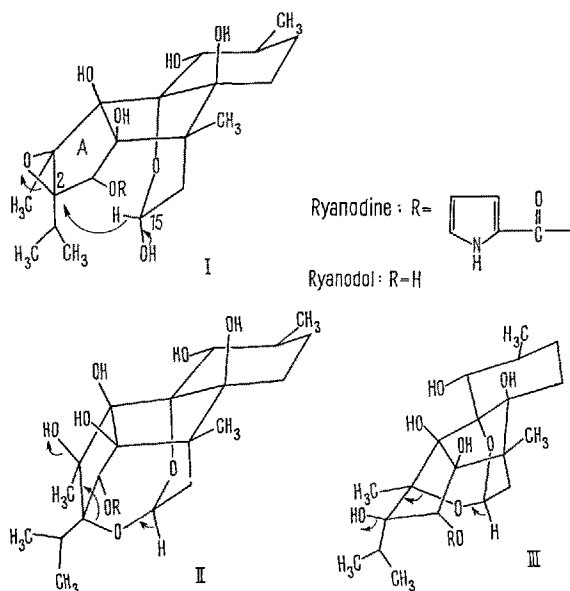


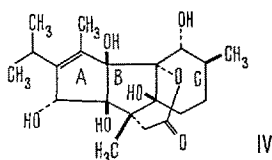
ADDENDUM

The Complete Structure of Ryanodine

A short time ago¹, we rationalized the complex chemistry of ryanodine in terms of the three structures I, II and III.



We have now found that ryanodol is distinctly acidic ($pK = 11.8-12$) and that it yields, with aqueous alkali and dimethyl sulphate, an amorphous but chromatographically homogeneous monomethyl derivative (NMR singlet $[3H]$ at 6.64 τ). This compound is neutral and yields anhydroryanodol IV² on treatment with aqueous acid.



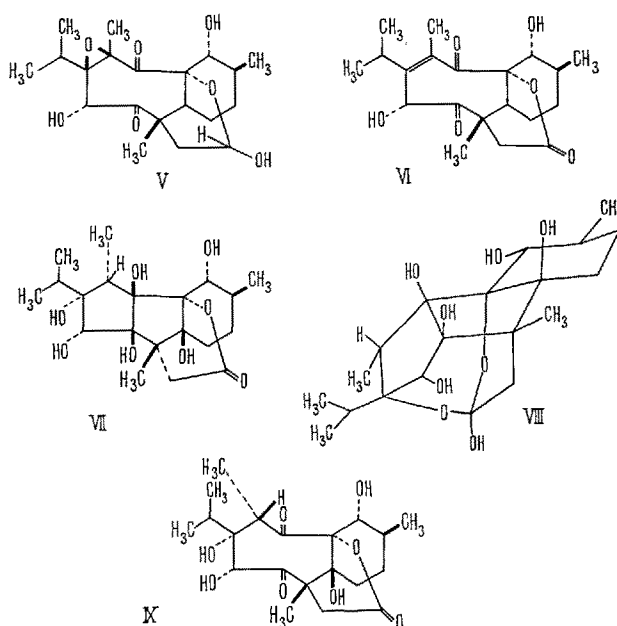
Thus, it is clear that an acidic hydroxyl of ryanodol was methylated and it is this same hydroxyl which is lost in the rearrangement to IV². Consequently, we may eliminate structures II and III and are left only with formula I which can rationalize all our hitherto known data including the new finding.

Using formula I, it must be assumed that the anhydro rearrangement which yields IV involves a hydride transfer from C₁₅ to C₂ which is made possible by the favourable and rigid stereochemistry of I.

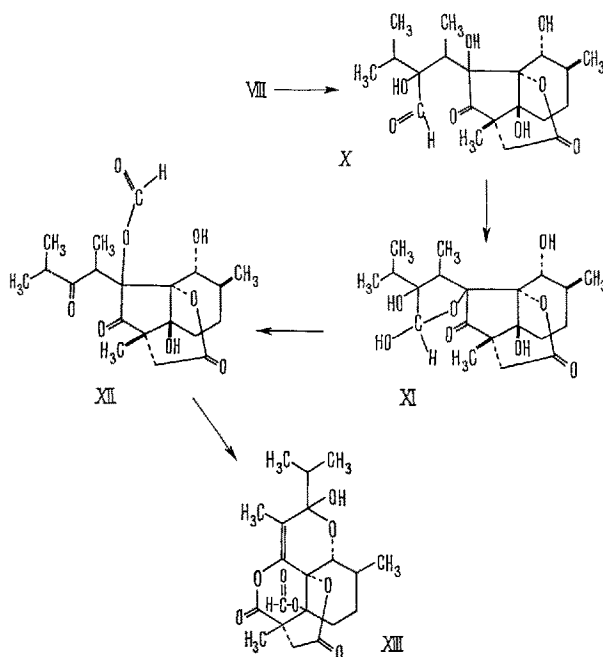
We have now, however, ascertained that the anhydro rearrangement proceeds also in the monosecoryanodol series¹ which no longer has this rigid steric structure. Thus, monosecoryanodol (formulated on the basis of I as V) yields, on acid treatment, secoanhydroryanodol VI, identical with the compound obtained by periodate cleavage of IV³. While this finding does not exclude I as the structure of ryanodol, it somewhat weakens our confidence in this formulation.

Thus, it becomes necessary to consider again a structure which explains a great part of the evidence in a remarkably simple fashion and which is related to the rigorously known² structure of anhydroryanodol IV in a trivial manner.

The simplest formulation of ryanodol on the basis of IV is VII, which represents the anhydro reaction as a simple dehydration of a tertiary hydroxyl. While ryanodol does not show a lactone carbonyl, this grouping may be masked since the compound may exist as the tautomer VIII analogous to tetrodotoxine⁴. Formula VIII seemed eliminated by the isoryanodol series¹ and thus was not discussed in our analysis of the ryanodol data¹. However, VIII readily explains both the acidity and methylation of ryanodol and the conversion of monosecoryanodol (formulated on the basis of VIII as IX or its tautomer) into VI by acid.



The rigorously deduced structure XIII¹ for the cleavage product of ryanodol with 3 mols of periodate may be



obtained from VIII in a more simple manner than from I. The mechanism of formation of the intermediate XII is self-explanatory and the conversion of XII to XIII has been already discussed in detail in our recent paper¹.

Thus, we find that the ryanodol formula VIII explains all rigorously established degradation series (anhydro, monoseco, trisecho) in a remarkably simpler manner than the ryanodol formula I. It has to be consequently considered that the series of isoryanodol which in its present formulation¹ is completely incompatible with formula VIII may be misleading and incorrectly formulated.

Also, the complex NMR data on ryanodine and ryanodol which favour oxygen substitution on all carbons of ring A (formula I)¹ have to be weighed against the simpler chemical pathways provided by formula VIII.

Zusammenfassung. Die Orthoesterstruktur VIII erklärt die Bildung der Verbindungen IV, VI und XIII, deren Struktur einwandfrei gesichert ist, auf eine ausserordent-

lich einfache Art und kann deswegen als eine Möglichkeit für Ryanodol nicht ausgeschlossen werden.

J. ŠANTROCH, Z. VALENTA,
and K. WIESNER

*Department of Chemistry, University of New Brunswick,
Fredericton (New Brunswick, Canada),
August 30, 1965.*

¹ D. R. BABIN, T. BÖGRI, J. A. FINDLAY, H. REINSHAGEN, Z. VALENTA, and K. WIESNER, *Exper.* 27, 425 (1965).

² D. R. BABIN, T. P. FORREST, Z. VALENTA, and K. WIESNER, *Exper.* 18, 549 (1962). – See also K. WIESNER, XIXth International Congress of Pure and Applied Chemistry, London (Butterworths, 1963), p. 285.

³ D. R. BABIN, J. A. FINDLAY, T. P. FORREST, F. FRIED, M. GÖTZ, Z. VALENTA, and K. WIESNER, *Tetrahedron Letters* No. 15, 31 (1960).

⁴ R. B. WOODWARD, Special Lecture at the 3rd International Symposium on Chemistry of Natural Products at Kyoto (Japan) (Butterworths, London 1964), p. 49.

PRO EXPERIMENTIS

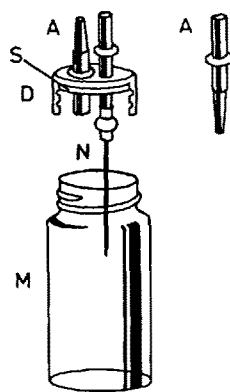
Eine einfache Technik für die Absorption von $^{14}\text{CO}_2$ und dessen direkte Messung im Flüssigkeits-Szintillationszähler

Seit Einführung der Flüssigkeits-Szintillationszählung werden bei Stoffwechseluntersuchungen mit ^{14}C -markierten Substanzen nicht-wässrige CO_2 -Absorptionsgemische bevorzugt¹⁻⁴, welche nach dem Zusatz eines Szintillators direkt im Szintillationszähler gemessen werden können. In Stoffwechselapparaturen für kleine Tiere^{4,5}, Apparaturen für die Perfusion isolierter Organe⁶, sowie für Inkubationsversuche⁷, bietet die direkte Verwendung von Messgläsern für den Szintillationszähler als CO_2 -Absorptionsgefässe grosse Vorteile.

In diesem Laboratorium hat sich folgendes Vorgehen bewährt (vgl. Figur): Der Deckel (D) des Messgläschens für den Szintillationszähler (Packard Instrument Co., Inc.) wird mit 2 symmetrisch angeordneten Bohrlöchern von 4,0 bzw. 4,4 mm Durchmesser, in einem Abstand von 6 mm, versehen. In den Bohrlöchern werden 2 Polyamid-ansatzstücke (A) für Infusionsnadeln⁸ befestigt⁹; das konische Ende ist bei dem einen nach aussen (4,4 mm-Loch), bei dem andern nach innen (4,0 mm-Loch) gerichtet. An letzterem wird eine 50 mm lange Injektionsnadel No. 1 (N) angesetzt, die als Eingangsrohr des Absorptionsgefässes dient. Anstelle der Korkdichtung wird im Deckel (D) eine entsprechend zweifach gebohrte, 1,5 mm dicke Scheibe (S) aus weichem Gummi eingeklebt. In das Messgläschen (M) werden 11 ml eines CO_2 -Absorptionsgemisches (Tabelle I) pipettiert.

Vor dem Schliessen wird der Rand des Messgläschens zur besseren Abdichtung mit Vaseline dünn bestrichen. Das durchströmende Gas muss mittels einer Kühl- oder Schwefelsäurefalle von Wasserdampf befreit werden. Bei Verwendung von methanolhaltigen Absorptionsgemischen kann die Menge des abdampfenden Methanols durch Sättigung des Gasstromes aus einer unmittelbar vorgeschalteten Methanolfalle in der Grössenordnung von 1–2%

gehalten werden. Eine Abnahme des Methanolgehaltes um weniger als 5% hat keinen feststellbaren Einfluss auf die Zählheusbeute. Vor der Messung im Szintillationszähler wird dem Absorptionsgemisch eine Szintillatorlösung (Tabelle I) zugesetzt und die Probe wird mit einem Originaldeckel verschlossen.



Schematische Darstellung des Absorptionsgefässes. A, Ansatzstück aus Polyamid. S, Scheibe aus weichem Gummi. D, Deckel. N, Injektionsnadel. M, Messgläschen für den Szintillationszähler.

¹ J. M. PASSMANN, N. S. RADIN und J. A. D. COOPER, *Anal. Chem.* 28, 484 (1956).

² R. A. OPPERMAN, R. F. NYSTROM, W. O. NELSON und R. E. BROWN, *Int. J. appl. Radiat. Isotopes* 7, 38 (1959).

³ H. JEFFAY und J. ALVAREZ, *Anal. Chem.* 33, 612 (1961).

⁴ M. BAGGIOLINI, H. AEBI, E. SACQUET und H. CHARLIER, *Helv. physiol. Acta* 22, 53 (1964).

⁵ H. AEBI, E. FREI, R. KNAB und P. SIEGENTHALER, *Helv. physiol. Acta* 15, 150 (1957).

⁶ M. BAGGIOLINI, unveröffentlichte Methode.

⁷ M. BAGGIOLINI und M. H. BICKEL, *Anal. Biochem.*, im Druck.

⁸ Bestandteil des Infusionsbesteckes SRK (beim Autor erhältlich).

⁹ Gelebt mit Araldit, CIBA.