

## Summary

Transformation of Reichstein's Substance S (I) by a mutant obtained by ultraviolet ray irradiation of *Pseudomonas* sp. 109 resulted in the formation of  $17\alpha,20\beta,21$ -trihydroxy- $1,4$ -pregnadien-3-one (II) and prednisolone (IV;  $11\beta,17\alpha,21$ -trihydroxy- $1,4$ -pregnadiene- $3,20$ -dione), and thus the aim of the work presented in this and preceding three papers, namely the preparation of therapeutically valuable steroid hormones by the action of *Pseudomonas*, was successfully attained.

(Received August 25, 1959)

*UDC 547.993 : 597.548*

**47. Kyosuke Tsuda,<sup>\*1</sup> Masaaki Kawamura,<sup>\*2</sup> und Ryoichi Hayatsu<sup>\*2</sup>:**

Untersuchungen der Eierstockextrakte von Kugelfischen. XI.<sup>1),\*3</sup>

Über Tetrodotoxin. (2).

(Institut für angewandte Mikrobiologie,<sup>\*1</sup> Universität Tokio, und  
Takamine Forschungslaboratorium,<sup>\*2</sup> Sankio-AG.)

In der 6., 7. und 8. Mitteilung dieser Reihe<sup>2)</sup> haben wir die Isolierung des Tetrodotoxins aus dem Eierstockextrakt bei Kugelfischen<sup>\*4</sup> und die allgemeinen Eigenschaften dieses Giftstoffes beschrieben. Tetrodotoxin<sup>3)</sup> befindet sich allgemein in den Organen von Fischen der *Spherooides*-Arten (*Tetraodontidae*) und kristallisiert sich in Essigsäure-Äthanol-Äther zu Prismen aus, die keinen scharfen Schmelzpunkt aufweisen und sich über ca. 220° unter Schwarzfärbung langsam zersetzen;  $[\alpha]_D^{25} -8.64^\circ$  ( $c=8.55$  in verd. Essigsäure). Auf Grund der Analysen- und Titrationsresultate<sup>2b)</sup> kann man dem Tetrodotoxin eine Bruttoformel von  $C_{12}H_{19}O_9N_3$  geben, wenn man es als eine monoacidische Base ansieht. Es ist in Wasser, Äthanol und Äther nicht löslich. Aber es löst sich in verd. Salzsäure und scheidet sich durch Neutralisation wieder kristallinisch ab.

Es bildet ein kristallinisches Chlorhydrat bzw. Tartrat, aber beide Salze sind äußerst hygroskopisch. Aus einer Lösung von Tetrodotoxin in Essigsäure-Äthanol ergibt sich eine freie Base beim Zugeben von Äther, so dass diese Methode auf die Umkristallisation des Stoffes angewandt werden kann. Das IR-Spektrum und die verschiedenen Farbenreaktionen dieses Stoffes sind bereits beschrieben worden.<sup>2b)</sup>

Die vorliegende Arbeit berichtet über allgemeine Reaktionen, speziell über ein Abbauprodukt des Tetrodotoxins.

\*1 Yayoicho, Bunkio-ku, Tokio (津田恭介).

\*2 Nishishinagawa, Shinagawa-ku, Tokio (河村正朗, 早津了一).

\*3 Vorgetragen bei dem 3. Symposium über Naturstoff-Chemie in Tokio, am 17. Oktober, 1959. Vgl. Referatenband 3. Symposium über Naturstoff-Chemie, 94(1959).

\*4 Man nennt sie in Japan Fugu oder Fuku und in Amerika Puffer. Als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Tetrodotoxin wurden die Eierstücke von *Spherooides rubripes* (Torafugu) und *S. porphyreus* (Mafugu) gebraucht.

1) X. Mitteil. B. Umezawa : *Yakugaku Zasshi*, **75**, 496(1955).

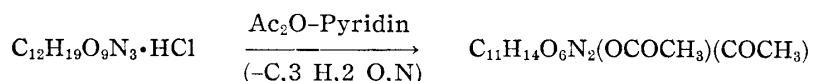
2) a) K. Tsuda, M. Kawamura : *Yakugaku Zasshi*, **72**, 187, 771(1952). b) K. Tsuda, M. Kawamura : Dieses Bulletin, **1**, 112(1953).

3) Siehe die Übersicht von D. A. Courville, B. W. Halstead, D. W. Hessel : *Chem. Revs.*, **58**, 241 (1958). Vgl. auch die Angaben von H. Arakawa (*Nippon Kagaku Zasshi*, **77**, 1295(1956)) und E. A. Murtha (Exptl. Therap., **112**, 246(1958)).

### Allgemeine Reaktionen des Tetrodotoxins

Es zeigte im UV-Spektrum keine selektive Absorption und war unter gewöhnlichen Bedingungen katalytisch nicht hydrierbar. Bei der Bestimmung der primären NH<sub>2</sub>-Gruppe mit Natriumhypobromit nach Iwasaki'scher Azotometrie\*<sup>5</sup> reagierte es unter Entwicklung von 1 Mol Stickstoff, aber nicht mit Natriumnitrit.\*<sup>6,\*7</sup> Bei der Verseifung mit 10-proz. Kali-lauge und nachfolgender Destillation in einem Kjeldahl-Apparat lieferte es 0.07 Mol NH<sub>3</sub>. Wenn man es nach der energischen sauren Hydrolyse mit Alkali behandelte, so fasste man auch dasselbe Mol NH<sub>3</sub>. Aus diesen Daten kann man schliessen, dass im Tetrodotoxin vermutlich eine NH<sub>2</sub>-Gruppe vorliegt, die weder zu einer Gruppierung vom CONH<sub>2</sub>-Typ noch derjenigen vom  $\alpha$ -Aminosäure-Typ gehört. Im IR-Spektrum von Tetrodotoxin sind die von OH-Gruppen\*<sup>8</sup> stammenden Banden vorhanden. In Übereinstimmung damit nahm der Stoff bei der Perjodsäure-Oxydierung sehr leicht Sauerstoff auf. Der Mol.-Wert der verbrauchten Perjodsäure betrug nach 1 Stunde bei 25° zwei Mol, nach 16 Stunden 2.6 Mol, nach 48 Stunden 3.2 Mol.\*<sup>9</sup> Diese Befunde schliessen das Vorliegen der  $\alpha$ -Glykol-Gruppierung aus. Der Umsatz von Tetrodotoxinchlorhydrat mit Acetanhydrid in Pyridin lieferte je nach den Reaktionsbedingungen folgende drei Verbindungen :

Acetat-A— Das erste Acetat wurde bei der Reaktion unter der Bedingung von Zimmertemperatur und 24 stündiger Reaktionsdauer erhalten. Es wurde als Chlorhydrat isoliert und gereinigt, wobei es bei 219~221° schmolz und optisch aktiv war;  $[\alpha]_D^{25} +16.7^\circ$  ( $c=0.9$  in CHCl<sub>3</sub>). Aus Analysenresultaten und der Acetylzahl-Bestimmung wurde C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub>(COCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>•HCl als Summenformel ermittelt. Die Umsetzungsreaktion von Acetat-A-Chlorhydrat mit Natrium Pikrat gab das Acetat-A-Monopikrat vom Schmp. 199~201°. Hingegen gab Tetrodotoxinchlorhydrat bei analoger Reaktion kein Pikrat. Im IR-Spektrum (Nujol) fand sich die für Enolacetat charakteristische CO-Bande bei 1757 cm<sup>-1</sup>. Andererseits zeigte das Acetat-A-Chlorhydrat im UV bei 235~238 m $\mu$  ( $\varepsilon$  5200) ein Maximum. Bemerkenswert ist, dass Tetrodotoxin sogar bei einer milden Acetylierungsreaktion seine ursprüngliche Grundform nicht mehr vollständig behalten kann. Reaktionsschema wird wie folgt beschrieben :



Acetat-B— Das zweite Acetat, Acetat-B, konnte bei längerer Reaktionsdauer zuweilen gewonnen werden, wobei Acetat-A nicht erfasst wurde. Es schmolz bei 150~151° und zeigte auch die Basizität. Es war nicht im Wasser, aber jedoch im sauren Wasser leicht löslich. Auf Grund einer Mol.-Gew.- bzw. Acetylzahl-Bestimmung und von

\*<sup>5</sup> Siehe den zusammenfassenden Artikel von K. Iwasaki : Seikagaku (Tokio), **23**, 207(1952). Die Substanz, welche die primäre NH<sub>2</sub>-Gruppe aufweist, wird mit NaOBr zur Reaktion gebracht und die dabei gebildete Menge Stickstoff volumetrisch gemessen. Dafür ist vom oben genannten Autor eine spezielle Apparatur angegeben worden. Vgl. auch M. Yamagishi, M. Yokoo, T. Masuda, M. Asai : Yakugaku Zasshi, **74**, 283(1954).

\*<sup>6</sup> Y. Yamagishi, M. Yokoo : Yakugaku Zasshi, **74**, 278(1954). Die oben erwähnte NH<sub>2</sub>-Bestimmungsmethode nach Iwasaki wurde von diesen Autoren etwas modifiziert und NaNO<sub>2</sub>-AcOH anstatt NaOBr als Reagenz angewandt. Vgl. auch M. Nagawa, H. Shindo : Yakugaku Zasshi, **76**, 99, 101(1956).

\*<sup>7</sup> Wir danken den Herren M. Nagawa und H. Shindo, Takamine-Laboratorium, Tokio, für die freundliche Ausführung der Azotometrie-Analyse.

\*<sup>8</sup> Bestimmung des aktiven Wasserstoffs nach Zerewitinoff wurde noch nicht versucht, da Tetrodotoxin selbst im organischen Lösungsmittel nicht löslich ist.

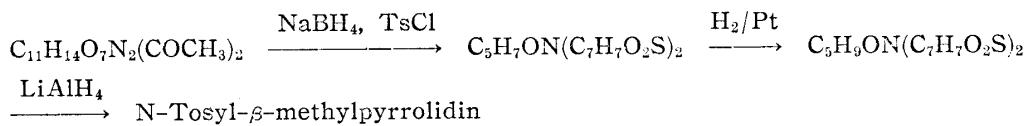
\*<sup>9</sup> Hierbei wurde Formaldehyd als Spaltstück erfasst. Der Abbaualdehyd gab nämlich 2,4-Dinitrophenylhydrazon vom Schmp. 165~166°, welches sich als identisch mit Formaldehyd-2,4-Dinitrophenylhydrazon erwies.

Analysen wurde dem Acetat-B die Summenformel  $C_7H_{10}O_3N(COCH_3)$  zugewiesen. Im IR-Spektrum (Nujol) war auch die von einer Enolacetat-Gruppierung stammende CO-Bande vorhanden, nämlich bei  $1745\text{ cm}^{-1}$ . Im UV-Spektrum zeigte es ein Maximum bei  $234\text{ m}\mu$ .

Acetat-C — Das dritte Acetat, Acetat-C, war nicht leicht herstellbar und wurde bei längerer Reaktionsdauer einige Male gewonnen. Es schmolz bei  $192\sim193^\circ$  und war optisch aktiv;  $[\alpha]_D^{25} +110.5^\circ(c=1.90\text{ in EtOH})$ . Alle Analysen-Daten stimmten mit der Summenformel  $C_5H_5O_3N(COCH_3)_2$  überein. Im IR-Spektrum (Nujol) war neben der CO-Bande des normalen O-Acetat bei  $1733\text{ cm}^{-1}$  noch eine CO-Bande des Enolacetats bei  $1760\text{ cm}^{-1}$  zu beobachten. Die UV-Absorption fand sich bei  $234\text{ m}\mu(\varepsilon 3070)$ .

### Gewinnung von $\beta$ -Methylpyrrolidin als Spaltstück von Acetat-A

Zur weiteren Aufarbeitung war das Acetat-A viel besser geeignet als Acetat-B bzw. Acetat-C, da es leichter herstellbar war; die Ausbeute betrug nämlich ca. 40-proz. Beim oxydativen Abbau des Acetat-A-Chlorhydrats mit Kaliumpermanganat in wässriger Lösung wurde Brenztraubensäure als eines der Oxydationsprodukte erfasst. Andererseits wurde das Acetat-A-Chlorhydrat der Natriumborhydrid-Reduktion unterworfen. Diese Reduktion wurde in Methanol bei Zimmertemperatur durchgeführt und das Reaktionsgemisch nach Zugabe von 5-proz. Essigsäure unter niedrigem Druck bei  $40^\circ$  destilliert. Im Destillat konnte das Acetaldehyd als dessen 2,4-Dinitrophenylhydrazone erfasst werden. Zur Gewinnung des Reaktionsproduktes aus dem Destillationsrückstand war die Methode nach Schotten-Baumann geeignet, da es im Wasser sehr leicht löslich war. Durch Acylierung mit Tosylchlorid im alkalischen Medium konnte eine Tosyl-Verbindung vom Schmp.  $132\sim134^\circ$  aus dem Reaktionsgemisch gezogen werden.<sup>\*10</sup> Analysen-Daten stimmten mit einer Summenformel  $C_5H_9ON(C_7H_7O_2S)_2$  überein. Da dieses O,N-Ditosylat sich in verd. Kali-lauge nicht löste, so war die ursprüngliche Base, d.h.  $C_5H_7(OH)(NH)$ , selbstverständlich ein sekundäres Amin. Dieses Amin verbrauchte bei der katalytischen Hydrierung mit Platinoxid in Äthanol 1 Mol Wasserstoff. Dihydro-Derivat,  $C_5H_9ON(C_7H_7O_2S)_2$ , schmolz bei  $122^\circ$  und war optisch aktiv;  $[\alpha]_D^{25} -48^\circ(c=0.9\text{ in CHCl}_3)$ . Unter der Einwirkung von Lithiumaluminiumhydrid verlor diese Substanz ihren O-Tosyl-Rest<sup>4)</sup> und ging in N-Monotosylat über. Nach Chromatographie der Rohprodukte isolierten wir eine kristallisierte Verbindung  $C_5H_{10}N(C_7H_7O_2S)$  vom Schmp.  $70\sim72^\circ$ , die nach Schmp., Mischprobe und IR-Spektrum mit dem durch Tosylierung von bekanntem *rac*- $\beta$ -Methylpyrrolidin<sup>7)</sup> gewonnenen *rac*-N-Tosyl- $\beta$ -methylpyrrolidin identisch war. Das Reaktionsschema ist wie folgt gezeigt:



### Experimentelles<sup>\*11</sup>

**NH<sub>2</sub>-Bestimmung nach Azotometrie<sup>\*5~8</sup>**—Eine Lösung von 2.27 mg Tetrodotoxin in 10 ccm verd. AcOH wurde zur Bestimmung vorbereitet und je 1 ccm der Lösung bei allen Versuchen verwendet.

\*10 Diese NaBH<sub>4</sub>-Reaktion ist sehr kompliziert, so dass bei Benzoylierung der Reaktionsprodukte und nachfolgender Chromatographie der Benzoate mindestens vier Arten der Benzoyl-Verbindungen isoliert werden. Der Detailbericht wird später beschrieben.

\*11 Alle Schmp. sind im Flüssigkeitsbad bestimmt und nicht korrigiert. Elementaranalysen und IR-Spektralaufnahmen wurden im Takamine-Laboratorium ausgeführt. Dafür danken wir den Herren T. Onoe, H. Shindo und H. Higuchi sowie Fr. C. Furukawa und H. Otsuka bestens.

4) Über LiAlH<sub>4</sub>-Reduktion von O,N-Ditosylat siehe z.B. R. Griot, T. Wagner-Jauregg: Helv. Chim. Acta, 41, 867(1958).

5) F. F. Blicke, Chi-Jung Lu: J. Am. Chem. Soc., 74, 3933(1952).

- 1)  $\text{HNO}_2$ -Azotometrie: Abgelesenes Volumen von  $\text{N}_2$ , 0 mm<sup>3</sup> bei 24°.
- 2)  $\text{NaOBr}$ -Azotometrie: Abgelesenes Volumen von  $\text{N}_2$  nach Ablauf einer bestimmten Reaktionszeit, 6.5 bzw. 7.8 mm<sup>3</sup> nach 1 bzw. 3 Min. bei 24°. Ber.: N%, 4.01 für 1 Mol  $\text{N}_2$ . Gef.: N%, 3.6 bzw. 4.3 nach 1 bzw. 3 Min.
- 3)  $\text{NaOBr}$ -Azotometrie mit vorläufiger saurer Hydrolyse. Nach 1 std. Erhitzen mit 10% HCl wurde die Substanzlösung zur Verfügung gestellt: Abgelesenes Volumen von  $\text{N}_2$ , 7.8 mm<sup>3</sup> bei 24°. Ber.: N% 4.01 für 1 Mol  $\text{N}_2$ . Gef.: N% 4.3.

**Gewinnung von  $\text{NH}_3$  bei der Verseifung von Tetrodotoxin**—Tetrodotoxin wurde mit KOH oder HCl verseift und das entstehende  $\text{NH}_3$  im Kjeldahl-Apparat analysiert. Andrerseits wurden verschiedene Säureamide sowie Aminosäure zum Kontrollversuche zu analogen Reaktionen gebracht. Alle Daten werden in Tabelle I gezeigt. Das als Chlorhydrat aufgefangene  $\text{NH}_3$  wurde nach physikalischen Daten und Farbenreaktionen mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  identifiziert.

TABLE I. Mol.-Werte von abgespaltenem  $\text{NH}_3$  bei der Hydrolyse

Substanz	Formel	Gefundene $\text{NH}_3$ Mol	
		KOH <sup>a)</sup>	HCl <sup>b)</sup>
Hexamethylentetramin	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4$	0	4.0
Ammoniumchlorid	$\text{NH}_4\text{Cl}$	0.95	—
Acetamid	$\text{CH}_3\text{CONH}_2$	1.00	—
Methylbernsteinsäureimid	$\text{C}_3\text{H}_6(\text{CO})_2\text{NH}$	0.61	0.78
Urethan	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OCOCONH}_2$	0.56	1.00
Harnstoff	$\text{NH}_2\text{CONH}_2$	0.05	0.10
Glukosaminchlorhydrat	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_5\text{NHC}_1$	0.93	—
<i>rac</i> -Serin	$\text{CH}_2(\text{OH})\cdot\text{CH}(\text{NH}_2)\cdot\text{CO}_2\text{H}$	0.04	—
Argininchlorhydrat	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{HCl}$	0.09	0.05
Tetrodotoxin	$\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{O}_9\text{N}_3$	0.07	0.07

- a) 10~100 mg Substanz wurden 10 Min. in einem Kjeldahl-Apparat mit 10% KOH im Dampfstrom erhitzt. Das destillierte  $\text{NH}_3$  wurde in 0.01N HCl aufgefangen und zurücktitriert.  
 b) 10~100 mg Substanz wurden 1.5 Stdn. mit 35% HCl auf dem Wasserbade erhitzt, dann mit 10% KOH alkalisch gemacht und 10 Min. wiederum erhitzt.  $\text{NH}_3$ -Bestimmung wurde wie oben in einem Kjeldahl-Apparat ausgeführt.

**Acetylierungsreaktion von Tetrodotoxin**—1) Acetat-A: 1 g Tetrodotoxinchlorhydrat wurde in 10 ccm abs. Pyridin und 4 ccm  $\text{Ac}_2\text{O}$  24 Stdn. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Hierauf wurde diese Lösung in 1 L. Petroläther gegossen und das abgeschiedene ölige Produkt durch Behandlung mit Petroläther zur Kristallisation gebracht. Nach mehrmaliger Umkristallisation aus Benzol-EtOH und dann  $\text{Me}_2\text{CO}$ -Et<sub>2</sub>O wurden 680 mg Nadeln vom Schmp. 219~221° erhalten.  $[\alpha]_D^{25} +16.7^\circ$  (c=1.7 in EtOH).  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_9\text{N}_2\cdot\text{HCl}$ —Ber.: C, 44.06; H, 5.14; N, 6.85; Cl, 8.69; 2 $\text{CH}_3\text{CO}$ , 21.0. Gef: C, 44.32; H, 5.29; N, 7.08; Cl, 8.42;  $\text{CH}_3\text{CO}$ , 22.01. UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  235~238 m $\mu$  ( $\epsilon$  5200).

Pikrat: Zur wässrigen Lösung von Acetat-A-Chlorhydrat wurde die Lösung von Na-Pikrat in Wasser gegeben und das erhaltene Pikrat aus MeOH umkristallisiert. Gelbe Nadeln vom Schmp. 199~201°.  $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_{16}\text{N}_5$ —Ber.: C, 41.93; H, 3.82; N, 11.65. Gef.: C, 41.68; H, 3.97; N, 11.22.

2) Acetat-B: Wenn man die oben genannte Reaktion mit längeren Zeiten ausführte, so erhielt man bisweilen das Acetat-B anstatt des Acetat-A. Aus MeOH kristallisierte es in Mikronadeln vom Schmp. 150~151°. Es ist nicht in Wasser, aber in verd. HCl leicht löslich.  $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{O}_4\text{N}$ —Ber.: C, 54.26; H, 6.58; N, 7.03;  $\text{CH}_3\text{CO}$ , 21.60; Mol. Gew., 199.2 Gef.: C, 54.33; H, 6.63; N, 6.86;  $\text{CH}_3\text{CO}$ , 21.21; Mol. Gew. 205. UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  234 m $\mu$ .

Pikrat: Gelbe Nadeln vom Schmp. 153~154°.  $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_{11}\text{N}_4$ —Ber.: C, 42.05; H, 3.74; N, 13.08. Gef.: C, 41.83; H, 3.96; N, 13.20.

3) Acetat-C: Die Lösung von 100 mg Tetrodotoxinchlorhydrat in  $\text{Ac}_2\text{O}$ -Pyridin wurde 1 Woche bei Zimmertemperatur stehengelassen. Anschliessend wurde die Lösung im Vakuum bei 50° eingeeignet und mit Wasser versetzt. Die erhaltenen Kristalle wurden aus Benzol-Petroläther umkristallisiert, 56 mg Prismen vom Schmp. 192~193°.  $[\alpha]_D^{25} +110.5^\circ$  (c=1.90 in EtOH).  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_5\text{N}$ —Ber.: C, 50.7; H, 5.1; N, 6.6; 2 $\text{CH}_3\text{CO}$ , 40.7; Mol. Gew., 213. Gef.: C, 51.50; H, 5.23; N, 6.48;  $\text{CH}_3\text{CO}$ , 44.3; Mol. Gew., 234. UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  234 m $\mu$  ( $\epsilon$  3070).

**NaBH<sub>4</sub>-Reduktion von Acetat-A**—500 mg Acetat-A-Chlorhydrat wurden in 30 ccm MeOH gelöst, mit 250 mg NaBH<sub>4</sub> versetzt und bei Zimmertemperatur über Nacht stehengelassen. Nach Ansäuern mit 5-proz. AcOH wurde das organische Lösungsmittel bei niedrigem Druck abdestilliert. Aus dem Destillat ergab sich nach Zugabe von 2,4-Dinitrophenylhydrazinchlorhydrat und darauffolgendem Abdampfen des Lösungsmittels das Acetaldehyd-2,4-Dinitrophenylhydrazone, das nach der Umkristallisation aus EtOH Schmp. 167~168° zeigte.  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4\text{N}_4$ —Ber.: C, 42.86; H, 3.60; N, 24.99. Gef.: C,

42.68; H, 3.64; N, 24.77.

Andererseits wurde das durch Destillation von MeOH befreite Reaktionsgemisch mit 50 ccm 10-proz. NaOH und 1 g Toluolsulfochlorid versetzt und 30 Stdn. bei Zimmertemperatur geschüttelt. Nach Sättigung von CO<sub>2</sub> wurde das Produkt mit CHCl<sub>3</sub> extrahiert und nach Abdampfen des Lösungsmittels aus EtOH umkristallisiert. Dabei wurden 130 mg farblose Nadeln vom Schmp. 132~134° erhalten. Sie sind im Wasser, verd. KOH und verd. HCl nicht löslich. C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>O<sub>5</sub>NS<sub>2</sub>—Ber. : C, 56.02; H, 5.20; N, 3.44; Mol. Gew., 407.3. Gef. : C, 55.38; H, 5.63; N, 3.31; Mol. Gew., 384.0.

**Gewinnung von rac-N-Tosyl-β-methylpyrrolidin aus O,N-Ditosylat**—100 mg O,N-Ditosylat vom Schmp. 132~134° wurden in AcOEt gelöst, mit vorhydriertem PtO<sub>2</sub>-Katalysator versetzt und in H<sub>2</sub>-Atmosphäre unter Schütteln reduziert, bis kein H<sub>2</sub> mehr aufgenommen wurde. Hierbei wurde ca. 1 Mol H<sub>2</sub> verbraucht. Dann wurde die Lösung abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Das hierbei erhaltene Dihydro-Derivat schmolz nach Umlösen aus EtOH bei 121~122°, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -48° (c=0.9 in CHCl<sub>3</sub>). Ausbeute, 76 mg. C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>O<sub>5</sub>NS<sub>2</sub>—Ber. : C, 55.74; H, 5.66; N, 3.42. Gef. : C, 55.48; H, 5.83; N, 3.37.

50 mg Dihydro-Derivat und 100 mg LiAlH<sub>4</sub> wurden in 20 ccm abs. Et<sub>2</sub>O unter Rückfluss erhitzt. Nach der Reaktionsdauer von 8 Stdn. wurde das überschüssige LiAlH<sub>4</sub> mit H<sub>2</sub>O-Et<sub>2</sub>O zersetzt und das Reaktionsgemisch abfiltriert. Das Filtrat wurde nach Trocknen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> im Vakuum eingedampft, wobei ein rohes Reaktionsprodukt vom Schmp. 50~60° gewonnen wurde. Es wurde zur Reinigung an Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> chromatographiert und die mit Benzol eluierten Anteile gaben aus Benzol-Et<sub>2</sub>O 18 mg farblose Nadeln vom Schmp. 70~72°, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -3.2°(c=1.47 in EtOH). C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>O<sub>2</sub>NS—Ber. : C, 60.22; H, 7.16; N, 5.86. Gef. : C, 59.89; H, 7.00; N, 6.07.

250 mg β-Methylpyrrolidin<sup>7)</sup> wurden in 1.5 ccm Pyridin gelöst, mit einer Lösung von 700 mg Toluolsulfochlorid in 3.5 ccm Pyridin versetzt und 70 Stdn. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingedampft, mit Wasser versetzt und mit Et<sub>2</sub>O ausgeschüttelt. Die übliche Aufarbeitung gab rohes Tosylat, das nach Umkristallisation aus MeOH Nadeln vom Schmp. 72~73° lieferte. C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>O<sub>2</sub>NS—Ber. : C, 60.22; H, 7.16; N, 5.86. Gef. : C, 60.38; H, 7.28; N, 5.79. Misch.-Schmp. von synthetischem N-Tosyl-β-methylpyrrolidin mit oben genannter Verbindung vom Schmp. 70~72° zeigte keine Depression. IR-Spektren beider Substanzen waren auch ganz identisch.

**KMnO<sub>4</sub>-Oxydation von Acetat-A**—408 mg Acetat-A-Chlorhydrat wurden in 10 ccm Wasser gelöst, mit 950 mg KMnO<sub>4</sub> versetzt und 10 Stdn. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Zur Entfernung von Permanganat wurde Oxalsäure zugegeben und das abgeschiedene MnO<sub>2</sub> abfiltriert. Das Filtrat wurde im Vakuum eingeengt, mit Zugabe von verd. HCl sauer gemacht und wieder im Vakuum destilliert. Aus dem Destillat ergaben sich nach Zugabe von Brady-Reagenz gelbe Kristalle, die nach Umkristallisation aus EtOH bei 212~213° schmolzen und sich als identisch mit Brenztraubensäure-2,4-Dinitrophenylhydrazone erwiesen. Ausbeute : 40 mg. C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub>—Ber. : C, 40.30; H, 3.01; N, 20.89. Gef. : C, 40.12; H, 3.16; N, 21.12.

Bei dieser Oxydation wurde auch ein N-haltiges Produkt, dessen Charakterisierung aber noch nicht fertig ist, gefunden.

### Zusammenfassung

Tetrodotoxin, C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>O<sub>9</sub>N<sub>3</sub>, gab mit Essigsäureanhydrid und Pyridin das Acetat-A-Chlorhydrat, C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub>(COCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·HCl. Durch Natriumborhydrid-Reduktion von Acetat-Chlorhydrat und darauffolgender Tosylierung entstand ein Produkt der Summenformel C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>ON(C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S)<sub>2</sub>, dessen Dihydro-Derivat nach Lithiumaluminiumhydrid-Reduktion das bekannte β-Methylpyrrolidin lieferte.

(Eingegangen am 6. Januar, 1960)