

45. Komplexe von Enniatinen und anderen Antibiotica mit Alkalimetall-Ionen

von H.-K. Wipf, Lavinia A. R. Pioda, Z. Štefanac¹⁾ und W. Simon

Organisch-Chemisches Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

(12. II. 68)

Summary. Crystalline 1:1-complexes of enniatins with potassium salts are described. Complex formation constants of different antibiotics with sodium and potassium are given.

Kürzlich konnte auf Grund von EMK.-Messungen an künstlichen Membranen [1] und dampfdruckosmometrischer Ermittlung [2] von Komplexbildungskonstanten erstmals gezeigt werden, dass das ionenspezifische Verhalten von Makrotetroliden [3] in Lebermitochondrien [4] [5] weitgehend auf eine Komplexbildung dieser Antibiotica als solche mit den entsprechenden Alkali-Ionen zurückzuführen ist. Diese Tatsachen sind inzwischen verschiedentlich bestätigt worden [6] [7]. Die Isolierung und Charakterisierung kristalliner Komplexe von Nonactin und Monactin mit Natrium-, Kalium- und Ammonium-Ionen [8] sowie die Ermittlung der Struktur des Komplexes von Nonactin mit Kaliumrhodanid durch RÖNTGEN-Analyse [9] dürften im Hinblick auf die Abklärung des Ionentransportmechanismus in lebenden Zellen von Wichtigkeit sein.

Vielleicht angeregt durch diese Arbeiten [1] [8]²⁾ sind parallel zu seinerzeit in unserem Laboratorium bereits eingeleiteten Untersuchungen auch Komplexe der Enniatine

Tabelle 1. EMK.-Messungen an Messkette (1) (25° C)

Antibioticum	EMK. in mV für die Kationen				
	Li ⁺	Na ⁺	K ⁺	Rb ⁺	Cs ⁺
Nonactin (72%)/Monactin (28%) (ca. 0,1M in CCl ₄)	0	50	145	126	84
Enniatin B (ca. 0,25 M in CCl ₄)	0	4,5	60	39	24
«Enniatin A» ³⁾ (konz. Lösung in CCl ₄)	—*)	11	75	84	54

*) Messungen bezogen auf eine 10⁻³M KCl-Lösung (vgl. «Experimentelles»)

1) Institut für organische Chemie und Biochemie, Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Zagreb, Jugoslawien.

2) Privatmitteilung an Dr. V. T. IVANOV anlässlich seines Besuches am Laboratorium für Organische Chemie der ETH, Zürich, vom 6. Mai 1967.

3) Das verwendete «Enniatin A» enthält auf Grund von Massenspektren folgende Homologe:

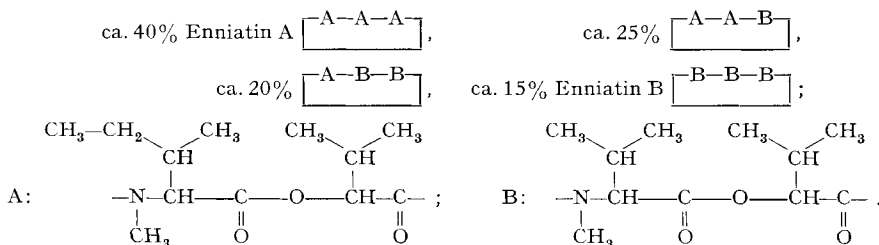
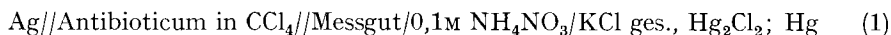


Tabelle 2. *Kationenselektivitäten* (bei den Symbolen der Kationen sind die Ladungen weggelassen)

Antibioticum	Selektivitätsreihenfolge	Messmethodik; evtl. Konzentration des Antibiotiums	Lit.
«Enniatin A» ³⁾	Rb > K > Cs > Na, Li	EMK., Kette (1)	
Enniatin B	K > Rb > Cs > Na > Li Rb > K > Cs > Na ≧ Li K > Na K > Cs ≧ Na	EMK., Kette (1) Komplexbildungskonstanten Komplexbildungskonstanten EMK. an Lipidmembranen	[11] [6]
Nonactin	K > Cs > Rb > Na ≧ Li K > Rb > Cs > Na ≧ Li K > Rb > Cs > Na, Li K > Na K > Na	Mitochondrien, freigesetztes P_i ; Mitochondrien, freigesetztes P_i ; Mitochondrien, freigesetztes P_i ; Komplexbildungskonstanten Induzierte ATP-ase Aktivität	[5] [5] [5] [8] [5]
Nonactin (72%)/Monactin (28%)	K > Rb > Cs > Na ≧ Li	EMK., Kette (1)	
Monactin	K ~ Rb > Cs ~ Na ≧ Li K > Rb > Cs > Na ≧ Li K > Rb > Cs ≧ Na > Li K > Na K < Na K > Na	Mitochondrien, freigesetztes P_i ; Mitochondrien, freigesetztes P_i ; Mitochondrien, freigesetztes P_i ; Mitochondrien, induzierte ATP-ase Aktivität; Mitochondrien, induzierte ATP-ase Aktivität; Komplexbildungskonstanten	[5] [5] [5] [5] [5] [8]
Valinomycin	K ~ Rb > Cs ≧ Na ~ Li K > Rb ~ Cs ≧ Na ~ Li Rb > K > Cs ≧ Na ≧ Li K ≧ Na K ≧ Na Rb ~ K ~ Cs > Na > Li K ≧ Na	Mitochondrien, freigesetztes P_i ; Mitochondrien, freigesetztes P_i ; EMK. an Lipidmembranen Komplexbildungskonstanten Ionen-transport in Mitochondrien EMK., Kette (1) Komplexbildungskonstanten	[5] [5] [6] [11] [12]

[10] B bzw. C mit KSCN isoliert worden [11]. Die eingehende Charakterisierung dieser Produkte fehlt jedoch [11].

In der vorliegenden Mitteilung wird über den Komplex von Enniatin B mit Kaliumjodid, der im Hinblick auf die RÖNTGEN-Strukturanalyse hergestellt wurde, sowie über Eigenschaften anderer ähnlicher Addukte berichtet. Anhaltspunkte über die Spezifität von Antibiotica gegenüber Alkali-Ionen ergeben sich aus Potentialmessungen an elektrochemischen Zellen, in denen die zu untersuchenden Verbindungen als Film auf eine Silberplatte aufgebracht sind. So sind an der Messkette



für eine Reihe von Antibiotica und jeweils 0,1M Lösungen der betreffenden Kationen im Messgut (pH = 8,0) relativ zum Lithium-Ion die in Tab. 1 wiedergegebenen EMK.-Werte ermittelt worden [1]. Daraus sind die in Tab. 2 ersichtlichen Selektivitätsreihenfolgen ableitbar, die einerseits mit an Lebermitochondrien [5] [12] und Lipidmembranen [6] ermittelten Grössen und andererseits mit Komplexbildungskonstanten [8] [11] (Tab. 3) gut übereinstimmen.

Die neu mit Hilfe von ionenspezifischen Glaselektroden [13] [14] bestimmten Komplexbildungskonstanten stehen mit den früher dampfdruckosmometrisch erfassten Grössen [8] in befriedigendem Einklang, weichen jedoch zum Teil deutlich von den in einem anderen Lösungsmittel ermittelten Werten ab [11] (Tab. 3).

Aus diesen Daten ergibt sich eine auffallende Parallelität zwischen den Komplexbildungskonstanten der betreffenden Antibiotica mit Kalium-Ionen einerseits und ihrer biologischen Wirksamkeit [11] [15] andererseits (vgl. jedoch [11]). Zweifellos kommt dieser Komplexbildung wesentliche Bedeutung beim Ionentransport zu [1] [6] [8] [9] [11].

In Analogie zu den kristallinen Komplexen von Makrotetroliden mit Alkali-Ionen [8] [9] lassen sich 1:1-Addukte von Enniatinen⁴⁾ mit Kaliumjodid, Kaliumrhodanid,

Tabelle 3. *Komplexbildungskonstanten K*

Antibioticum	Lit.	Lösungsmittel	Anion	K in l/Mol für die Kationen:			
				Na ⁺	K ⁺	Rb ⁺	Cs ⁺
Nonactin	[8] *)	MeOH	SCN ⁻	$(1,6 \pm 0,3) \cdot 10^2$	$(6,3 \pm 0,9) \cdot 10^3$		
		MeOH	SCN ⁻		$(3,9 \pm 0,7) \cdot 10^3$		
Monactin	[8]	MeOH	SCN ⁻	$(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$(3,2 \pm 1,3) \cdot 10^5$		
Enniatin B	[11] *)	EtOH	SCN ⁻	$1,3 \cdot 10^3$	$3,7 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^3$
		MeOH	J ⁻	$(2,4 \pm 0,5) \cdot 10^2$	$(8,4 \pm 1,0) \cdot 10^2$		
«Enniatin A» ³⁾ *)		MeOH	J ⁻		$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^3$		
Valinomycin	[11] *)	EtOH	SCN ⁻	$0 \cdot 10^3$	$5,2 \cdot 10^3$		
		MeOH	J ⁻	$(1,2 \pm 1,7) \cdot 10^1$	$> 8 \cdot 10^3$		

*) Eigene Werte, vgl. «Experimentelles». Die angegebenen Fehlergrenzen sind Standardabweichungen. Die Werte für Nonactin und Monactin [8] wurden auf die Dimension l/Mol umgerechnet.

⁴⁾ Über kristalline Komplexe von Valinomycin mit Alkali-Ionen wird demnächst berichtet [16].

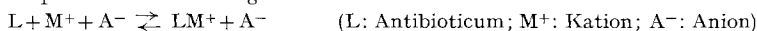
Kaliumbromid und Natriumrhodanid isolieren (vgl. auch [11]), die durchwegs um 100° oder mehr höher als die entsprechenden Enniatine schmelzen. Es ergeben sich auch deutliche Unterschiede in der IR.-Absorption (Tab. 4).

Tabelle 4. IR.-Absorptionen der Enniatine und Enniatinkomplexe in Nujol

Substanz	$\tilde{\nu}_{\text{SCN}}$ [cm ⁻¹]	$\tilde{\nu}_{\text{C=O, Ester}}$ [cm ⁻¹]	$\tilde{\nu}_{\text{Amid}}$ [cm ⁻¹]	$\tilde{\nu}_{\text{C-O, Ester}}$ [cm ⁻¹]
«Enniatin A»		1730	1665	1175
«Enniatin A» · KBr		1720	1645	1200
Enniatin B		1738 auch 1728, 1758	1670/1644	1184
Enniatin B · KJ		1725	1650	1205
KSCN	2035/2050 sehr breit			
Enniatin B · KSCN	2058 scharf	1725	1662	1205
NaSCN	2063/2080 sehr breit			
Enniatin B · NaSCN	2051/2060 scharf	1748	1660	1188

Experimentelles. – Die IR.-Absorptionsspektren wurden mit einem PERKIN-ELMER-Spektrophotometer Modell 125 aufgenommen.

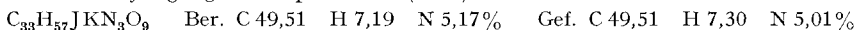
Die Komplexbildungskonstanten wurden im wesentlichen nach veröffentlichtem Verfahren [14] bei 20°C entsprechend dem Gleichgewicht



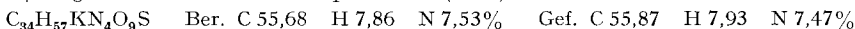
an methanolischen Lösungen (10⁻³ M an MA und 0 bis 10⁻³ M an L) unter der Annahme ermittelt, dass alle Aktivitätskoeffizienten $f_L = f_{M^{+}} = f_{LM^{+}} = 1$ sind. Verwendet wurden Glaselektroden PHILIPS, Typ G15-K (Kalium) [13] und Typ G15-Na (Natrium) [13], mit Referenzelektroden PHILIPS Typ R44 gefüllt mit 0,1 M NH₄Cl.

Die Potentialmessungen erfolgten mit Hilfe eines integrierenden Digitalvoltmeters (Modell DY-2401C der HEWLETT-PACKARD Co., Palo Alto, Calif., USA). Als Impedanzwandler am Eingang des Digitalvoltmeters diente ein Gleichstrom-Messverstärker Typ 71 S der Firma KNICK, Berlin 37, Deutschland. Einzelheiten über den Aufbau der Kette (1) werden anderweitig veröffentlicht [16]. Das Messgut (Kette (1)) wurde mit Hilfe von Essigsäure (ca. 0,5 M) und Triäthanolamin (ca. 1,0 M) auf pH 8 gepuffert.

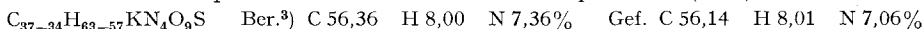
Enniatin B-Kaliumjodid: 250 mg Enniatin B und eine stöchiometrische Menge Kaliumjodid (64,9 mg) wurden getrennt in je ca. 10 ml Aceton unter leichtem Erwärmen klar gelöst und die Enniatinlösung langsam zur Kaliumjodidlösung getropft. Der Komplex, der sofort sehr fein kristallin auszufallen begann, wurde nach einigen Stunden abfiltriert: jeweils 250 bis 280 mg (80–89% d. Th.). Dieses Rohprodukt wurde in möglichst wenig kaltem Methanol klar gelöst und durch Verdunstenlassen des Lösungsmittels in 2–3 Tagen kristallisiert. Diese Kristalle waren für die RÖNTGEN-Strukturanalyse geeignet. Smp. ca. 298° (Zers.).



Enniatin B-Kaliumrhodanid wurde analog dem Kaliumjodid-Komplex hergestellt und aus Aceton/Essigester umkristallisiert. Smp. ca. 288° (Zers.).



«*Enniatin A*»-Kaliumrhodanid³⁾ wurde wie Enniatin B-Kaliumrhodanid hergestellt, jedoch kristallisierte der Komplex erst durch Abkühlen auf 0°. Smp. ca. 265° (Zers.).



Die Komplexe «*Enniatin A*»-Kaliumbromid und *Enniatin B*-Natriumrhodanid konnten nicht analysenrein gewonnen werden. Die spektroskopischen Daten (s. Tabelle 4) zeigen jedoch die Komplexbildung eindeutig an, und die Smp. («*Enniatin A*»-Kaliumbromid: ca. 215° (Zers.); *Enniatin B*-Natriumrhodanid: ca. 270°) liegen je um 100° höher als jene der Enniatine selbst.

Die Elementaranalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium der ETH (Leitung: W. MANSER) mit Hilfe eines PERKIN-ELMER Modell 240 ELEMENTAL ANALYZER ausgeführt.

Die vorliegende Arbeit ist durch den SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG (Projekt 4312) unterstützt worden. – Herrn PD Dr. W. KELLER-SCHIERLEIN danken wir für die Überlassung der Antibiotica und für zahlreiche anregende Diskussionen.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Z. ŠTEFANAC & W. SIMON, *Chimia* 20, 436 (1966); *Microchem. J.* 12, 125 (1967).
- [2] R. E. DOHNER, A. H. WACHTER & W. SIMON, *Helv.* 50, 2193 (1967).
- [3] H. GERLACH & V. PRELOG, *Liebigs Ann. Chem.* 669, 121 (1963); J. BECK, H. GERLACH, V. PRELOG & W. VOSER, *Helv.* 45, 621 (1962); W. KELLER-SCHIERLEIN & H. GERLACH, *Fortschritte Chem. org. Naturstoffe 1968*, im Druck.
- [4] B. C. PRESSMAN, *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 53, 1076 (1965); S. N. GRAVEN, H. A. LARDY & A. RUTTER, *Biochemistry* 5, 1735 (1966); B. C. PRESSMAN & E. J. HARRIS, 7th International Congress of Biochemistry, Tokyo, August 19–25, 1967.
- [5] S. N. GRAVEN, H. A. LARDY, D. JOHNSON & A. RUTTER, *Biochemistry* 5, 1729 (1966).
- [6] P. MUELLER & O. RUDIN, *Biochem. biophys. Res. Comm.* 26, 398 (1967).
- [7] B. C. PRESSMAN, E. J. HARRIS, W. S. JAGGER & J. H. JOHNSON, *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 58, 1949 (1967).
- [8] L. A. R. PIODA, H. A. WACHTER, R. E. DOHNER & W. SIMON, *Helv.* 50, 1373 (1967).
- [9] B. T. KILBOURN, J. D. DUNITZ, L. A. R. PIODA & W. SIMON, *J. Mol. Biol.* 30, 559 (1967).
- [10] P. A. PLATTNER, K. VOGLER, R. O. STUDER, P. QUITT & W. KELLER, *Helv.* 46, 927 (1963); P. QUITT, R. O. STUDER & K. VOGLER, *Helv.* 46, 1715 (1963); 47, 166 (1964).
- [11] M. M. SHEMYAKIN, YU. A. OVCHINNIKOV, V. T. IVANOV, V. K. ANTONOV, A. M. SHKROB, I. I. MIKHALEVA, A. V. EVSTRATOV & G. G. MALENKOV, *Biochem. biophys. Res. Comm.* 29, 834 (1967).
- [12] C. MOORE & B. C. PRESSMAN, *Biochem. biophys. Res. Comm.* 15, 562 (1964); M. HÖFER & B. C. PRESSMAN, *Biochemistry* 5, 3919 (1966); R. S. COCKRELL, E. J. HARRIS, B. C. PRESSMAN, *ibid.* 5, 2326 (1966).
- [13] Z. ŠTEFANAC & W. SIMON, *Analyt. Letters* 1 (2), 1 (1967); *Helv.* 51, 74 (1968).
- [14] G. A. RECHNITZ & S. B. ZAMOCHNICK, *Talanta* 11, 1061 (1964).
- [15] M. M. SHEMYAKIN, *Antimicrobial Agents Chemotherapy 1965*, 962.
- [16] LAVINIA A. R. PIODA, H.-K. WIPF & W. SIMON, *Chimia* 22 (1968), in Vorbereitung.

46. Stereochemie der Umwandlung von Dihydrothebain in Thebain Synthese von markierten Thebainen

von U. Eppenberger¹⁾, M. E. Warren²⁾ und H. Rapoport

Department of Chemistry und Lawrence Radiation
Laboratory der Universität von Kalifornien, Berkeley

(20. XII. 67)

Summary. The complete stereochemistry of the Δ^6 -dihydrothebaine \rightarrow 7-bromodihydrocodeinone dimethyl ketal \rightarrow codeinone dimethyl ketal \rightarrow thebaine sequence of transformations has been elucidated by NMR studies of the isotopically labeled compounds prepared using diimide- d_2 , methyl hypobromite- ^{14}C , and methyl hypobromite- d_3 . Final elimination of methanol from codeinone dimethyl ketal proceeds in a stereospecific manner: *cis* under acid catalysis with $POCl_3$, and *trans* under alkaline catalysis with EtO^- . As a result of these reactions, variously isotopically labeled thebaines can be prepared.

¹⁾ Gegenwärtige Adresse: CNRS, Centre de Recherches Nucléaires, Strasbourg-Cronenburg, Dépt. des Applications Biologiques, France.

²⁾ U.S. Public Health Service Postdoctoral Fellow.