

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-hydroxymethyl-8-chinazolinol (I) mit Sicherheit nachgewiesen.³⁾ Es war auch von Bedeutung, daß bei der obengenannten Reaktion mittels Kalilauge als ein andres 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 C₁₁H₉O₉N₃ (*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 $\nu_{\max}^{\text{Nujol}}$ 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 zersezt über 300° und zeigt die optische Drehung von $[\alpha]_D^{20} +10.1^\circ$ (c=1.09, 2% HCl); mit Halogenwasserstoffsäure bildet sich unter Entfernung von ein Mol Wasser das entsprechende Tetrodonsäurehalogenohydrat, 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 $\nu_{\max}^{\text{Nujol}}$ cm⁻¹ : 1665, 1576 (Disubst.-Guanidinium), 1724 (Carboxyl); das Molekulargewicht dieses Bromohydrates 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 Bromohydrat besonders gut für die röntgenographische Strukturanalyse eignet. In Tabelle I sind die Gitterkonstanten und die Dichten der orthorhombischen Modifikation des Bromohydrates 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 Tetrodonsäurebromohydrates um 400.2 handelt.

Die Weißenberg-Aufnahmen des Tetrodonsäurebromohydrates 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).

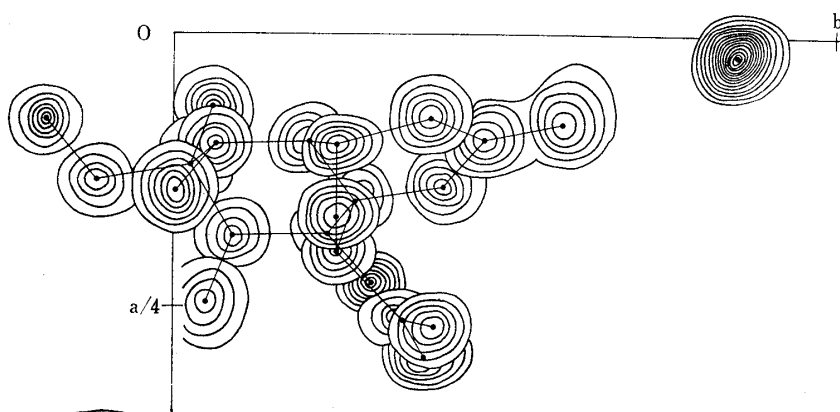
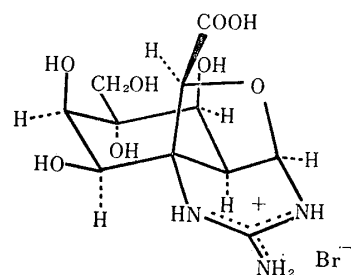
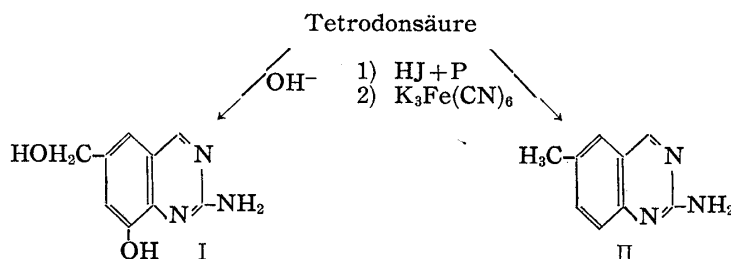
TABELLE I. Gitterkonstanten und Dichten
des Tetrodonsäurebromohydrates

$a = 20.231 \text{ \AA}$	$c = 6.813 \text{ \AA}$
$b = 10.590 \text{ \AA}$	$D_{\text{beobachtet}} = 1.821 \text{ g/cm}^3$

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 ermitteln ließ. Auf Grund der mehrmaligen dreidimensionalen Fourier-Synthesen unter Berücksichtigung der Bromanion-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 Tetrodonsäurebromohydrates 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 c.p.s.)	1
3.67	Dioxan (Referenzstandard)	—
3.86	Singlett	2
3.98	Quadruplett (J, 4.2 c.p.s., J, 1.1 c.p.s.)	1
4.13	Quadruplett (J, 5 c.p.s., J, 1.1 c.p.s.)	1
4.42	Dublett (J, 4.2 c.p.s.)	1
5.42	Singlett	1
5.47	"	1

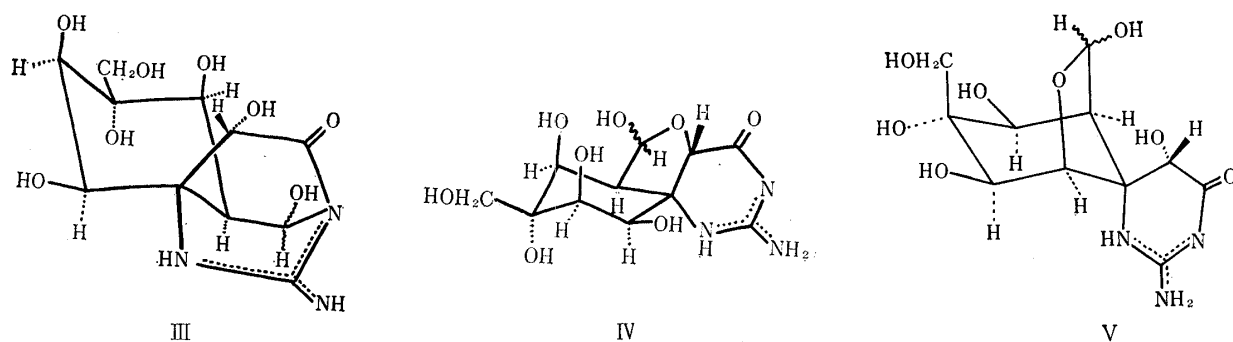
Abbild. I. Schnittweise Projektion der dreidimensionalen
Fourier-Synthese entlang der c-AchseAbbild. II. Raumstruktur
des Tetrodonsäure-
bromohydrates

Schema 1.

Oxydation 1 Mol Perjodsäure, und es bildet sich 1 Mol Formaldehyd. Daraus wird geschlossen, daß eine Gruppierung von $\text{HO}-\text{C}-\text{CH}_2\text{OH}$ 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 Carbinolamin-gruppierung (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 C_{22} -Formel, Bis-form der C_{11} -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 浄)
Osamu Amakasu (甘粕 治)
Masaaki Kawamura (河村 正朗)
Susumu Ikuma (生熊 晋)