

The author indebted to Prof. T. Okamoto of the University of Tokyo, for his valuable advice. He is also thankful to Dr. T. Kariyone, Dr. T. Itai of this Institute, for their encouragement and to Dr. T. Oba, for the measurement of IR spectra.

*National Institute of Hygienic Sciences,
Tamagawa Yoga-machi,
Setagaya-ku, Tokyo.*

Hiroshi Igeta (井下田 浩)

Received September 9, 1963

[Chem. Pharm. Bull.
11 (11) 1473 ~ 1475]

UDC 547.933.02 : 597.54

Die Konstitution und Konfiguration der Tetrodonsäure

Für das Grundgerüst des Tetrodotoxins¹⁾ haben wir durch Abbaureaktionen sowie Totalsynthese der C₉-Base, die sich bei der Behandlung des Tetrodotoxins mittels 5 proz.-tiger Kalilauge in guter Ausbeute gewinnen läßt,²⁾ die Struktur von 2-Amino-6-hydroxy-methyl-8-chinazolinol (I) mit Sicherheit nachgewiesen.³⁾ Es war auch von Bedeutung, daß bei der obengenannten Reaktion mittels Kalilauge als ein anderes Fragment Oxalsäure entsteht.²⁾ In Hinsicht auf die Struktur der C₉-Base haben Goto, *et al.*⁴⁾ auf Grund der Protonenresonanzspektren dieser Base sowie des Vergleiches mit einem verwandten Stoff, nach der Veröffentlichung unserer Arbeit zu demselben Schluß gelangt.

Inzwischen erwiesen Untersuchungen unseres Laboratoriums, daß Tetrodotoxin unter milden Bedingungen auf Wasser reagieren kann und daß es ein Stoff von Bruttoformel C₁₁H₁₉O₉N₃ (*Anal. Ber.* : C, 39.17; H, 5.64; N, 12.64; O, 42.73. Gef. : C, 39.21; H, 5.64; N, 12.13; O, 42.94) und IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ cm⁻¹ : 1690, 1576 (Disubst.-Guanidinium); 1594, 1416 (Carboxylanion) entsteht. Nach seinen Aminosäure-funktionen (PKa' 11.9 und 2.9) nennen wir diesen Stoff Tetrodonsäure. Diese Aminosäure zerfällt über 300° und zeigt die optische Drehung von $[\alpha]_D^{25} +10.1^\circ$ (c=1.09, 2% HCl); mit Halogenwasserstoffssäure bildet sich unter Entfernung von einem Mol Wasser das entsprechende Tetrodonsäurehalogenhydrat, z.B. C₁₁H₁₇O₈N₃-HBr (*Anal. Ber.* : C, 33.00; H, 4.50; N, 10.50; O, 32.00; Br, 20.00. Gef. : C, 32.96; H, 4.52; N, 10.60; O, 32.11; Br, 19.86.), IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ cm⁻¹ : 1665, 1576 (Disubst.-Guanidinium), 1724 (Carboxyl); das Molekulargewicht dieses Bromhydrates erweist sich, wie unten erwähnt, als 400.2, das mit der obengenannten Bruttoformel im Einklang steht.

Übersichtsaufnahmen an Salzen der Tetrodonsäure zeigten, daß sich Einkristall von Bromhydrat besonders gut für die röntgenographische Strukturanalyse eignet. In Tabelle I sind die Gitterkonstanten und die Dichten der orthorhomischen Modifikation des Bromhydrates angegeben. Hieraus errechnet sich, daß vier Moleküle des Salzes je Elementarzelle vorliegen. Aus der systematischen Abwesenheit ergibt sich die Raumgruppe P2₁2₁2₁. Damit ist bewiesen, daß es sich bei dem Molekulargewicht des Tetrodonsäurebromhydrates um 400.2 handelt.

Die Weißberg-Aufnahmen des Tetrodonsäurebromhydrates und die chemischen,

- 1) K. Tsuda, M. Kawamura : *Yakugaku Zasshi*, **72**, 187, 771 (1952); dieses Bulletin, **1**, 112 (1953); *Ibid.*, **8**, 257 (1960).
- 2) M. Kawamura : dieses Bulletin, **8**, 262 (1960).
- 3) K. Tsuda, S. Ikuma, M. Kawamura, R. Tachikawa, Y. Baba, T. Miyadera : *Ibid.*, **10**, 245, 856, 865 (1962).
- 4) T. Goto, Y. Kishi, Y. Hirata : *Bull. Chem. Soc. Japan*, **35**, 1045 (1962).

TABELLE I. Gitterkonstanten und Dichten
des Tetrodonsäurebromhydrates

$$a = 20.231 \text{ \AA}$$

$$b = 10.590 \text{ \AA}$$

$$c = 6.813 \text{ \AA}$$

$$D_{\text{beobachtet}} = 1.821 \text{ g/cm}^3$$

physikalischen Daten der freien Säure ließen die Raumstruktur von Abbildung II schließen: die dreidimensionalen Patterson-Synthesen wurden unter Benutzung der ordentlichen und modifizierten Typen durchgeführt, woraus sich die Lage des Bromions ermittelten ließ. Auf Grund der mehrmaligen dreidimensionalen Fourier-Synthesen unter Berücksichtigung der Bromion-Punktlage kamen wir zu einem Modell des Moleküls. In Abbildung I sind die Ergebnisse der Rechnung in einer schnittweisen Projektion der dreidimensionalen Elektronendichte längs der c-Achse dargestellt. Aus dieser Projektion geht die Raumstruktur des Tetrodonsäurebromhydrates mit Hilfe der folgenden Daten klar hervor: die Anwesenheit einer disubstituierten Guanidylgruppierung ist mit der negativen Sakaguchi-Farbreaktion und den Infrarotspektren gesichert; die Protonenresonanzabsorptionen sind in Tabelle II zusammengefaßt. Alle Signale lassen sich auf Grund der Struktur von Abbildung II auflösen. Die Tetrodonsäure verbraucht für seine partielle

TABELLE II. Kernmagnetische Protonenresonanzspektren
von Tetrodonsäure, gemessen mit dem Varian Spektrometer
A-60 bei 60 MHz in D_2O (55 mg/0.5 ml) mit H_2SO_4
und mit Dioxan als Referenzstandard

δ (p.p.m.)	Zahl der Protonen	
2.92	Dublett ($J, 5 \text{ c.p.s.}$)	1
3.67	Dioxan (Referenzstandard)	—
3.86	Singlett	2
3.98	Quadruplett ($J, 4.2 \text{ c.p.s.}, J, 1.1 \text{ c.p.s.}$)	1
4.13	Quadruplett ($J, 5 \text{ c.p.s.}, J, 1.1 \text{ c.p.s.}$)	1
4.42	Dublett ($J, 4.2 \text{ c.p.s.}$)	1
5.42	Singlett	1
5.47	"	1

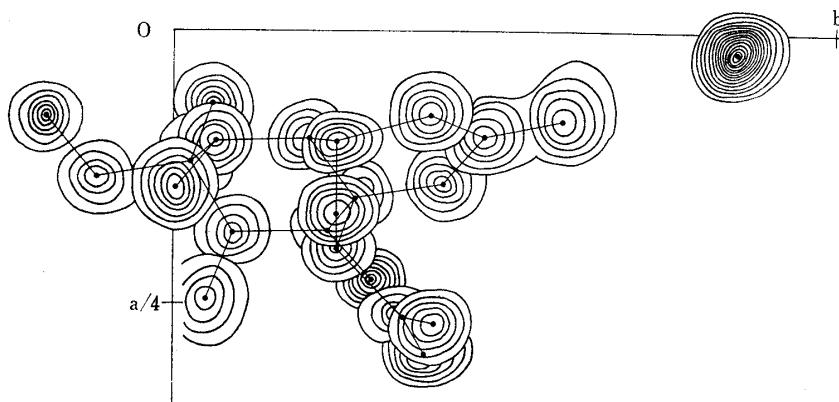


Abbildung I. Schnittweise Projektion der dreidimensionalen Fourier-Synthese entlang der c-Achse

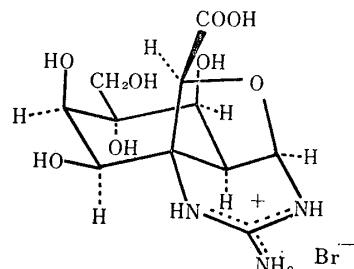
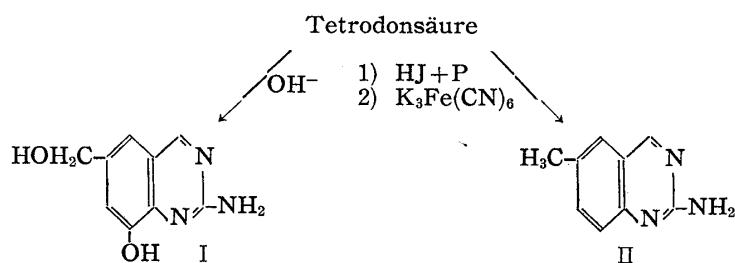


Abbildung II. Raumstruktur des Tetrodonsäurebromhydrates

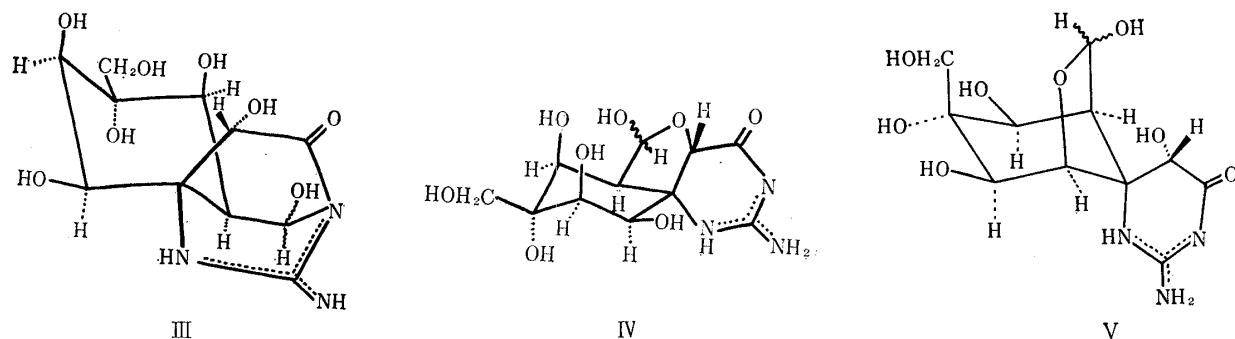


Schema 1.

Oxydation 1 Mol Perjodsäure, und es bildet sich 1 Mol Formaldehyd. Daraus wird geschlossen, daß eine Gruppierung von HO-C-CH₂OH in der Molekel existiert. Außerdem läßt sich Tetrodonsäure nach den beim Abbau des Tetrodotoxins benutzten Methoden einerseits in I, andererseits in 2-Amino-6-methylchinazolin (II) überführen.

Für die Struktur der freien Tetrodonsäure ist nun geschlossen, daß sie durch hydrolytische Abspaltung einer C-O oder einer C-N Verknüpfung an der Carbinolaminogruppierung (siehe Abbild. II) entsteht oder, daß sie nur eine Hydratform darstellt.

Schließlich berühren wir die Struktur des Tetrodotoxins: nach dem Infrarotspektrum und PKa' (8.3) existiert in der Molekel eine Lactamgruppierung: im Infrarotspektrum ist keine Absorptionsbande einer Aldehydgruppe sichtbar; die Hydroxymethyl-Seitenkette am Cyclohexanring läßt sich durch Protonenresonanzspektren und Perjodsäure-Oxydation bestätigen. Damit läßt sich für die Struktur des Tetrodotoxins zuerst die Form III bzw. IV bzw. V in Betracht ziehen. Andererseits auf Grund der chemischen und physikalischen Untersuchungen über Tetrodotoxinderivate scheint für das Tetrodotoxin eine C₂₂-Formel, Bis-form der C₁₁-Reihe, möglich zu sein.



Schema 2.

*Institut für angewandte Mikrobiologie
der Universität Tokio.
Yayoi-cho, Bunkyo-ku, Tokio.*

*Takamine-Laboratorium,
Sankyo A.G.
Nishishinagawa, Shinagawa-ku, Tokio.*

Eingegangen am 30. Oktober 1963

Kyosuke Tsuda (津田恭介)

Chihiro Tamura (田村千尋)
Ryuji Tachikawa (太刀川隆治)
Kiyoshi Sakai (酒井淨)
Osamu Amakasu (甘粕治)
Masaaki Kawamura (河村正朗)
Susumu Ikuma (生熊晋)