

EINKRISTALLDARSTELLUNG UND KRISTALLDATEN

VON ANTAMANID

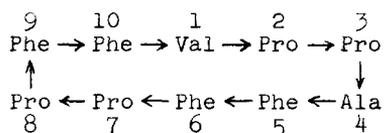
W. Littke

Chemisches Laboratorium der Universität

Freiburg/Brsg.

(Received in Germany 16 September 1971; received in UK for publication 6 October 1971)

Antamanid (1-6) ist ein im grünen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) vorkommendes cyclisches Decapeptid folgender Struktur (1)



Die Substanz hebt bei Knollenblätterpilzvergiftungen im Falle rechtzeitiger Applikation die Wirkung der tödlich giftigen Amatoxine (7) und Phallotoxine (7) auf. Diese bedeutenden pharmakologischen Eigenschaften erfordern genaue Kenntnisse der Antamanid-Konformation, um Aussagen über biochemische Wirkungsmechanismen der Verbindung machen zu können. Es schien uns deshalb lohnenswert, mit der Kristallstrukturanalyse zu beginnen.

Röntgenographische Strukturuntersuchungen können bekanntlich nur an ausreichend großen und ihrer Form nach geeigneten Einkristallen ausgeführt werden. Diese Voraussetzung führt bei organischen Substanzen mit Molekulargewichten über 1000, insbesondere bei Peptiden und Proteinen, zu schwierigen, oft nicht zu bewältigenden Problemen. Zur Darstellung brauchbarer Einkristalle wurde eine mit Antamanid ziemlich gesättigte Acetonlösung mit Wasser im Volumenverhältnis 1:5 gemischt, wenige Tropfen Äthanol zugesetzt, die Lösung in einem Wasserbad etwa 30 Sekunden lang auf ca. 90° C erwärmt und die klare Flüssigkeit erschütterungsfrei aufbewahrt und langsam abgekühlt. Im Verschluss des Gefäßes befand sich eine etwa 1 mm große Öffnung, um einen Teil des Lösungsmittels langsam verdunsten zu lassen. Nach etwa 3 Wochen kristallisierten farblose, zum Teil 8 mm lange Blättchen aus. Die Einkristalle konnten wegen ihrer relativ gedrungeneren Dimension (2 x 1 x 0.5 mm) im weiteren Verlauf der Untersuchungen mechanisch

recht ordentlich gehandhabt werden. Vermeidet man den erwähnten Zusatz einer Spur Äthanol, dann fallen lange, aber äußerst dünne Kristallnadeln an, die büschelartig wachsen und wegen ihrer sehr geringen mechanischen Stabilität ungeeignet sind. Antamanid-Einkristalle können prinzipiell auch aus einigen rein organischen Lösungsmitteln gezüchtet werden; oben genanntes Lösungsmittelgemisch mit Wasser als Hauptkomponente entspricht jedoch den physiologischen Bedingungen der stark wasserhaltigen Pilze am ehesten. In reinem Wasser ist Antamanid praktisch unlöslich.

Bringt man einige der blättchenförmigen Einkristalle an die Luft, dann verwitern sie in kürzester Zeit. Von Wasser werden sie nur gering benetzt und schwimmen auf der Wasseroberfläche, obgleich sie spezifisch schwerer sind ($\rho_{20^{\circ}\text{C}} = 1.20 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$). Beim intensiven Eintauchen sinken sie dagegen ab und spalten nach einiger Zeit besenförmig auf. Parallel zur Blättchenebene lassen sich die Kristalle besonders leicht spalten. Dies deutet auf nur geringe intermolekulare Bindungskräfte senkrecht zur Blättchenebene. Ebenfalls senkrecht zur Blättchenebene liegt eine kristallographische Achse, später als [001]-Achse identifiziert. Im Polarisationsmikroskop zeigten die Kristalle in dieser Richtung gerade Auslöschung. Andere Blickrichtungen konnten nicht gewählt werden.

Zur röntgenographischen Untersuchung wurde ein kleines geeignetes Kristallblättchen in ein Quarzkapillarröhrchen (1 mm Durchmesser, 0.01 mm Wandstärke) überführt, die beiden Rohrenden ganz in der Nähe des Kriställchens mit etwas Mutterlauge gefüllt und mit Paraffin nach außen hin abgedichtet, so daß sich der Kristall mit seiner Mutterlauge indirekt in dauernder Gleichgewicht befand. Nach Orientierung des Einkristalls parallel zur längsten Blättchenachse, die sich später als [010]-Achse erwies, wurden BUERGER - Präzessionsaufnahmen (Cu K_{α} -Strahlung) der Reflexe hkl für $h = 0$ bis einschließlich 3 und hkl für $l = 0$ bis einschließlich 3 angefertigt. Aus der Metrik und der Symmetrie der Reflexintensitäten folgt, daß das Kristallsystem rhombisch, Lauegruppe 222 ist. Die Elementarkonstanten der primitiven, nach DELAUNAY aufgestellten Zelle betragen:

$$a = 13.65 \pm 0.01 \text{ \AA}, \quad b = 15.95 \pm 0.01 \text{ \AA}, \quad c = 34.72 \pm 0.02 \text{ \AA}, \quad V = 7559 \text{ \AA}^3.$$

Auf den Diagrammen waren Reflexe

$$\begin{aligned} & \text{hkl, Okl, h0l und hk0 ohne gesetzmäßige Auslöschung sowie} \\ & \text{h00 nur mit } n = 2n, \text{ Ok0 nur mit } k = 2n \text{ und } 00l \text{ nur mit } l = 2n \end{aligned}$$

vorhanden. Hieraus folgt eindeutig die Raumgruppe $P 2_1 2_1 2_1$ mit allgemeiner vierzahliger Punktlage. Die hohe optische Aktivität (2) von Antamanid läßt sich mit dieser azentrischen Raumgruppe in guten Einklang bringen.

Aus WEISSENBERG - Aufnahmen bis zur vierten Schichtlinie sowie aus Drenkristallaufnahmen (Cu K_α -Strahlung und Drenachse [010]) konnten sämtliche Befunde bestätigt werden.

Zur Dichtebestimmung wurden einige Kristalle in ein Wasser - Acetongemisch (Mischungsverhältnis 10:1) gegeben und so lange eine mit CsJ gesättigte Wasser - Acetonlösung (Mischungsverhältnis ebenfalls 10:1) zugetropft, bis die Kristalle in der Flüssigkeit schwebten. Die Dichte der Flüssigkeit und somit indirekt die Dichte der Antamanid-Kristalle wurde mit Hilfe einer von Kratky (8) angegebenen Methode sehr genau bestimmt. Sie beträgt bei 20° C $1.20 \pm 0.01 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Um eventuelle Artefakte durch die Anwesenheit von Caesium- und Jodidionen auszuschließen, wurde in einer zweiten Serie Rohrzucker anstelle von Caesiumjodid verwendet; im übrigen wurden die angegebenen experimentellen Bedingungen beibehalten. Dies führte ebenfalls zu einem Kristalldichtewert von $1.20 \pm 0.01 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$.

Unter der Annahme, daß Antamanid "ca. 7 Moleküle Wasser hartnäckig festhält" (4), läßt sich aus dem Molekulargewicht (Antamanid + 7 H_2O $M = 1273.5$), dem Volumen der Elementarzelle ($V = 7559 \text{ \AA}^3$) und der experimentell bestimmten Dichte ($\rho = 1.20 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) die Zahl der Formeleinheiten pro Zelle festlegen: der berechnete Wert beträgt $n = 4,29$, der theoretische somit $n = 4$. Dies stimmt mit der vierzähligen Punktlage der Raumgruppe $P 2_1 2_1 2_1$ vorzüglich überein. Umgekehrt kann jetzt aus dem Zellvolumen, der Dichte sowie vier Formeleinheiten der Zelle ein Molekulargewicht von 1366.1 berechnet werden. Dies entspricht der Zusammensetzung Antamanid + 12 H_2O ($M = 1363.6$). In der Elementarzelle befinden sich demnach 4 Moleküle Antamanid und 48 Moleküle Wasser.

Als Ausgangssubstanz für die Versuche diente Antamanid-Dihydrat. Prof. Th. Wieland, Heidelberg sowie Prof. H. Ruschig und Dr. W. König von den Farbwerken Hoechst lieferten, durch freundliche Vermittlung von Prof. K. Wallenfels, Freiburg, insgesamt 35 mg der Verbindung. Den genannten Herren bin ich zu Dank verpflichtet.

Literatur

- (1) Th. Wieland, G. Lüben, H. Ottenheim, J. Faesel, J.X. de Vries, W. Konz, A. Prox und J. Schmid, Angew. Chem. 80, 209 (1968)
- (2) Th. Wieland, G. Lüben, H. Ottenheim und H. Schiefer, Liebigs Ann. Chem. 722, 173 (1969)
- (3) A. Prox, J. Schmid und H. Ottenheim, Liebigs Ann. Chem. 722, 179 (1969)
- (4) Th. Wieland, J. Faesel und W. Konz, Liebigs Ann. Chem. 722, 197 (1969)
- (5) W. König und R. Geiger, Liebigs Ann. Chem. 727, 125 (1969)
- (6) V.T. Ivanov, A.I. Miroshnikov, N.D. Abdullaev, L.B. Senyavina, S.F. Arknipova, N.N. Uvarova, K.Kn. Khalilulina, V.F. Bystrov und Yu.A.

- Ovchinnikov, Biochem. Biophys. Res. Comm. 42, 654 (1971)
- (7) Th. Wieland, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe [Wien] 25, 214 (1967)
- (8) H. Stabinger, H. Leopold und O. Kratky, Graz: Digitale Präzisions-Dichtemeßeinrichtung für Flüssigkeiten und Gase.