

UDC 547.993 : 597.548

48. Masaaki Kawamura : Untersuchungen der Eierstockextrakte
von Kugelfischen.*² XII.*^{3,1)} Über Tetrodotoxin. (3).

(Takamine Forschungslaboratorium, Sankio-AG.*¹)

In der vorstehenden Mitteilung¹⁾ haben wir über den Abbau des Tetrodotoxins zum bekannten β -Methylpyrrolidin berichtet. Bei einer zweiten Folge von Abbaureaktionen, die Gegenstand dieser Mitteilung ist, habe ich das Tetrodotoxin mit alkoholischer Kalilauge umgesetzt; das Tetrodotoxin wurde 10 Stunden mit Kaliumhydroxyd in 60-proz. Äthanol erhitzt und resultierte eine dunkelrot gefärbte Lösung. Nach schwachem Ansäuern (pH 4~5) mit Salzsäure und darauffolgendem Extrahieren daraus mit Butanol ergab sich eine Verbindung von Bruttoformel*⁴ $C_9H_{12}O_2N_3Cl$ als Hauptprodukt; Ausbeute betrug ca. 30%. Als Nebenprodukt konnte ferner aus dem stark angesäuerten Reaktionsgemisch die Oxalsäure mit ca. 20-proz. Ausbeute gefasst werden.

Dieses Chlor-haltige Hauptprodukt konnte nur durch Sublimation im Vakuum gereinigt werden und zeigte keine Schmp. bis zu 280°. Es war wirklich Chlorhydrat einer Base, da es im Wasser leicht löslich war und sich ferner aus dieser wässrigen Lösung mit Pottasche eine Verbindung von Bruttoformel*⁴ $C_9H_{11}O_2N_3$ isolieren liess. Sie stellte blassgelbe Kristalle dar, die bei 201~202° schmolzen. Bemerkenswert ist, dass diese C_9 -Base in verd. Natronlauge löslich war und andererseits mit Eisenchlorid sich tiefgrün färbte. Im UV-Spektrum von C_9 -Base in abs. Äthanol traten zwei Absorptions-Maxima auf; 235 m μ (ϵ 30700) und 262 m μ (ϵ 42300). Wurde eine Lösung von C_9 -Base in 10-proz. alkoholischer Natronlauge zur UV-Spektralanalyse benutzt, so konnte eine starke bathochrome Verschiebung des Hauptmaximums (von 262 m μ auf 279 m μ mit ϵ 37900) bemerkt werden. Aus diesen Eigenschaften ging hervor, dass sich eine Enol-Gruppierung im C_9 -Base-Molekül befindet.

Im IR-Spektrum (Nujol) der C_9 -Base wurden neben der breiten OH(NH)-Valenzschwingungsbanden (3330~3125 cm $^{-1}$) die für aromatische Amine charakteristischen Banden bei 1658, 1637 und 650~720 cm $^{-1}$ beobachtet. Die Annahme, dass diese Banden NH-Schwingungen seien, wurde durch Deuterisierungsbefunde gestützt. Beim Austausch des NH-Wasserstoffes gegen Deuterium in Deuteriumoxid verlagerten sich die 3330~3125 cm $^{-1}$ -Banden nach 2400 cm $^{-1}$; die übrigen NH-Schwingungsbanden (1658, 1637, 650~720 cm $^{-1}$) konnten nicht mehr bemerkt werden.

Zur Bestätigung dieser Deutung habe ich das 2-Aminopyrimidin spektralanalytisch genau geprüft. Das IR-Spektrum (Nujol) von 2-Aminopyrimidin zeigte bei 3311 cm $^{-1}$ und 3205 cm $^{-1}$ NH-Valenzschwingungsbanden, bei 1647 cm $^{-1}$ die NH-Deformationsschwingungsbande und bei 724 cm $^{-1}$ die NH-Waggingschwingungsbande; die C=C-Ringschwingungen traten bei 1580 und 1558 cm $^{-1}$ auf, und CH-Waggingschwingung bei 803 cm $^{-1}$. Deuteriertes 2-Aminopyrimidin zeigte hingegen die ND-Schwingungsbanden²⁾ bei 2530 und 2330 cm $^{-1}$ und die C=C-Ringschwingungsbanden bei 1600 und 1555 cm $^{-1}$.

Die C_9 -Base verbrauchte bei der katalytischen Hydrierung mit Platin in Äthanol

*¹ Nishishinagawa, Shinagawa-ku, Tokio (河村正朗).

*² 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.

*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 Nach Analysendaten ist die Möglichkeit der Formel $C_9H_{10}O_2N_3Cl \cdot (C_9H_9O_2N_3)$ nicht ausgeschlossen.

1) XI. Mitteil. K. Tsuda, M. Kawamura, R. Hayatsu : Dieses Bulletin, 8, 257(1960).

2) Siehe z. B. S. Califano, R. Moccia : Gazz. chim. ital., 87, 805(1957).

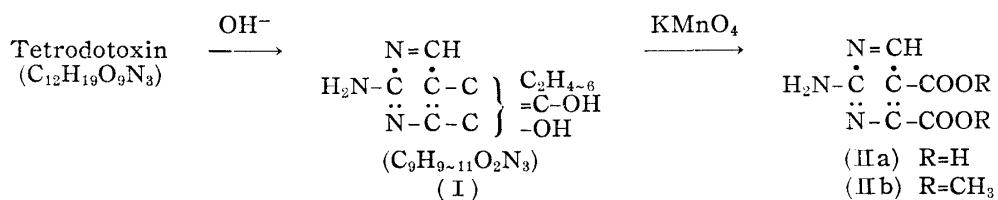
1 Mol Wasserstoff und ging in das Dihydro-Derivat vom Schmp. 275~278° über. Das UV-Spektrum von Dihydro-C₉-Base war durch Maxima eines Aromatenrings bei 254 m μ (ϵ 7600) und 294 m μ (ϵ 4500) gekennzeichnet. Im IR-Spektrum (Nujol) sind die Banden bei 1613 und 1585 cm⁻¹ mit der angenommenen Aromatenring-Struktur verträglich. Aus diesen Spektralbefunden und ferner aus dem negativen Ausfall der Eisenchlorid-Farbenreaktion von Dihydro-C₉-Base ging hervor, dass die Enol-Doppelbindung der C₉-Base bei der katalytischen Hydrierung reduziert worden war und dass der Aromatenring dabei intakt geblieben war. Die bei der UV-Absorptionsmaxima von C₉-Base gezeigten hohen Extinktionen liessen auch vermuten, dass die Enol-Doppelbindung mit dem Aromatenring konjugiert ist.

Durch die übliche Acetylierungsreaktion wurde die C₉-Base in ein Triacetyl-Derivat vom Schmp. 197~199° übergeführt, das durch Verseifung mit Alkali wieder die ursprüngliche Base gab. Das IR-Spektrum (Nujol) zeigte bei 1770 cm⁻¹ die charakteristische CO-Bande einer Vinylester-Gruppe, bei 1750 cm⁻¹ die Ester-CO-Bande und bei 1690 cm⁻¹ die Amid-CO-Bande; dabei lagen die Aromatenbande bei 1603 cm⁻¹. Aus diesen Befunden musste geschlossen werden, dass sich im Molekül der C₉-Base, ausser der NH₃- bzw. Enol-OH-Gruppe, noch eine mit dem Aromatenring nicht verknüpfte OH-Gruppe befindet.

Zur eindeutigen Erweisung des Aromatenrings wurde die C₉-Base dem oxydativen Abbau unterworfen. Sie wurde mit 1-proz. Kali-lauge zur Lösung gebracht, mit 8-proz. Kaliumpermanganat-Lösung versetzt und bei 60~70° stehengelassen. Das hierbei erhaltene Oxydationsprodukt vom Schmp. 327°(zers.) besass die Bruttoformel C₆H₅O₄N₃ und lieferte durch Methylierung mit Diazomethan den Dimethylester C₈H₈O₄N₃ vom Schmp. 185~186°. Wurde das Oxydationsprodukt dem pyrolytischen Abbau unterworfen, so entstand unter CO₂-Abspaltung eine Verbindung C₄H₅N₃ vom Schmp. 123~124°. Diese Verbindung erwies sich nach Schmp., Mischprobe, UV- und IR-Spektren als identisch mit dem bekannten 2-Aminopyrimidin. Damit war bewiesen, dass das Oxydationsprodukt selbstverständlich ein Dicarbonsäure-Derivat von 2-Aminopyrimidin war.

Im IR-Spektrum (Nujol) des oben erwähnten Abbausäure-dimethylesters ergaben sich zwei Ester-CO-Banden bei 1757 und 1733 cm⁻¹. Es lässt sich damit leichter erklären, wenn die Stellungen C-4 und C-5 für die Lagen der COOH-Gruppierung in Betracht gezogen sind. Zur direkten Vergleichung wurde also das 2-Aminopyrimidin-4,5-dicarbonsäure (IIa) nach Angabe von Jones *et al.*³⁾ hergestellt, welches mit Diazomethan in den Dimethylester (IIb) übergeführt wurde. Nach Schmp., Mischprobe, UV- und IR-Spektren war das synthetische Präparat identisch mit dem aus C₉-Base bereiteten Präparat vom Schmp. 185~186°.

Daraus wurde die Teilformel (I) der Struktur von C₉-Base gegeben. Die weitere Aufklärung dieser C₉-Base wird in der fortlaufenden Mitteilung eingehend beschrieben.



3) R. G. Jones, C. W. Whitehead : J. Org. Chem., 20, 1342(1955).

Experimentelles⁵

Umsetzung von Tetrodotoxin mit alkoholischem KOH—5 g Tetrodotoxin wurden in einer Lösung von 10 g KOH in 100 ccm 60% EtOH 10 Stdn. lang unter Rückfluss gekocht. Anschliessend färbte sich die Lösung dunkelrot. Sie wurde mit 10% HCl bis pH 4 angesäuert und mehrmals mit BuOH geschüttelt. Die BuOH-Extrakte wurden nach Trocknen im Vakuum eingeengt und mit 100 ccm abs. Äther versetzt, wobei 4.2 g Rohprodukte als feste Substanz gewonnen wurden. Nach Sublimieren im Hochvakuum wurden blassgelbe Nadeln vom Schmp. $>280^\circ$ erhalten. 1.3 g. $C_9H_{11}O_2N_3 \cdot HCl$ —Ber. : C, 47.05; H, 5.22; N, 18.30; Cl, 15.46. Gef. : C, 47.31(47.50); H, 4.72(4.64); N, 18.21; Cl, 15.30(14.83). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}} \text{ m}\mu (\varepsilon)$: 235(30700), 262(42300); $\lambda_{\text{max}}^{0.1N\text{-NaOH-EtOH}} 279 \text{ m}\mu (\varepsilon 37800)$. Das Präparat zeigte dunkelgrüne Farbenreaktion mit FeCl_3 .

C_9 -Base—Das gereinigte $C_9H_{11}O_2N_3$ wurde im Wasser gelöst, die Lösung mit Sodaasche alkalisch gemacht und stehengelassen. Die hierbei abgeschiedenen Kristalle wurden abgesaugt und aus EtOH umkristallisiert. Sie kristallisierten sich in blassgelbe Nadeln vom Schmp. $201\sim202^\circ$. $C_9H_{11}O_2N_3$ —Ber. : C, 55.95; H, 5.74; N, 21.74. Gef. : C, 56.20(56.45); H, 5.32(4.94); N, 22.01(21.75). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}} \text{ m}\mu (\varepsilon)$: 234(31700), 262(42100). $\lambda_{\text{max}}^{0.1N\text{-NaOH-EtOH}} 279 \text{ m}\mu (\varepsilon 38500)$. IR (Nujol) cm^{-1} : 3330~3125(OH, NH); 1658, 1637(NH); 1597, 1575(Aromatenring).

Dihydro- C_9 -Base—100 mg $\text{PtO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ wurden in 100 ccm EtOH vorhydriert, dann gab man eine Lösung von 500 mg C_9 -Base in 200 ccm EtOH zu und hydrierte bei Zimmertemperatur. Nach ca. 20 Min. war die Wasserstoffaufnahme beendet und 1.1 Mol H_2 aufgenommen worden. Nach üblicher Aufarbeitung wurden farblose Kristalle erhalten, die nach Umkristallisieren aus heissem Wasser farblose Nadeln vom Schmp. $275\sim278^\circ$ lieferten. $C_9H_{13}O_2N_3$ —Ber. : C, 55.37; H, 6.71; N, 21.53. Gef. : C, 55.64; H, 5.83; N, 21.60. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}} \text{ m}\mu (\varepsilon)$: 254(7600), 294(4500). IR (Nujol) cm^{-1} : 3135(OH, NH); 1678(NH); 1639, 1613, 1585(Aromatenring); 1044(C-O-). Das Präparat zeigte keine Farbenreaktion mit FeCl_3 .

C_9 -Base-Triacetat—1 g C_9 -Base wurde 7 Stdn. lang mit 20 ccm Pyridin und 10 ccm Ac_2O auf dem Wasserbade erwärmt. Nach dem Abdampfen der Lösungsmittel im Vakuum wurde der Rückstand mit Wasser versetzt und das Acetat mit CHCl_3 extrahiert. Das Acetat schied sich aus MeOH in farblosen Nadeln vom Schmp. $197\sim199^\circ$ ab. $[\alpha]_D^{25} 0^\circ$ ($c=5.3$ in CHCl_3). $C_{15}H_{17}O_5N_3$ —Ber. : C, 56.42; H, 5.37; N, 13.16; 3COCH₃, 40.43; Mol. Gew., 317.3. Gef. : C, 56.24; H, 5.02; N, 13.50; COCH₃, 40.10; Mol. Gew., 325.33. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}} 252 \text{ m}\mu (\varepsilon 53200)$. IR (Nujol) cm^{-1} : 3145(NH, OH); 1770(Enol-Acetyl); 1750(Acetyl); 1695(Säureamid); 1603(Aromatenring); 1534(Amid-II). Das Präparat ist für FeCl_3 -Farbenreaktion negativ. Beim Verseifen mit 10-proz. EtOH-KOH gab das Präparat die C_9 -Base.

KMnO₄-Oxydation von C_9 -Base—2 g C_9 -Base wurden in 100 ccm 1-proz. KOH gelöst und bei $60\sim70^\circ$ unter intensivem Rühren mit einer Lösung von 8 g KMnO₄ in 100 ccm Wasser versetzt. Nach ca. 2 Stdn. war der Permanganatverbrauch beendet. Die von MnO_2 abgetrennte Lösung wurde im Vakuum bis ca. 20 ccm eingeengt und mit 15-proz. HCl angesäuert (pH 3.0). Das hierbei abgeschiedene Rohprodukt wurde mehrmals aus Wasser umkristallisiert, wobei farblose Prismen vom Schmp. 327° (zers.) gewonnen wurden. 450 mg. $C_6H_5O_4N_3$ —Ber. : C, 39.35; H, 2.75; N, 22.95. Gef. : C, 39.66(39.42); H, 3.02(2.90); N, 22.61(22.91). UV $\lambda_{\text{max}}^{H_2O} 254 \text{ m}\mu (\varepsilon 10800)$; $\lambda_{\text{max}}^{0.1N\text{-NaOH}} 248 \text{ m}\mu (\varepsilon 10500)$. IR (Nujol) cm^{-1} : 3425, 3333, 3226(NH); 2451(OH); 1706, 1672(CO₂H); 1642(NH); 1590, 1548(Aromatenring); 1330(C-O-).

2-Aminopyrimidin-4,5-dicarbonsäuredimethylester—200 mg Abbausäure wurden zur Lösung von Diazomethan (2%) in 50 ccm Äther und 30 ccm MeOH unter Rühren gegeben. Nach 1 stündigem Rühren resultierte eine klare Lösung. Nach Abdampfen der Lösungsmittel wurde das Reaktionsgemisch mit CHCl_3 extrahiert und die CHCl_3 -Auszüge wieder eingedampft. Das hierbei erhaltene Rohprodukt ergab nach Umkristallisation aus MeOH Nadeln vom Schmp. $185\sim186^\circ$. 180 mg. $C_8H_9O_4N_3$ —Ber. : C, 45.50; H, 4.30; N, 19.90; Mol. Gew., 211.2. Gef. : C, 45.52; H, 4.62; N, 19.88; Mol. Gew., 205. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}} 262 \text{ m}\mu (\varepsilon 24300)$. IR (Nujol) cm^{-1} : 3344, 3175(NH); 1757, 1733(Ester); 1669(NH); 1595, 1546(Aromatenring); 1309(C-O-).

Misch.-Schmp. mit authentischem 2-Aminopyrimidin-4,5-dicarbonsäuredimethylester, der durch Methylierung von 2-Aminopyrimidin-4,5-dicarbonsäure³⁾ erhalten wurde, zeigte keine Depression; die Übereinstimmung der UV- bzw. IR-spektren wurde auch bestätigt.

2-Aminopyrimidin—200 mg Abbausäure wurden in einem Kugelrohr bei 300° erhitzt, wobei ein kristallinisches Destillat erhalten wurde. Es konnte durch Destillation gereinigt werden und schmolz bei $123\sim124^\circ$. $C_4H_5N_3$ —Ber. : C, 50.51; H, 5.30; N, 44.19. Gef. : C, 50.32; H, 5.34; N, 44.05. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}} \text{ m}\mu (\varepsilon)$: 226(16100), 295(3560). IR (Nujol) cm^{-1} : 3311, 3205(NH); 1647(NH); 1580, 1558(Aromatenring).

⁵ Alle Schmp. wurden in Kapillarröhren bestimmt und nicht korrigiert. Die Elementaranalysen und IR-Aufnahme wurden im Takamine Forschungslaboratorium ausgeführt. Dafür danke ich den Herren H. Shindo, H. Higuchi und N. Higosaki sowie Fr. C. Furukawa und H. Otsuka.

Gewinnung von Oxalsäure bei der Umsetzung von Tetrodotoxin mit Alkalilauge—Das zum Ausziehen von C₉-Base mit BuOH geschüttelte Reaktionsgemisch wurde wiederum mit konz. HCl versetzt und diese stark angesäuerte Lösung mit BuOH mehrmals geschüttelt. Die BuOH-Auszüge wurden nach Trocknen mit Na₂SO₄ im Vakuum bis ca. 10 ccm eingeengt und mit 100 ccm Äther versetzt. Die hierbei abgeschiedenen Niederschläge wurden durch Filtrieren beseitigt und das Filtrat wieder eingeengt; zur Entfernung der in Äther schwer löslichen Substanz wurde diese Operation mehrmals wiederholt. Damit konnte ca. 2 ccm ölige Substanz erhalten werden. Das Präparat liess sich bei 240° ohne Zersetzung destillieren; Ausbeute 0.5 g. C₁₀H₁₈O₄-Ber.: C, 59.38; H, 8.97. Gef.: C, 59.31; H, 8.79. IR(Nujol) cm⁻¹: 1773, 1742(Ester-CO). Kp. und IR-Spektrum zeigten mit derjenigen des Oxalsäuredibutylesters völlige Übereinstimmung. Zur Vergleichung wurde auch Säureanilid hergestellt, welches nach Umkristallisation aus AcOEt Schmp. 243.5~245° zeigte und sich als identisch mit dem Oxalsäuredianilid erwies.

Zusammenfassung

Durch Umsetzung von Tetrodotoxin mit Kaliumhydroxid in 60-proz. Äthanol wurde eine Verbindung C₉H₁₁O₂N₃ erhalten, die sich mit Kaliumpermanganat in die 2-Amino-pyrimidin-4,5-dicarbonsäure überführen liess. Nach den chemischen Reaktionen sowie den spektralen Befunden wurde eine Teilformel für die C₉-Base vorgeschlagen.

(Eingegangen am 6. Januar, 1960)