ₅ -CH=CH-(CH ₂) ₉ -COOH | 4.60 | m | | 965 ^{b)} |
| Elaidinsäure CH ₃ -(CH ₂) ₇ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -COOH | 4.58 | m | | 965 ^{b)} |
| <i>trans</i> -2-Buten-1,4-dicarbonsäure HOOC-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -COOH | 4.16 | m | | 975 ^{d)} |
| 1,4-Dichlor- <i>trans</i> -2-buten Cl-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -Cl | 4.07 | m | | — ^{e)} |

a) Es wurden die folgenden Abkürzungen benutzt: t (Triplet), m (Multipl.)

b) Aufgenommen in diesem Institut. Die Apparate und Bedingungen sind bei den Abbildung 1 angegeben.

c) Varian NMR-Spectra Catalog, No. 337

d) The Sadtler Standard Spectra, No. 25851 (IR), No. 823 (NMR)

e) Varian NMR-Spectra Catalog, No. 404

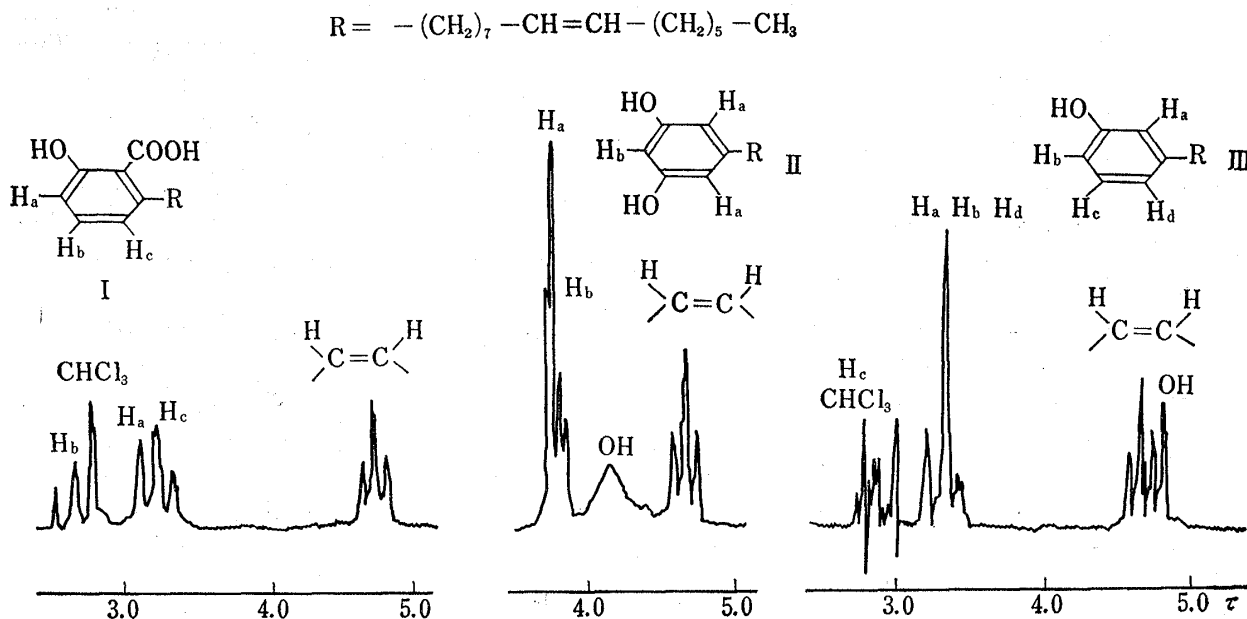


Abb. 1. Teilstücke von NMR-Spektren

Die NMR-Spektren wurden mit dem Varian-Instrument A-60 in CDCl₃ und Tetramethylsilan als innerer Standard gemessen. Die Zuordnung der aromatischen Protonen beruht auf der Literatur.¹⁰⁾

10) J.A. Ballantine und C.T. Pillinger, *Tetrahedron*, **23**, 1691 (1967).

Experimentelles

Alle Schmp. sind im Flüssigkeitsbad bestimmt und nicht korrigiert. Zur Elementaranalyse wurde die Probe 20 Stdn. lang bei Raumtemperatur über P_2O_5 im Vakuum getrocknet. Zur Entfernung des Lösungsmittels diente ein Umlaufverdampfer. Für die Dünnschichtchromatographie verwendet man 10 g Kieselgel G (Merck) als Träger je Platte (20×20 cm). Die Flecke wurden mit konz. H_2SO_4 sichtbar gemacht. Die IR-Spektren wurden als Film mit dem Hitachi Spektrographen EPI-S2 aufgenommen. Die Massenspektren wurden mit dem doppelfokussierenden Massenspektrometer Hitachi RMU-6D mit Direkteinlaßsystem aufgenommen. Die Ionenquellentemperatur betrug 200° , die Ionisierungsenergie 80 eV.

Herstellung der Ätherauszüge—Frische Früchte (31 kg) von *Ginkgo biloba* L., die in der Provinz Kyoto im Oktober gesammelt worden waren, wurden mit Methanol (35 Liter) bei 20° , 100 Stdn. lang extrahiert. Der methanolische Auszug wurde im Vakuum auf 8 Liter eingeeengt, wodurch sich das Methanol nahezu entfernen ließ. Die übriggebliebene wässrige Lösung wurde mit Äther (4, 4, 2 Liter) ausgeschüttelt. Die ätherische Schicht wurde mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Das übriggebliebene dunkelrote Öl (279 g) wurde in Äther (1 Liter) aufgelöst und mit 5% Na_2CO_3 (fünfmal je 500 ccm) ausgeschüttelt. Die Na_2CO_3 -Schicht wurde mit 5% HCl angesäuert und mit Äther (dreimal je 500 ccm) ausgeschüttelt. Die ätherische Schicht ergab nach Eindampfen des Lösungsmittels einen sauren Anteil (Frak. III: 9.2 g). Der oben mit Alkali ausgeschüttelte ätherische Auszug wurde erneut mit 5% NaOH (1 Liter, dreimal je 100 ccm) ausgeschüttelt. Die zurückgebliebene ätherische Schicht ergab nach Eindampfen des Lösungsmittels ein hellgelbes Öl (Frak. II: 57.5 g). Die NaOH-Schicht wurde mit 5% HCl angesäuert und mit Äther (sechsmal je 500 ccm) ausgeschüttelt. Die ätherische Lösung wurde mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und abdestilliert, wobei ein dunkelrotes Öl (Frak. I: 207 g) erhalten wurde.

Die Fraktion I zeigte in einem Dünnschichtchromatogramm mit Fließmittel, $CHCl_3$ -Äther (5:1), zwei Substanzen A und B. 5 g der Fraktion I wurden an 100 g Kieselgel (Säule: 20×2 cm) chromatographiert (Chromatographie I).

Chromatographie I

| Fr. | Fließmittel | (ccm) | Rückstand (g) |
|-----|-----------------------|-------|---------------|
| 1 | $CHCl_3$ -Äther (5:1) | 150 | 2.84 |
| 2 | $CHCl_3$ -Äther (5:1) | 270 | 0.9 |
| 3 | $CHCl_3$ -Äther (5:1) | 300 | 0.2 |
| 4 | Methanol | 200 | 0.278 |
| 5 | 50% Methanol | 100 | 0.03 |

Ginkgolsäure (I)—Die Fraktion 1 von Chromatographie I wurde an 60 g Kieselsäure (Mallinckrodt: 100 mesh) (Säule: 20×3 cm) mit $CHCl_3$ chromatographisch gereinigt. Die hierbei erhaltenen Kristalle ergaben nach dem Umkristallisieren aus Petroläther farblose Nadeln vom Schmp. $41-42^\circ$. Ausbeute 2.5 g (0.33%). IR ν_{max}^{film} cm^{-1} : 1645 (COOH), 1610 (aromat. Ring). $C_{22}H_{34}O_3$ (mol. Gew., 346.49)—Ber.: C, 76.26; H, 9.89. Gef.: C, 76.33; H, 9.68.

Dihydro-I: Die Substanz I (1 g) wurde in 5 ccm Methanol mit PtO_2 katalytisch hydriert. Das Hydrierungsprodukt kristallisierte aus Petroläther als farblose Nadeln vom Schmp. 86° . Ausbeute 1 g. $C_{22}H_{36}O_3$ (mol. Gew., 348.51)—Ber.: C, 75.81; H, 10.41. Gef.: C, 75.84; H, 10.20.

Bilobol (II)—Die Fraktion 2 von Chromatographie I ergab nach dem Umkristallisieren aus Petroläther farblose Nadeln vom Schmp. 36° . Ausbeute 900 mg (0.12%). IR ν_{max}^{film} cm^{-1} : 3350 (OH), 1630, 1600 (aromat. Ring). $C_{21}H_{34}O_2$ (mol. Gew., 318.48)—Ber.: C, 79.19; H, 10.76. Gef.: C, 79.18; H, 10.59.

Dihydro-II: Die Substanz II (500 mg) wurde in 20 ccm Äthanol mit PtO_2 katalytisch hydriert. Das Hydrierungsprodukt kristallisierte aus Äthanol- H_2O als farblose Blättchen vom Schmp. $88-89^\circ$. Ausbeute 370 mg.

II-Dimethyläther: Die Substanz II (500 mg) wurde in C_2H_5ONa gelöst, das aus Na (200 mg) und Äthanol (4 ccm) hergestellt war, mit CH_3J (1.2 g) versetzt und unter Rückfluß 2 Stdn. lang gekocht. Die Reaktionsmischung wurde mit 5% HCl angesäuert und mit Äther (viermal je 40 ccm) ausgeschüttelt. Die ätherische Schicht ergab nach Eindampfen des Lösungsmittels ein braunes Öl (580 mg). Dieses wurde an 10 g Kieselgel mit Hexan-Äther (98:2) chromatographisch gereinigt, wobei ein farbloses Öl erhalten wurde. Ausbeute 80 mg.

Dihydro-II Dimethyläther: Dihydro-II (500 mg) wurde in 100 ccm 30% NaOH mit 4 ccm Dimethylsulfat einige Minuten lang bei Raumtemperatur umgerührt. Hierauf wurden 20 ccm 20% NaOH zugesetzt und 2 Stdn. lang unter Rückfluß gekocht. Nach dem Erkalten wurde die Reaktionsmischung mit 100 ccm H_2O versetzt und mit Äther (dreimal je 30 ccm) ausgeschüttelt. Die ätherische Schicht ergab nach Eindampfen

des Lösungsmittels ein braunes Öl (500 mg). Dieses wurde an 20 g Kieselgel mit Hexan-Äther (98:2) chromatographisch gereinigt, wobei farblose Nadeln vom Schmp. 53° (Petroläther) erhalten wurden: Ausbeute 210 mg.

Ginkgol (III)—Die Fraktion II (5.5 mg) wurde an 300 g Kieselgel (Säule: 50 × 2.5 cm) mit CHCl₃ chromatographisch gereinigt, wobei ein farbloses Öl vom Sdp₁ 180° erhalten wurde. Ausbeute 1.8 g (0.06%). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$ cm⁻¹: 3400 (OH), 1600 (aromat. Ring). C₂₁H₃₄O (mol. Gew., 302.48)—Ber.: C, 83.38; H, 11.33. Gef.: C, 83.27; H, 11.27.

(+)-10-Nonacosanol (IV)—Die Fraktion, aus der bei der oben erwähnten Chromatographie der Fraktion II mit CHCl₃ vorher die Substanz III eluiert war, ergab farblose Nadeln vom Schmp. 84° (Äthanol). Ausbeute 180 mg (0.006%). $[\alpha]_{\text{D}} \pm 0^\circ$ ($c=1.0$, CHCl₃). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$ cm⁻¹: 3400 (OH). C₂₉H₆₀O (mol. Gew., 424.77)—Ber.: C, 81.99; H, 14.24. Gef.: C, 81.65; H, 14.30.

Anerkennung Die Autoren möchten den Herren des botanischen Gartens dieser Firma, besonders Herrn R. Hatta, für die Beschaffung der Früchte von *Ginkgo biloba* L., sowie den Damen und Herren in der physikochemischen Abteilung, die die Elementaranalysen und die Aufnahmen der Spektren durchgeführt haben, herzlichst danken.

[Chem. Pharm. Bull.]
16(11)2286—2288(1968)

UDC 547.963.32.07 : 547.854.4.07

A Direct Synthesis of 3',5'-Di-O-acetyl-O²,2'-cyclouridine

YOSHIYASU FURUKAWA and MIKIO HONJO

*Chemical Research Laboratories, Research and Development
Division, Takeda Chemical Industries, Ltd.¹⁾*

(Received March 27, 1968)

O²,2'-Cyclouridine (I) has received considerable attention as an intermediate in the chemical modification of the ribose or uracil moiety of uridine.²⁾ Walwick, *et al.* synthesized I from uridine by heating it with polyphosphoric acid, followed by dephosphorylation of the resulting O²,2'-cyclouridine-3',5'-di-O-polyphosphate (II) with prostatic phosphatase.³⁾ The method, however, has some drawbacks in that the purification of II is troublesome and that the enzymatic dephosphorylation of II to I does not give a satisfactory yield.⁴⁾

We attempted to find a phosphorylating reagent superior to polyphosphoric acid used in the above-mentioned Walwick's method. A solution or suspension of uridine in dimethylformamide, toluene or ethyl acetate was heated under various conditions with one of the phosphoric acid derivatives, such as *ortho*-phosphoric acid, phosphorus oxychloride, phosphorus trichloride, phosphorus pentachloride, monophenyl phosphorodichloridate and diphenyl phosphorochloridate. No shift of the absorption maximum (at pH 2) of the resulting reaction mixture was observed in all experiments with only one exception where a suspension of uridine in ethyl acetate was heated with partially hydrolyzed phosphorus oxychloride.⁵⁻⁷⁾ The reaction mixture, after desalting with activated charcoal treatment, was subjected to paper

1) Location: *Juso, Higashiyodogawa-ku, Osaka.*

2) A.M. Michelson, "The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides," Academic Press, New York and London, 1963, p. 15.

3) E.R. Walwick, W.K. Roberts and C.A. Dekker, *Proc. Chem. Soc.*, 1959, 84.

4) We used a phosphatase of *Phytophthora infestans* IFO 4872 available in quantities.

5) Formation of I from uridine results in shift of absorption maximum, because the maxima of uridine and I are 262 m μ and 250 m μ , respectively.

6) A.F. Leo and G.F. Walter, U.S. Patent 2610177 (1952).

7) No shift was observed when partially hydrolyzed phosphorus trichloride was used.