

features were present. Reduction of **X** with sodium borohydride at a room temperature for 1.5 hours or with aluminum amalgam in ether-water afforded dihydrodehydrocostus lactone, $C_{15}H_{20}O_2$, m.p. $35\sim 36^\circ$, $[\alpha]_D +17.7^\circ$, which was identified as mokko lactone (**I**). On prolonged reduction with sodium borohydride, **X** gave the lactol (**VII**), $C_{15}H_{22}O_2$, m.p. 111° , $[\alpha]_D -40.0^\circ$.

The authors wish to express their gratitude to Wing Tai Hong, Hong Kong, for "Sen-mokko" and to Morishita Jintan Co., Ltd., for costus root. Thanks are also due to Research Laboratories, Takeda Chemical Industries, Ltd., for NMR spectra.

Pharmaceutical Institute,
Faculty of Medicine,
Tohoku University
Kita-4-bancho, Sendai

Hiroshi Hikino	(ヒキノ ヒロシ)
Kanji Meguro	(目黒 寛司)
Genjiro Kusano	(草野 源次郎)
Tsunematsu Takemoto	(竹本 常松)

Received February 20, 1964

[Chem. Pharm. Bull.]
12 (5) 634 ~ 642

UDC 547.993.02 : 597.54

Über die Konstitution und Konfiguration des Anhydrotetrodotoxins^{*1}

In einer früheren Mitteilung¹⁾ ist bereits beschrieben worden, daß man auf Grund der Analysen- und Titrationsresultate dem Tetrodotoxin (**I**) eine Bruttoformel von $C_{12}H_{19}O_9N_3$ geben kann, wenn man es als eine monoacidische Base ansieht. Aber, **I** zeigt keinen Schmelzpunkt und ist eine Substanz, die sich schwer durch Umkristallisierung reinigen läßt. Deshalb wurde diesmal **I** in 6,11-Diacetyl-(**II**) bzw. 11-Monoformylanhydrotetrodotoxin (**III**) übergeführt und dann durch Behandlung mit 5%-iger Salzsäure in den ursprünglichen Zustand zurückversetzt; das auf diese Weise gereinigte **I**^{*2} zeigte die der Bruttoformel von $(C_{11}H_{17}O_8N_3)_n$ ($n=1$ oder 2) entsprechenden Analysenwerte^{*3,2)} (Ber. : C, 41.38; H, 5.33; O, 40.12; N, 13.17. Gef. : C, 41.14, 41.16, 40.88; H, 5.46, 5.52, 5.57; O, 39.85, 39.59; N, 13.16, 13.02, 13.23).

In der vorliegenden Kurzmittteilung schreiben wir zuerst über die verschiedenen Derivate, die bis jetzt von uns gewonnen worden sind, und dann befassen wir uns mit der Struktur von Anhydrotetrodotoxin bzw. Tetrodotoxin in der Beziehung einerseits zu Tetrodonsäurebromohydrat (**Va**) andererseits zu Bromoanhydrotetrodonsäurelactonbromohydrat; denn das erstgenannte ist von uns³⁾ und das letzte von Nitta, *et al.*⁴⁾ die Struktur betreffend ohne Frage durch Röntgenuntersuchungen aufgeklärt worden. Außerdem möchten wir über unsere letzte Röntgenanalyse von Anhydrotetrodotoxindi-acetat-Jodhydrat berichten, was der Struktur von Anhydrotetrodotoxin bzw. Tetrodotoxin betreffend wichtige Rolle spielt.

^{*1} Sie wird bei der Jahresversammlung der 84st Japanischen Pharmazeutischen Gesellschaft in Tokio, am 7. April 1964 sowie dem IUPAC Symposium für Naturstoffchemie in Kyoto, am 13. April 1964 vorgetragen.

^{*2} Dessen Tierversuche mit Mäusen zeigen den LD₅₀-Wert von 9.5 γ/1 Kg.

^{*3} Goto, *et al.* haben dem Tetrodotoxin die Formel $C_{11}H_{17}O_8N_3$ gegeben (Siehe Fußnote 2); aber wir geben dem Tetrodotoxin die Bruttoformel $C_{22}H_{32}O_{15}N_6 \cdot H_2O$, die sich aus unserer nachfolgenden Kurzmittteilung erklärt.

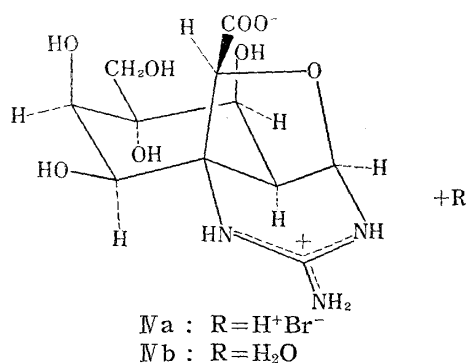
1) K. Tsuda, K. Kawamura : dieses Bulletin, 8, 257 (1960).

2) T. Goto, Y. Kishi, S. Takahashi, Y. Hirata : Tetrahedron Letters, No. 30, 2105 (1963).

Tetrodonsäure

Diese Säure, $C_{11}H_{19}O_9N_3$, läßt sich aus I bzw. dessen Derivaten durch Behandlung mit Wasser gewinnen.^{*4,2,3)} Für ihre Struktur gilt also, daß sie durch hydrolytische Abspaltung der Sauerstoff-Brücke zwischen C_4 und C_9 von ihrem Bromwasserstoffsalmolekül (Na), $C_{11}H_{17}O_8N_3 \cdot HBr$, entsteht^{*4} oder, daß sie 1 Mol Kristallwasser enthält (Nb); denn die Bruttoformel der freien Säure besitzt um 1 Mol H_2O mehr als diejenige der Na-Base.

Wir gaben diese Säure die Hydratform von Nb auf Grund folgender Daten: 1) Die Protonenresonanzspektren geben bei der Messung im acidischen, sowie auch im alkalischen Lösungsmittel dieselbe Signale, insbesondere zwei Singulette (C_4-H , C_9-H) im niedrigeren Feld (siehe Abbild. 1). 2) Durch 30 stündigem Trocknen im Vakuum bei 100° ergibt sich eine kristallwasserfreie Substanz von der Bruttoformel $C_{11}H_{17}O_8N_3$ (Ber.: C, 41.38; H, 5.33; N, 13.17; O, 40.12. Gef.: C, 41.42; H, 5.38; N, 12.99; O, 40.28). 3) Wenn man die kristallwasserfreie Substanz 4~5 Stunden lang im Wasser liegen läßt, gewinnt sie wieder ihre ursprüngliche Hydratform zurück, was durch Elementaranalyse, Infrarotspektrum und Bromhydrat (Na)-Bildung bewiesen werden konnte. 4) Beim Erhitzen von Nb mit Deuteriumoxid findet der Deuteriumaustausch an C_9-H nicht statt.



Abbild. 1. Raumstruktur der Tetrodonsäure

6,11-Diacetyl- und 11-Monoformylanhydrotetrodotoxin

Acetylierte man I mit Acetanhydrid und Pyridin entstand ein Polyacetat,^{*5} das durch Methanolyse in Diacetylanhydrotetrodotoxin (II) von der Bruttoformel $C_{11}H_{13}O_7N_3 \cdot (CH_3CO)_2$ (Ber.: C, 46.75; H, 4.93; O, 37.40; N, 10.91. Gef.: C, 46.88; H, 5.31; O, 37.22; N, 10.76), $IR \nu_{max}^{Nujol} \text{ cm}^{-1}$: 1747, 1676, 1604, 1232~1258 und pK_a' 7.3 verwandelt wurde. Formylierte man andererseits I durch 1.5 stündigem Erhitzen mit Ameisensäure bei $85 \sim 90^\circ$, entstand auch ein polyformat, das durch Methanolyse in das Monoformylanhydrotetrodotoxin (III)-Ameisensäuresalz von der Bruttoformel $C_{11}H_{14}O_7N_3 \cdot HCO \cdot HCOOH$ (Ber.: C, 41.60; H, 4.57; O, 42.63; N, 11.20. Gef.: C, 41.63; H, 4.67; O, 42.63; N, 11.01) und $IR \nu_{max}^{Nujol} \text{ cm}^{-1}$: 1720, 1670, 1580, 1149 verwandelt wurde. Dieses Salz ist im wasser leicht löslich und diese Lösung ergibt durch Zugabe von Methanol das freie III von der Bruttoformel $C_{11}H_{14}O_7N_3 \cdot HCO$ (Ber.: C, 43.77; H, 4.59; O, 38.88; N, 12.76. Gef.: C, 42.57; H, 5.05; O, 39.04; N, 12.54). Nach röntgenanalytischen Untersuchungen erwies sich, daß

^{*4} Goto, *et al.* haben durch Erhitzen von Tetrodotoxin mit Wasser auch Tetrodonsäure erhalten und über die Struktur dieser Säure auf Grund der chemischen Verhalten sowie der physikalischen Daten die Strukturformel diskutiert; siehe Fußnote 2.

^{*5} Nach der osmometrischen Methode zeigte es den MG-Wert von 677.

Nach persönlicher Mitteilung von Prof. H. S. Mosher, wurde es durch Chromatographieren an Silikäsäure gereinigt, wobei sich Heptaacetat von Schmp. $188.5 \sim 191.5^\circ$, Pentaacetat vom Schmp. $205.5 \sim 207^\circ$ und Diacetat isolieren ließen.

Prof. R. B. Woodward hat mir auch persönlich mitgeteilt, daß als Acetylierungsprodukt Heptaacetylanhydrotetrodotoxin vom Schmp. $192 \sim 194^\circ$ (MG=595) und Octaacetylanhydrotetrodotoxin vom Schmp. 214° (MG=637) in seinem Laboratorium gewonnen worden sind. Wir danken den Herren Prof. H. S. Mosher und Prof. R. B. Woodward bestens für die Bekanntgabe ihrer Ergebnisse. Durch Acetylieren mittels Acetanhydrid und *p*-Toluolsulfonsäure entsteht Tetraacetyltetrodotoxin-*p*-toluolsulfonat; T. Goto, S. Takahashi, Y. Kishi, Y. Hirata: Bull. Chem. Soc. Japan, **37**, 283 (1964).

3) K. Tsuda, C. Tamura, R. Tachikawa, K. Sakai, O. Amakasu, M. Kawamura, S. Ikuma: dieses Bulletin, **11**, 1473 (1963).

4) Y. Tomiie, A. Furusaki, K. Kasami, N. Yasuoka, K. Miyake, M. Haisa, I. Nitta: Tetrahedron Letters, No. **30**, 2101 (1963).

das Molekulargewicht des III-Ameisensäuresalzes den Wert von 391 beträgt. II ergab Jodwasserstoffsäuresalz*⁶ von der Bruttoformel $C_{11}H_{13}O_7N_3 \cdot (CH_3CO)_2 \cdot C_{11}H_{12}O_6N_3(CH_3CO)_2 \cdot OCH_3 \cdot 2HI$ (Ber.: C, 35.78; H, 4.07; O, 27.68; N, 8.08; I, 24.39. Gef.: C, 35.12; H, 4.05; O, 26.25; N, 7.68; I, 22.91) das sich durch Umkristallisierung aus Methanol-Äther reinigen läßt.

Anhydrotetrodotoxin

II, III und III-Ameisensäuresalz ergaben durch Behandlung mit 1%-iger Alkalilauge das Anhydrotetrodotoxin (V)*⁷ von der Bruttoformel $C_{11}H_{16}O_7N_3$ (Ber.: C, 43.85; H, 5.02; O, 37.18; N, 13.95. Gef.: C, 43.50; H, 5.33; O, 36.96; N, 13.74). IR ν_{\max}^{Nujol} cm^{-1} : 1670, 1586, 1105, 1079, 922 und pK_a' 8.3. V ergab das Ameisensäuresalz von der Bruttoformel $C_{11}H_{15}O_7N_3 \cdot HCOOH$ (Ber.: C, 41.50; H, 4.93; O, 41.47; N, 12.10. Gef.: C, 41.69; H, 5.02; O, 41.70; N, 12.04) bzw. Essigsäuresalz von der Bruttoformel $C_{11}H_{15}O_7N_3 \cdot CH_3COOH$ (Ber.: C, 43.21; H, 5.30; O, 39.86; N, 11.63. Gef.: C, 43.46; H, 5.35; O, 40.43; N, 11.26). Aus dem M.G.-Wert des III-Ameisensäuresalzes ist bewiesen, daß V die C_{11} -Formel besitzt. Durch Acylierung von V ergaben sich II und III.

Tetrodaminotoxin*⁸

Durch 7 tägigen Rühren von II, III, V und Methoxytetrodotoxin mit 10~20%-igem Ammoniak bei Zimmertemperatur ließ sich Tetrodaminotoxin (VI) von der Bruttoformel $C_{22}H_{33}O_{14}N_7$ (Ber.: C, 42.65; H, 5.33; O, 36.19; N, 15.83. Gef.: C, 42.41, 42.00, 41.99; H, 5.82, 5.84, 5.56; O, 36.15, 35.75, 36.00; N, 16.27, 16.08, 16.20) und pK_a' 8.8 gewinnen. Infrarot- und Protonenresonanzspektrum sind mit denjenigen von Tetrodotoxin sehr ähnlich.

Durch Behandlung von VI mit 10%-iger Salzsäure und Natriumnitrat ergab sich zuerst V, das sich jedoch bei längerem Diazotierungsreaktion in Tetrodotoxin verwandelte.

Methoxytetrodotoxin

Durch Behandlung von I bzw. V mit getrocknetem Chlorwasserstoff und Methanol bzw. Äthanol ließ sich Methoxytetrodotoxin (VII) von der Bruttoformel von $C_{11}H_{16}O_7N_3 \cdot OCH_3$ (Ber.: C, 43.24; H, 5.75; O, 38.40; N, 12.61. Gef.: C, 43.36; H, 5.97; O, 38.09; N, 12.57) bzw. Äthoxytetrodotoxin von der Bruttoformel von $C_{11}H_{16}O_7N_3 \cdot OC_2H_5 \cdot H_2O$ (Ber.: C, 40.73; H, 6.57; O, 41.74; N, 10.96. Gef.: C, 41.15; H, 6.16; O, 41.57; N, 11.72) gewinnen. In Protonenresonanzspektren zeigt VII die ähnliche Signale mit I.

Deoxytetrodotoxin

I und V ergaben durch katalytische Hydrierung mit Platinoxid in 5%-iger Salzsäure das Deoxytetrodotoxin (VIII)*⁹ von der Bruttoformel von $C_{11}H_{17}O_7N_3$ (Ber.: C, 43.56; H, 5.65; O, 36.93; N, 13.86. Gef.: C, 43.51; H, 6.01; O, 36.71; N, 13.48).

Alle obenerwähnte Tetrodotoxinderivate, ausgenommen VIII, ergaben durch Behandlung mit 5~10%-iger Salzsäure das Tetrodotoxin; andererseits ergaben diese, ausgenommen VIII, durch Erhitzen mit Wasser das IVb. Die C_9 -Base (2-Amino-6-hydroxymethyl-

*⁶ Wenn dieses Salz im Wasser oder Methanol gelöst und mit Pyridin versetzt wurde, entstand II in einer Ausbeute von 85%.

*⁷ III-Ameisensäuresalz im Wasser gelöst und dann mit 5~6%-igem Ammoniak alkalisch gemacht wurde, schieden sich sofort die Kristalle die sich nach chemischen sowie physikalischen Daten als polymorph mit Anhydrotetrodotoxin erwiesen.

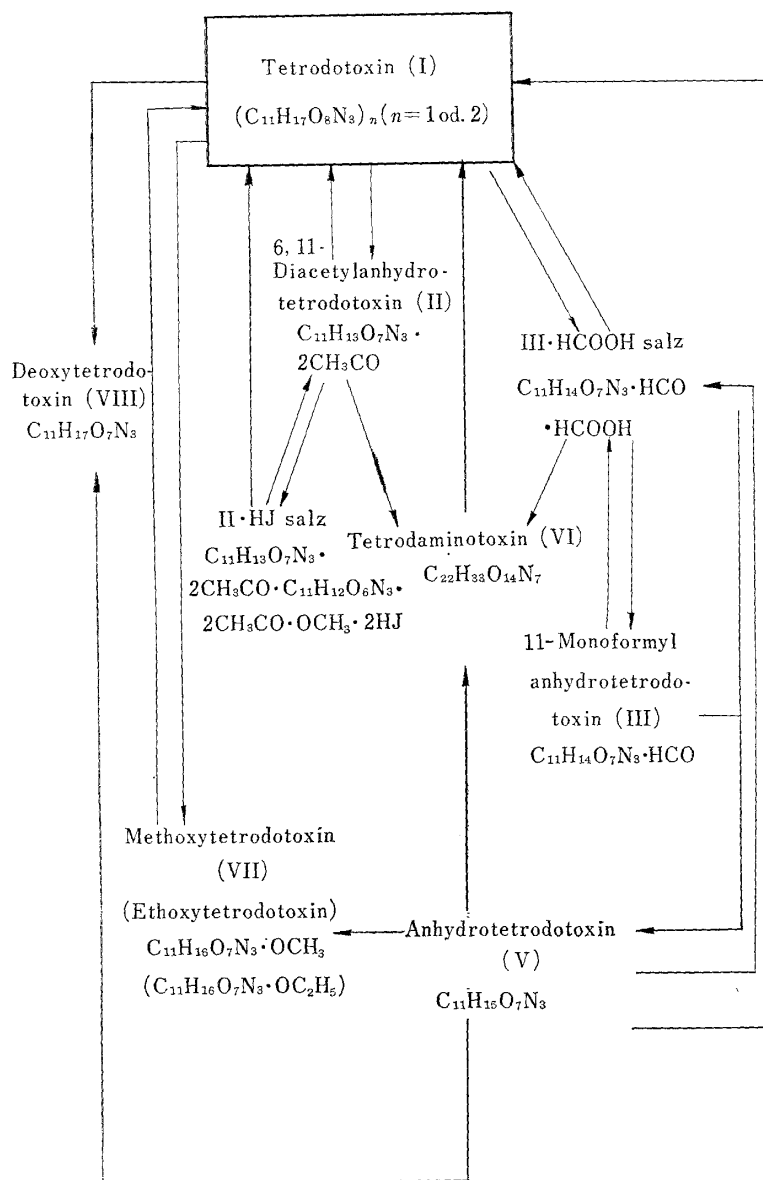
*⁸ Je nach den Reaktionsbedingungen entstanden andere Kristalle, die sich mit einander verglichen nach allen Daten als polymorph erwies. Es besitzt die C_{22} -Formel, deren Struktur sich aus nachfolgender Kurzmitteilung aufklärt.

*⁹ Durch 10 stündigem Erhitzen mit Wasser ergibt sich keine Aminosäure.

8-chinazolinol)*^{10,5)} ließ sich auch bei der Behandlung dieser Derivate, ausgenommen VIII, mittels Alkalilauge gewinnen.

Zusammenfassung der Protonenresonanzspektren

Was die Spektren betrifft, lassen sie sich zu zwei Gruppen zusammenfassen (siehe Abbild. 2~10): Gruppe A (I, VI, VII); diese Gruppe läßt sich mit Protonenresonanzspektrum von I (Abbild. 2) repräsentieren; d.h., das bei ca. 2.3 ppm (δ) zentrierte Dublett (stumpfe) ($J=9.0$; 1H) im höheren Feld dem $C_{4\alpha}$ -H zuzuordnen ist, das sich mit C_4 -H kuppelt, dessen Signal bei ca. 5.6 ppm ($J=9.0$; 1H)*¹¹ in niedrigerem Feld beobachtet wird. Gruppe B (II, III, V); diese Gruppe wird mit Protonenresonanzspektrum von V repräsentiert; d.h., daß das bei ca. 3.1 ppm (δ) zentrierte Dublett ($J=3.0$; 1H) ist dem $C_{4\alpha}$ -H zuzuordnen, das mit dem bei ca. 4.5 ppm (δ) beobachteten C_5 -H Signal gekuppelt ist.*¹¹ Das Signal des C_4 -H kann dabei als Singulett bei ca. 5.6 ppm (δ) beobachtet werden.



Schema 1

Strukturaufklärung durch Chemische Untersuchungen

Beim Erhitzen von I mit Deuteriumoxid ergab sich Deuterotetrodonsäure. Mit den protonenresonanzspektren Untersuchungen ist bewiesen, daß der Deuteriumaustausch des direkt am Kohlenstoff gebundenen Wasserstoffes dabei nur an C_9 , nicht aber an $C_{4\alpha}$ geschieht.

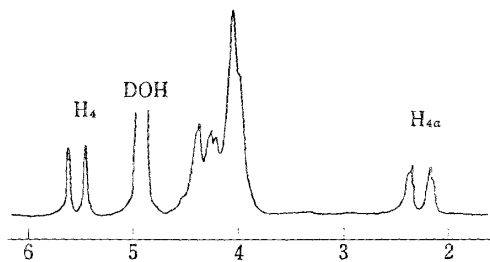
Nach der Methode von Goto, *et al.*⁶⁾ haben wir I mit Deuteriumoxid und Bariumdeuteriooxid in die Deuteroanhydrotetrodonsäure verwandelt, deren Protonenresonanzspektren bewiesen, daß bei diesem Reaktionsverlauf kein Deuteriumaustausch am Kohlenstoff

*¹⁰ Prof. R.B. Woodward hat mir damals persönlich mitgeteilt, daß seine Kollegen aus chemischen sowie protonenresonanzspektren Untersuchungen auf gleichen Schluß gezogen hatten.

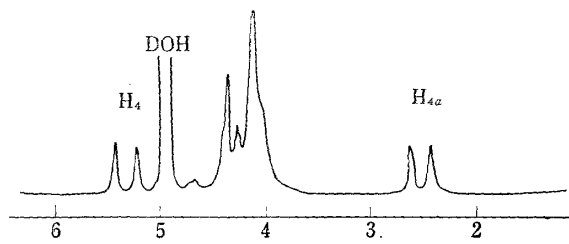
*¹¹ Es wird durch Dekupplungsuntersuchungen festgestellt.

5) K. Tsuda, S. Ikuma, M. Kawamura, R. Tachikawa, Y. Baba, Y. Miyadera: dieses Bulletin, **10**, 245, 856, 865 (1962); T. Goto, Y. Kishi, Y. Hirata: Bull. Chem. Soc. Japan, **35**, 1045 (1962).

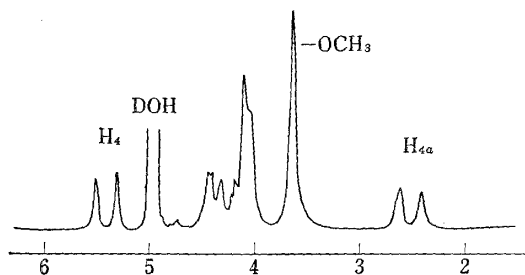
6) T. Goto, S. Takahashi, Y. Kishi, Y. Hirata: Tetrahedron Letters, No. **30**, 2115 (1963).



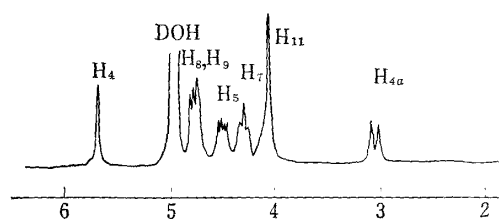
Abbild. 2. Tetrodotoxin (I)

CD₃COOD-D₂O (TMC)

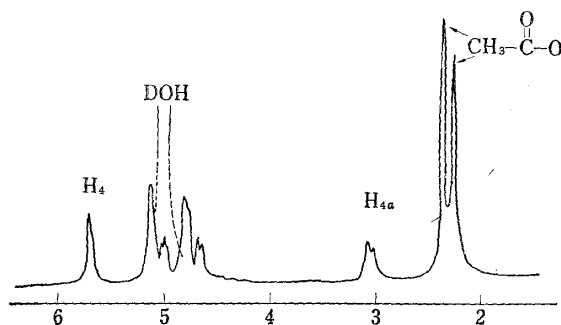
Abbild. 3. Tetrodaminotoxin (VI)



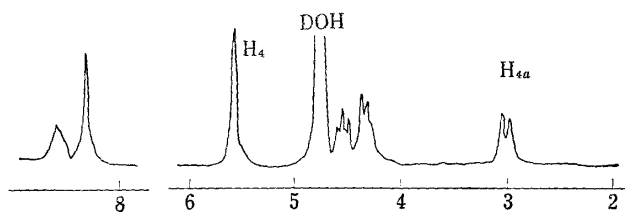
Abbild. 4. Methoxytetrodotoxin (VII)

CD₃COOD-D₂O (TMC)

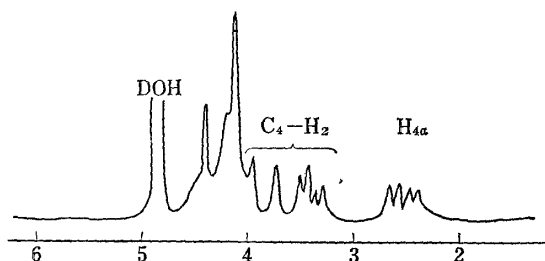
Abbild. 5. Anhydrotetrodotoxin (V)



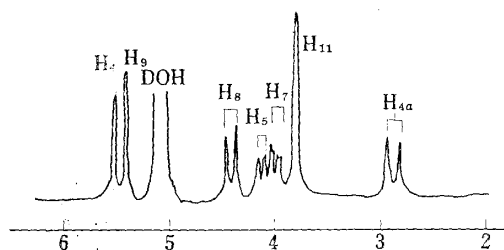
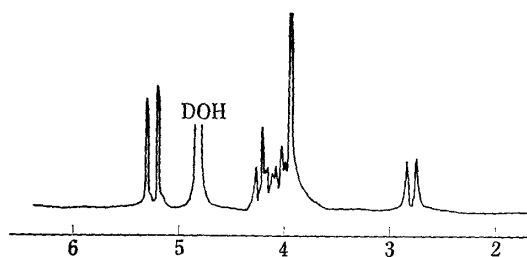
Abbild. 6. 6,11-Diacetylanhydrotetrodotoxin (II)

CD₃COOD-D₂O (TMC)

Abbild. 7. 11-Monoformylanhydrotetrodotoxin (III)-Ameisensäuresalz



Abbild. 8. Deoxytetrodotoxin (VIII)

CD₃COOD-D₂O (TMC)Abbild. 9. Tetrodonsäure
D₂O-H₂SO₄ (TMC)Abbild. 10. Tetrodonsäure
D₂O-NaOH (TMC)

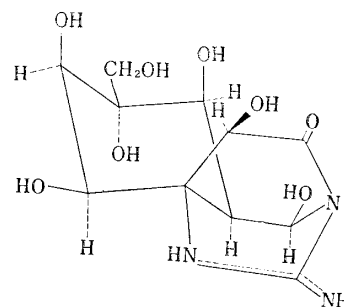
gebundenen Wasserstoffes stattfindet. Beim Erhitzen von Nb mit Deuteriumoxid fand solcher Deuteriumaustausch auch nicht statt.

Daraus folgt, daß die C_9 -Konfiguration von Bromoanhydrotetrodonsäurelacton⁴⁾ die ursprüngliche Konfiguration von Tetrodotoxin unverändert bewahrt. Folgedessen ist es auch selbstverständlich, daß sich die Lage des Wasserstoffes an C_9 von Tetrodotoxin im Reaktionsverlauf zu Tetrodonsäure durch Enolisierung umkehrt.

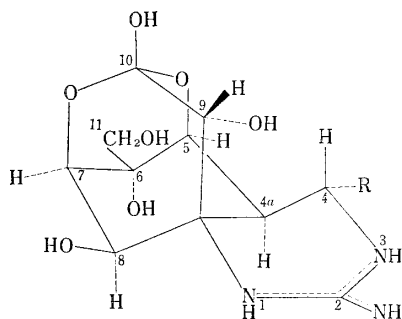
Die aus V durch Erhitzen mit Deuteriumoxid gewonnene Deuterotetrodonsäure zeigte auch in den Protonenresonanzspektren, daß die Deuterierung an C_9 geschieht, nicht aber an C_{4a} . Andererseits ließ sich V mit 5%-iger Deuteriumoxidlösung von Deuteriumchlorid in das Deuterotetrodotoxin überführen, dessen Protonenresonanzspektren kein an Kohlenstoff gebundenes Deuteriumatom aufweisen.

Daraus folgt, daß bei den obengenannten Umwandlungsreaktionen die Konfiguration an C_{4a} immer unverändert bewahrt wird; d.h. Tetrodotoxin und seine Derivate, nämlich II, III und V, besitzen wie Tetrodonsäure einen *trans*-Perhydrochinazolinring.

Da sich die in IV existierende Carboxylgruppe nicht in I nachweisen läßt, soll sie im Tetrodotoxinmolekül als Lacton oder Lactam oder Orthosäure-typus existieren. Die Lactongruppe wird nach infrarotspektren Untersuchungen abgelehnt; die vorher vorgeschlagene Lactamform^{3,6)} mit C_{11} -Formel läßt sich auch auf Grund folgender Daten ausschließen: wird eine Lactamform angenommen, so geht aus allen Daten die Strukturformel X hervor; dementsprechend soll V ein K-derivat mit 4-epimerem Hydroxyl und 5 (7), 9-O-Brücke sein. Mit diesen beiden Formeln kann nicht erklärt werden, daß es ein großer Unterschied in der Reaktivität von I und V in einer Pufferlösung von pH 4.5 gegen Natriumperjodat gibt; Reaktionsmechanismus der Umwandlungsreaktionen von I bzw. V läßt sich auch damit nicht erklären; die bei 1660 cm^{-1} beobachtete infrarotspektren Absorption von I verschwindet durch Deuterierungsversuch; d.h. diese Absorption rührt nicht aus der Amidocarbonylgruppierung her. Daraus folgt, daß für Tetrodotoxin nur der Orthosäure-typ möglich ist. Dabei gehen die folgenden Verknüpfungstypen hervor: 1) $C_4\text{-O-C}_{10}\text{-O-C}_5$; 2) $C_5\text{-O-C}_{10}\text{-O-C}_7$; 3) $C_7\text{-O-C}_{10}\text{-O-C}_8$; aber die Möglichkeit des ersten Typs wird nach Protonenresonanzspektren Daten abgelehnt; die Möglichkeit des dritten Typs läßt sich durch folgende chemische Verhalten ablehnen; d.h. I verbraucht schnell 1 Mol und nach ca. 5 Stunden ca. 3 Mol Perjodat; jedoch beim V

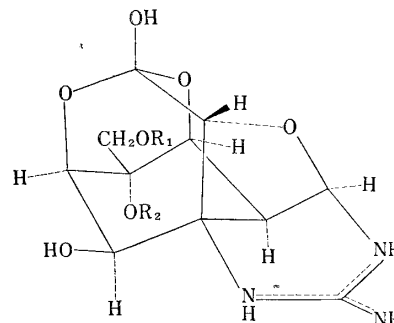


Abbild. 11. (Formel X): Falsche Raumstruktur von Tetrodotoxin; angenommen daß I die Formel $(C_{11}H_{17}O_8N_3)_{n=1}$ besitzt



I : R=OH VI : R=NH₂
VII : R=OCH₃ VIII : R=H

Abbild. 12. Korrekte Raumstruktur von Tetrodotoxin und seine Derivate; angenommen daß I die Formel $(C_{11}H_{17}O_8N_3)_{n=1}$ besitzt



V : R₁=R₂=H II : R₁=R₂=CH₃CO
III : R₁=HCO, R₂=H

Abbild. 13. Raumstruktur des Anhydrotetrodotoxin und seine Derivate

wird Perjodat langsam verbraucht; d.h. der Perjodat-verbrauch beträgt nach 3 Stunden 1 Mol und nach 50 Stunden nur 2 Mol.

Damit ist bewiesen, daß nur der zweite Typ möglich ist. Dabei müssen C_4 -H und C_{4a} -H die *trans*-diaxiale Lage besitzen; wodurch sich der größere Kupplungskonstant ($J=9$, cps) erklären läßt.

Wenn man für Tetrodotoxinmolekül die Bruttoformel von $(C_{11}H_{17}O_8N_3)_{n=1}$ verwendet, soll die Raumstruktur mit Abbild. 12 gezeichnet werden.

Anhydrotetrodotoxin (V) läßt sich immer aus I über Acylderivate (II, III) gewinnen. Bei der Acylierung findet die Entwässerung zwischen C_9 -OH und C_4 -OH statt; d.h. der nucleophile Angriff von C_9 -OH auf C_4 bewirkt die konfigurationsumkehrung von C_4 . Im Verlauf von II bzw. III zu V entsteht nur die hydrolytische Abspaltung der Acylgruppe. Daraus ist es ersichtlich, daß II, III und V mit Berücksichtigung der protonenresonanzspektren Resultate zu dieselbe Gruppe gehören; das Singulett von C_4 -H bei ca. 5.6 ppm (δ) ist ein charakteristisches Merkmal dieser Gruppe. In Abbild. 13 ist die Raumstruktur der Anhydrotetrodotoxinreihe gezeigt.

Was die konfiguration von C_4 betrifft, sind VI und VII auf Grund der Protonenresonanzspektren genau analog mit I.

Die obenerwähnten Umwandlungsreaktionen des Tetrodotoxins bzw. der Tetrodotoxinderivate lassen sich mit einmaliger oder zweimaliger S_N2 Substitutionsreaktion an C_4 leicht erklären. Bei dem VIII handelt es sich nach Protonenresonanzspektrum um die Verbindung, die die Hydroxylgruppe an C_4 von I mit Wasserstoff ersetzt wird.

In Bezug auf die Position der zwei Acetylgruppen von II, ließ sich die eine nach chemischen sowie physikalischen Daten an 11-Stelle feststellen; aber der Stellungsbe-
weis der anderen, d.h. für 6-Stelle, konnte nur durch unten erwähnte Röntgenanalyse geliefert werden.

Strukturaufklärung durch röntgenanalytische Untersuchungen

In der Fortsetzung unserer röntgenographischen Strukturanalyse von Tetrodon-säurebromohydrat haben wir diesmal das Halogenwasserstoffsalt von II verwendet, wobei der Einkristall von II-Jodhydrat sehr geeignet war. Die Gitterkonstanten und Dichten der monoklinischen Modifikation des Jodhydrates sind in Tabelle I angegeben. Die Dichtmessung ließ sich durch Floatation-Methode durchführen, wobei ein Gemisch von Tetrabromoäthan und Tetrachloromethan benutzt wurde. Aus der Schwingung sowie aus den Weissenberg-Aufnahmen des Jodhydrates ergab sich die Raumgruppe $P2_1$, oder $P2_1/m$. Wenn man annimmt daß der Einkristall des Jodhydrates als Naturstoffderivat optisch aktiv ist, kann er zur Raumgruppe $P2_1$ gehörig betrachtet werden.

Wenn die Lage des Moleküls asymmetrisch ist, dann liegen vier Moleküle je Elementarzelle vor; dementsprechend beträgt der MG-Wert 513.

TABELLE I. Gitterkonstanten und Dichten

$a = 19.34 \text{ \AA}$	$\beta = 82.6^\circ$
$b = 14.63 \text{ \AA}$	$V = 2010 \text{ \AA}^3$
$c = 7.18 \text{ \AA}$	$D_{\text{beobachtet}} = 1.69 \text{ g/cm}^3$

Raumgruppe: $P2_1-C_2^2$

Die Intensitäts-Daten wurden auf visuellem Wege durch Vergleich mit einer Schwärzungsskala gemessen. Durch Lorenz- und Polarisationskorrektur wurden sie nach der allgemeingebrauchlichen Methode korrigiert.

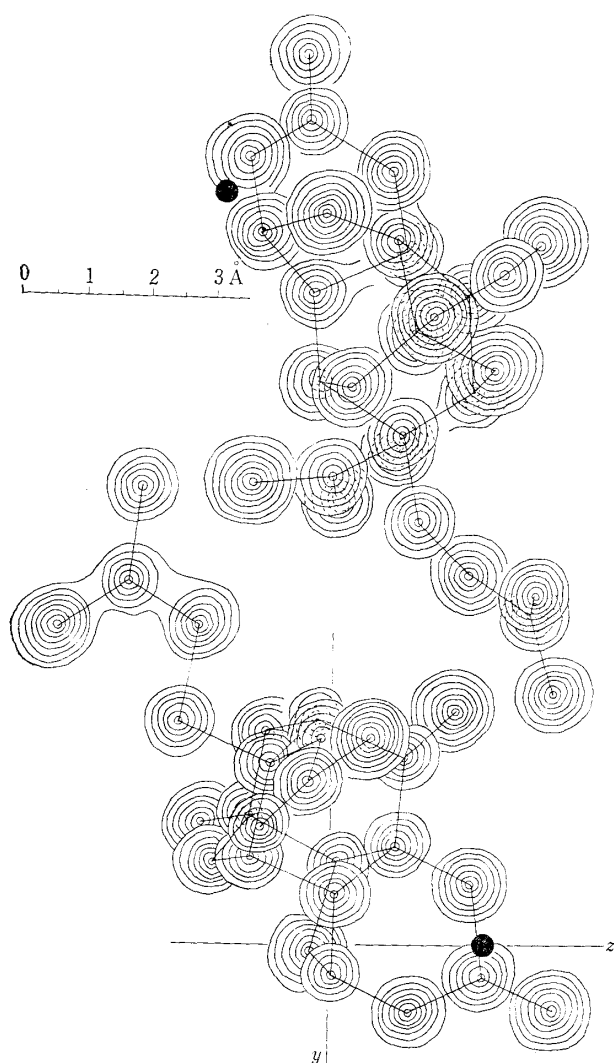
Die dreidimensionalen Patterson-Synthese wurde unter Benutzung der ordentlichen Typen durchgeführt, woraus sich die Punktlage des Jodions ermitteln ließ. Das Ergeb-

nis dieser Berechnung ergab, daß zwei Jodionen in asymmetrische Position zu einander in je einer halben Elementarzelle vorliegen.

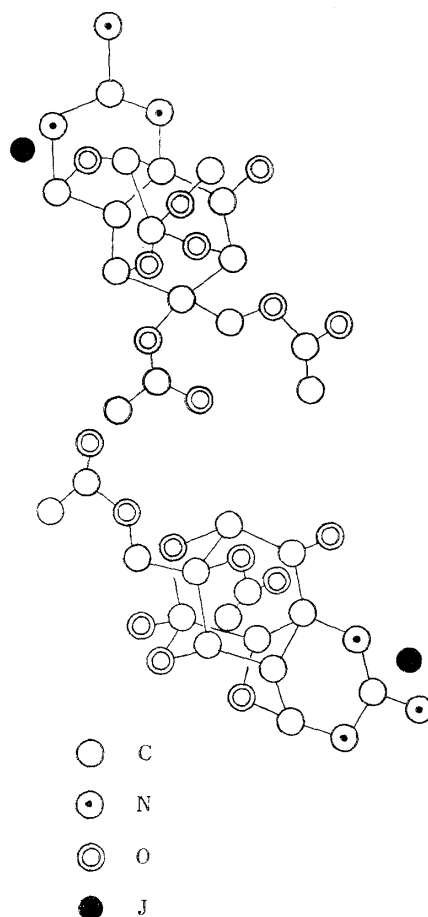
Auf Grund der mehrmaligen dreidimensionalen Fourier-Synthesen unter Berücksichtigung der Jodanion-Punktlage kamen wir zu zwei Modellen des Moleküls, die sich in der Struktur gleichen, abgesehen davon, daß das eine die Methylgruppe anstatt des Wasserstoffes des anderen Modells besitzt. In Bezug auf die Methylgruppe erscheint es uns nötig unsere Untersuchungen weiterzuführen.

In Abbild. 14 sind die Ergebnisse der Berechnung in einer schnittweisen Projektion der dreidimensionalen Elektronendichte längs der a -Achse dargestellt.

Aus dieser Projektion geht die Raumstruktur des Jodhydrates hervor, damit ist bewiesen, daß es sich bei diesem Salz um ein komplex von 6,11-Diacetylanhydrotetrodotoxinjodhydrat und dessen 10-Methyläther handelt. In Abbild. 15 ist das einzelne Molekülgerüst und die Verknüpfung der zwei Moleküle schematisch gezeigt.



Abbild. 14. Schnittweise Projektion der dreidimensionalen Fourier-Synthese entlang der a -Achse



Abbild. 15. Molekülgerüst von Diacetylanhydrotetrodotoxinjodhydrat, schematisch

Was die Raumstruktur der Anhydrotetrodotoxinreihe betrifft, wurden durch zwei voneinander unabhängige, nämlich röntgenanalytische und chemische, Versuche vollkommen identische Ergebnisse erzielt.

Besonders wichtig ist dabei das Ergebnis, daß die zwei krystallographisch selbständigen Moleküle, die in asymmetrischer Lage existieren, durch röntgenanalytische Untersuchungen eine identische Raumstruktur ergaben.

Wir danken Herrn Dr. Y. Sasada (Institut für Eiweißstoff der Universität Osaka) herzlich für die erfahrene Hilfe und freundliches Interesse.

*Institut für angewandte Mikrobiologie
der Universität Tokio. Bunkyo, Tokio.*

*Forschungslaboratorium, Sankyo A.G.
Nishishinagawa, Shinagawaku, Tokio.*

Eingegangen am 7. April 1964

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)

[Chem. Pharm. Bull.]
12 (5) 642 ~ 645

UDC 547.993.02 : 597.54

On the Structure of Tetrodotoxin*¹

In a previous communication¹⁾ we described the preparation of a crystalline tetrodaminotoxin*² (I) from 6,11-diacetylanhydrotetrodotoxin, anhydrotetrodotoxin and methoxytetrodotoxin on treatment with aqueous ammonia. The tetrodaminotoxin, pKa' 8.8, exhibits infrared absorption bands at 1679, 1623 (guanidine), and 1228 cm⁻¹, and shows no absorption maximum in ultraviolet region.

It could be converted into tetrodotoxin, anhydrotetrodotoxin, its diacetate and tetrodonic acid by the procedures shown in Chart 1.

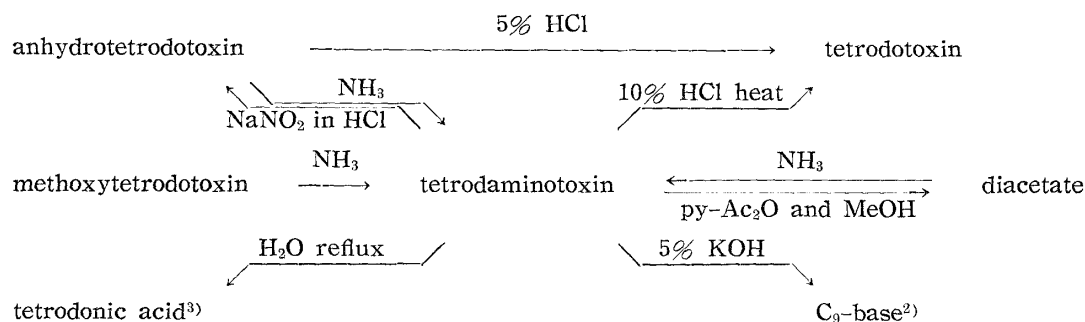


Chart 1.

*¹ Presented at the 84th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, April 7, 1964 (Tokyo University) and at the IUPAC Symposium on the Chemistry of Natural Products, April 13, 1964 (Kyoto).

*² It was found that the tetrodaminotoxin is dimorph, the second form shows in IR $\nu_{\max}^{\text{Nujol}}$ cm⁻¹: 1667, 1614 (guanidine) 1228 bands.

1) K. Tsuda, *et al.*: This Bulletin, **12**, 634 (1964).

2) K. Tsuda, *et al.*: *Ibid.*, **10**, 245, 856, 865 (1962); T. Goto, *et al.*: Bull. Chem. Soc. Japan, **35**, 1045 (1962).

3) K. Tsuda, *et al.*: This Bulletin, **11**, 1473 (1963); T. Goto, *et al.*: Tetrahedron Letters, No. **30**, 2105 (1963).