

Doppelbrechungsstudien zur molekularen Erkennung bei der Kristallisation langketiger Diacylperoxide**

Von J. Michael McBride* und Steven B. Bertman

Viele neuere Arbeiten über molekulare Erkennung sind durch das Studium biologischer Prozesse wie Enzymkatalyse und Antigen-Antikörper-Bindung angeregt worden. Auch wenn im Vergleich zur Beschäftigung mit der biologischen Spezifität die mit einer alten Routinemethode wie der Reinigung durch Umkristallisation auf den ersten Blick einem anderen Zeitalter anzugehören scheint, so ist das ausgezeichnete Unterscheidungsvermögen, mit dem wachsende Kristalle Moleküle ihrer eigenen Art aus einer verunreinigten Lösung selektieren, dennoch nicht weniger eindrucksvoll. Ähnlich wie aktive Zentren von Enzymen akzeptieren die Wachstumszentren von Kristallen manchmal auch „Ersatzmoleküle“ anstelle des eigentlichen Substrats. Durch den Einbau solcher Ersatzmoleküle kann das Wachstumszentrum desaktiviert werden oder eine feste Lösung entstehen; auch können beide Phänomene gleichzeitig auftreten^[1]. Von derartigen Substitutionsstudien erhofft man sich grundlegende Erkenntnisse über nichtkovalente Wechselwirkungen, die Struktur des Wachstumszentrums sowie den Mechanismus des Kristallwachstums.

Lahav, Leiserowitz et al. haben gezeigt, daß ein Kristall eine strukturell ähnliche Verunreinigung in unterschiedlichem Maße an Gitterstellen einbaut, die symmetrieverknüpft sind^[2]. Diese Unterscheidung beruht darauf, daß viele Aspekte der Kristallstruktur durch die Wachstumskinetik und nicht durch die Thermodynamik bestimmt werden und das Wachstum an der Kristalloberfläche stattfindet, wo die Symmetrie niedriger ist als im Kristallinneren. Wachstumszentren auf verschiedenen Kristallflächen müssen sich zumindest in ihrer Orientierung unterscheiden. Vaida et al. haben einen verunreinigten Einkristall in Segmente unterteilt, von denen jedes durch Wachstum an einer anderen Kristallfläche entstanden war^[2]. Röntgenbeugungsexperimente ergaben, daß jedes dieser Segmente eine charakteristische Verteilung der Verunreinigungsmoleküle enthielt, welche die lokale Symmetrie der reinen Wirtverbindung herabsetzte.

Bei der Anwendung dieser Röntgenbeugungsexperimente auf Fettsäure-Diacylperoxide fanden wir ein sichtbares Phänomen, mit dem man halbquantitative Aussagen über diese Art der molekularen Erkennung erhalten kann und das die Röntgenbeugungsanalyse vereinfacht. Das Phänomen wird polarisationsmikroskopisch beobachtet; bei dieser lange bekannten Technik betrachtet man den Kristall und eine doppelbrechende Platte zwischen gekreuzten Polarisationsfiltern^[3].

Tritt Licht einer bestimmten Frequenz durch ein Medium, so hängen seine Geschwindigkeit und seine Wellenlänge vom Brechungsindex, das heißt von der elektrischen Polarisierbarkeit senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Lichts, ab. In den meisten Kristallen ist die elektrische Polarisierbarkeit richtungsabhängig, so daß die Wellenlängen für Licht unterschiedlicher optischer Polarisation verschieden sind. Tritt in solche Kristalle ein Lichtstrahl ein, dessen Polarisationsebene die Richtung des maximalen und des minimalen Brechungsindexes gerade halbiert, so brei-

tet sich dieser Lichtstrahl in Form von zwei Wellen gleicher Amplitude, aber unterschiedlicher Wellenlänge auf. Wenn sich die Wellen beim Austritt aus dem Kristall wieder vereinigen, so beeinflußt ihre relative Phasenverschiebung die Polarisierung. Entspricht diese Phasenverschiebung einem ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge, so hat das austretende Licht dieselbe Polarisationsebene wie der eintretende Strahl und wird durch einen senkrecht dazu stehenden Analysator vollständig gelöscht. Bei anderen relativen Phasenverschiebungen werden unterschiedliche Mengen an Licht durchgelassen, und zwar am meisten bei einer Phasenverschiebung um eine halbe Wellenlänge. Somit hängt es von der Wellenlänge ab, wieviel Licht zum Betrachter gelangt.

In Kristallen bestimmter Dicke und Doppelbrechung führt die unterschiedliche Übertragung von Licht verschiedener Frequenz dazu, daß weißes Licht in Licht einer Farbe des Newtonschen Interferenzspektrums umgewandelt wird^[4]. Phasenverschiebungen (Kristalldicke multipliziert mit der Brechungsindexdifferenz) von 250–2000 nm ergeben charakteristische sichtbare Farben, wobei das Auge auf kleine Veränderungen besonders empfindlich im Bereich des „sensitiven Violetts“ (575 nm) reagiert. Phasenverschiebungen unter 250 nm ergeben undeutliche Grautöne. Solche Phasenverschiebungen können durch Einbringen eines doppelbrechenden „Violett“-Filters in den Strahlengang ausgeschaltet werden, das die kleinen Phasenverschiebungen des Kristalls in den blauen oder gelben Bereich verschiebt, in Abhängigkeit davon, ob der größere Brechungsindex des Kristalls parallel oder senkrecht zu dem des Filters verläuft. Auf diese Weise zeigt das Filter also auch die Richtungen maximaler und minimaler Polarisierbarkeit im Kristall an.

Um den Nutzen dieser Technik für Untersuchungen zur molekularen Erkennung zu verdeutlichen, beschreiben wir zwei Fälle, bei denen sich an den Enden einer symmetrischen langen Kette ein Bromatom und eine Methylgruppe befinden, die beide ähnlich groß sind^[5]. Wir haben Kristalle des reinen 11-Bromundecanoyl-lauroylperoxids

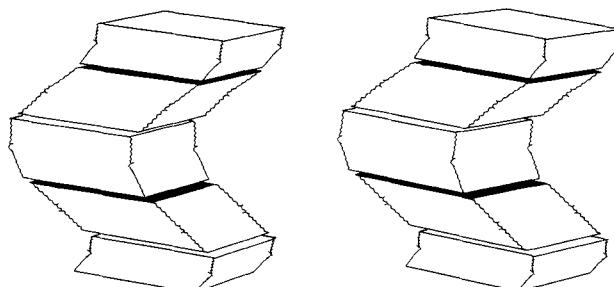


Abb. 1. Stereobild von fünf aufeinanderfolgenden Schichten des Br··Br-Kristalls. Jede Schicht ist als 10 × 10-Block aus parallelen Molekülen dargestellt, wobei die Eckmoleküle hervorgehoben sind. Die Kanten der Blöcke haben die Indices [100] und [010]. Folgendes ist zu beachten: die Neigung der Moleküle in Richtung der vertikalen vierzähligen Achse, [001]; die Drehung um 90° von Schicht zu Schicht; die Ausbuchungen und Vertiefungen in den Seitenflächen. Der Br··CH₃-Kristall hat die gleiche Struktur mit Ausnahme davon, daß sich in den geschwärzten Zonen Methylreste anstelle von Bromatomen gegenüberstehen.

[*] Prof. Dr. J. M. McBride, S. B. Bertman

Department of Chemistry, Yale University
Box 6666, New Haven, CT 06511-8118 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde durch das Office of Naval Research (N00014-87-K-0437) und den Petroleum Research Fund der American Chemical Society (15554-AC4,5) gefördert.

(Br··CH₃)^[6] untersucht sowie solche, in denen Br··CH₃ als 15proz. Verunreinigung in einem Wirkkristall von Bis(11-bromundecanoyl)peroxid (Br··Br)^[7] vorliegt.

Im Wirkkristall bilden parallel zueinander angeordnete Br··Br-Moleküle monomolekulare Schichten von 21 Å

Dicke, in denen die Bromatome auf den beiden Oberflächen angeordnet sind (Abb. 1)^[8]. Die Schichten sind so gestapelt, daß Bromatome an Bromatome stoßen, wobei jede Schicht in Stapelrichtung entlang einer vierzähligen Schraubenachse um 90° versetzt ist, so daß sich die Raumgruppe $P4_32_12$ ergibt^[8]. Reine $\text{Br}\cdot\cdot\text{CH}_3$ -Moleküle bilden isomorphe Kristalle aus monomolekularen Schichten, in denen die Bromatome die eine und die Methylgruppen die andere Oberfläche bilden. Dadurch wird die vierzählige Schraubenachse in eine zweizählige umgewandelt, und die Kristallsymmetrie verringert sich zur Raumgruppe $P2_12_12$ ^[9]. Die Schichten sind so gestapelt, daß abwechselnd Br/Br - und CH_3/CH_3 -Oberflächen aneinander grenzen, was man aus der Bedingung für $00l$ -Reflexionen ($l=2n$) ersehen kann. Die herabgesetzte Symmetrie veranschaulicht, daß der wachsende Kristall zwischen Brom- und Methylresten unterscheidet, läßt aber nicht erkennen, wie oft dabei Fehler gemacht werden. Leider ermöglichen die Röntgenbeugungsdaten der $\text{Br}\cdot\cdot\text{CH}_3$ -Kristalle nicht die Bestimmung der Gitterpositionen.

Eine Mikrophotographie mit gekreuzten Polarisationsfiltern (Abb. 2b) zeigt, daß der $\text{Br}\cdot\cdot\text{CH}_3$ -Kristall innerhalb der Schichtebene verschiedene Polarisierbarkeiten aufweist, wie man es für abwechselnde Grenzflächen von Bromatomen und Methylgruppen, aber nicht für eine Zufallsverteilung von Bromatomen und Methylgruppen erwartet^[10]. Weitaus interessanter ist Abbildung 2c unter Verwendung des Violett-Filters. Ein Ende des Kristalls erhöht die relative Phasenverschiebung des Filters in den blauen Bereich, während das andere Ende sie in den gelben Bereich herabsetzt. Daraus geht hervor, daß die Strukturen dieser beiden Domänen zueinander um 90° gedreht sind. Die beiden Domänen stoßen an einer scharfen, aber unregelmäßigen Grenze aneinander.

Wir glauben, daß an der Grenze zwischen den Domänen die übliche Molekülorientierung ($\text{Br}/\text{Br}, \text{CH}_3/\text{CH}_3$) umgekehrt ist. Da die langketten Moleküle schräg in den Schichten angeordnet sind, sollte eine einzelne Schicht keine Moleküle tolerieren, die zur Schichtnormalen um 90° gedreht sind. Dreht man die Säulen von $\text{Br}\cdot\cdot\text{CH}_3$ -Schichten (siehe Abb. 1) im Uhrzeigersinn um 90° um die Stapelachse, so würde man eine Säule erhalten, die auf der linken Rückseite zwischen der zweiten und dritten Schicht eine Ausbuchtung und zwischen der vierten und fünften Schicht eine Vertiefung hat. Diese gedrehte Säule paßt nicht mit der rechten Vorderseite der ursprünglichen Säule zusammen, die eine Vertiefung zwischen der dritten und vierten Schicht und Ausbuchtungen am oberen Ende der fünften sowie zwischen der ersten und zweiten Schicht aufweist. Damit Ausbuchtungen und Vertiefungen ineinander passen, muß die gedrehte Säule um eine Schicht angehoben werden, so daß sich an der Grenze Bromatome und Methylgruppen gegenüberstehen. Derselbe Effekt ließe sich durch Gegenüberstellung von Bromatomen und Methylgruppen innerhalb der ursprünglichen Säule erzielen, d.h. durch Umkehr jedes einzelnen Moleküls. Aus der Größe der Domänen ist ein hohes Maß an Orientierungskorrelation innerhalb der Schichten zu erkennen. Die scharfe Farbgrenze weist auf eine starke Korrelation zwischen den Schichten einer Domäne hin; unterschiedliche Grenzflächen in den verschiedenen Schichten sollten im Übergangsbereich zu einer Vielzahl von Farben führen.

Jede Kristalldomäne enthält einige kleine Inseln entgegengesetzter Orientierung (Abb. 2d). Einige dieser Inseln zeigen dieselbe blaue und gelbe Farbe wie die großen Domänen, andere ergeben dagegen keine Doppelbrechung, sondern erscheinen violett. Die violetten Inseln können entweder durch Zufallsverteilung entstehen oder durch

Überlagerung von Schichten gleicher Dicke, aber entgegengesetzter Orientierung. Folgendes Experiment zeigte, daß letzteres Phänomen in $\text{Br}\cdot\cdot\text{CH}_3$ -Kristallen auftreten kann: Mit Hilfe eines Klebestreifens wurde die obere der Kristallschichten abgehoben. Die darunterliegende Schicht zeigte eine einheitliche Doppelbrechung auch für die Bereiche, die zuvor violett erschienen. Es ist vermutlich kein Zufall, daß die beiden einander kompensierenden Schichten von gleicher Dicke sind, denn solche violett erscheinenden Bereiche sind in vielen Kristallen beobachtet worden. Wir nehmen an, daß Kristalle ausgehend von einer dünnen Platte mit gleicher Geschwindigkeit in entgegengesetzte Richtungen wachsen und daß in den violetten Regionen das Wachstum in eine Richtung mit invertierten Schichten erfolgt. An der Grenze zwischen den gelb und blau erscheinenden Domänen tritt eine sehr schmale violette Zone auf (siehe Abb. 2d), welche – ähnlich den violetten Inseln in Abbildung 2c – in Abbildung 2b dunkel erscheint.

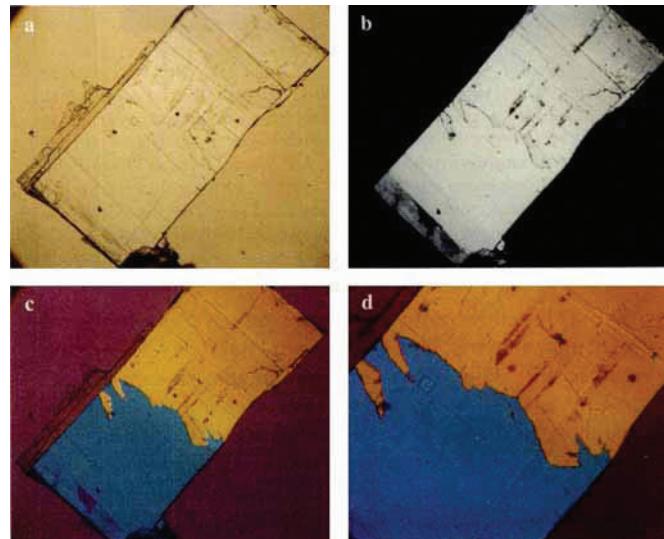


Abb. 2. Ansicht eines $\text{Br}\cdot\cdot\text{CH}_3$ -Kristalls (Größe $3.6 \times 1.6 \times \text{ca. } 0.04 \text{ mm}$) entlang der [001]-Achse senkrecht zu den Molekülschichten. Die Polarisationsmaxima, [100] und [010], verlaufen in einem 45°-Winkel zur Vertikalen. a) In unpolarisiertem Licht, b) zwischen gekreuzten Polarisationsfiltern in vertikaler und horizontaler Ausrichtung, c) zwischen gekreuzten Polarisationsfiltern mit Violett-Filter (Achse um 45° gegen den Uhrzeigersinn zur Vertikalen gedreht), d) zweifache Vergrößerung von c). Auffällig sind: spiralförmige Terrassen um die Mitte bei a), kleine blaue und gelbe Inseln bei d), violette Linien und Inseln bei c) und d), die bei b) schwarz erscheinen.

Da reines $\text{Br}\cdot\cdot\text{Br}$ mit einer vierzähligen Schraubenachse senkrecht zu den Schichten kristallisiert, zeigen diese Kristalle in alle Richtungen senkrecht zur vierzähligen Achse gleiche Polarisierbarkeit. Strahlt man in solche Kristalle Licht in Richtung der vierzähligen Achse ein, so tritt keine Doppelbrechung auf, d.h. die lineare Polarisierung des Lichts bleibt erhalten, und die Kristalle erscheinen zwischen gekreuzten Polarisationsfiltern dunkel^[11]. $\text{Br}\cdot\cdot\text{Br}$ -Kristalle, die 15% $\text{Br}\cdot\cdot\text{CH}_3$ enthalten, sind – wie Abbildung 3b zeigt – doppelbrechend. Bringt man das Violett-Filter in den Strahlengang, so ergeben sich vier durch die Diagonalen auf der quadratischen Platte getrennte Sektoren, die abwechselnd blau und gelb erscheinen (Abb. 3c). Dreht man das Filter (oder den Kristall) um 90°, so tauschen die Farben erwartungsgemäß aus. Daraus geht her-

vor, daß die aneinandergrenzenden Sektoren zueinander äquivalent sind, ihre Polarisierbarkeits-Tensoren aber zu einander um 90° gedreht sind.

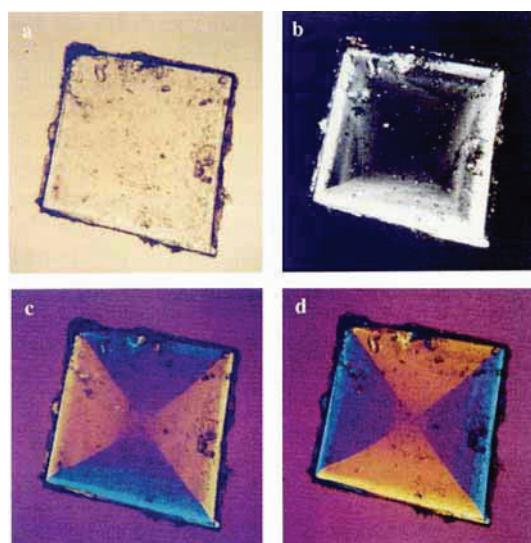


Abb. 3. Ansicht eines $\text{Br}\cdot\text{Br}$ -Kristalls mit 15% $\text{Br}\cdot\text{CH}_3$ (Größe $2.0 \times 2.0 \times 0.08$ mm) betrachtet entlang [001]. Der Kristall ist so ausgerichtet, daß zwischen den gekreuzten Polarisationsfiltern eine maximale Menge an Licht durchgelassen wird. Die Kristallkanten liegen in der Nähe von [100] und [010]. a)-c) entsprechen a)-c) in Abb. 2, d) wie c), aber das Violett-Filter um 45° im Uhrzeigersinn zur Vertikalen gedreht. Auffällig sind ein Anstieg der Doppelbrechung vom Mittelpunkt zum Rand (b-d), die leichten Wellenform der Sektorgrenzen (c, d) und der Farbwechsel zwischen c) und d).

Die Doppelbrechung in den einzelnen Sektoren wird durch unsymmetrischen Einbau von $\text{Br}\cdot\text{CH}_3$ -Molekülen verursacht^[12]. Die Wachstumszentren, die diesen selektiven Einbau bestimmen, sind – entsprechend den äußeren Kanten des Kristalls – von Sektor zu Sektor um jeweils 90° gedreht. *Die lokale Doppelbrechung eines Wirkstoffs, der eine geringe Menge einer Verunreinigung enthält, liefert somit einen permanenten optischen Nachweis für die Orientierung seiner Wachstumszentren*^[13]. Der $\text{Br}\cdot\text{Br}$ -Kristall von Abbildung 3 hat seinen Keimpunkt eindeutig an der Stelle, an der sich die Sektoren treffen, und der Kristall ist von dort in beide Richtungen entlang der *a*- und *b*-Achsen des tetragonalen Gitters gewachsen.

Wir haben viele Kristalle von X·Y-Verbindungen sowohl in reiner Form als auch in Form von Mischkristallen untersucht. Bei einigen Kombinationen ist die molekulare Erkennung, mit der während des Kristallwachstums X von Y unterschieden wird, sehr ausgeprägt, in anderen Fällen ist sie dagegen nur schwach. Die Doppelbrechungsmuster sind sehr unterschiedlich und liefern viele Informationen über das Wachstumsstadium des Kristalls. Für ein umfassendes Verständnis der Selektivität der Wachstumszentren sind gründliche Röntgenbeugungsexperimente wie die von Vaida et al.^[2] notwendig. Die optische Mikroskopie ist dagegen viel einfacher und empfindlicher zum Studium bestimmter Phänomene, z. B. der multiplen Keimbildung und der Keimbildung außerhalb des Zentrums, sowie für die Bestimmung der Wachstumsrichtung. Die optische Mikroskopie wird zur vergleichenden Betrachtung vieler verschiedener Kristalle, zur Katalogisierung ihres Wachstumsmusters und zur Identifizierung von Domänen, die für Röntgenbeugungsexperimente interessant sind, unerlässlich sein^[14].

Eingegangen am 10. Oktober 1988 [Z 2999]

- [1] L. Addadi, Z. Berkovitch-Yellin, I. Weissbuch, M. Lahav, L. Leiserowitz, *Topics in Stereochemistry* 16 (1986) 1.
- [2] M. Vaida, L. J. W. Shimon, Y. Weisinger-Lewin, F. Frolow, M. Lahav, L. Leiserowitz, R. K. McMullan, *Science (Washington)* 241 (1988) 1475.
- [3] Für eine genauere Beschreibung siehe: N. H. Hartshorne, A. Stuart, *Crystals and the Polarizing Microscope*, Arnold, London 1970, S. 274–298.
- [4] I. Newton: *Opticks*, Dover, New York 1979, S. 233.
- [5] Die Brom- und die Methylgruppe haben effektive van-der-Waals-Radien von 1.9 bzw. 2.0 Å.
- [6] Das Symbol $\cdot\cdot$ steht für $-(\text{CH}_2)_{10}(\text{CO})\text{O}-\text{O}(\text{CO})(\text{CH}_2)_{10}\cdot\cdot$.
- [7] Die Züchtung der Kristalle erfolgt durch Lösen der Substanzen in einer minimalen Menge an Dichlormethan, Zugabe einer größeren Menge an Hexan/Essigester (2:1) und langsames Verdampfen des Lösungsmittels aus Flaschen, die mit durchbohrten Polyethylenstopfen verschlossen waren. Bei den Mischkristallen zeigten NMR-Spektren von Lösungen einzelner Einkristalle in CDCl_3 , daß die Zusammensetzung der Kristalle näherungsweise der der Lösung entsprach, aus der sie kristallisiert wurden. Wir danken Prof. J. Longi vom Institut für Geologie und Geophysik der Yale Universität dafür, daß wir sein Polarisationsmikroskop verwenden durften.
- [8] J. M. McBride, S. B. Bertman, D. Z. Cioffi, B. E. Segmuller, B. A. Weber, *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Nonlinear Opt.* 161 (1988) 1.
- [9] Für $\text{Br}\cdot\cdot\text{CH}_3$ gilt: $a = 5.445(7)$, $b = 5.456(7)$, $c = 85.6(2)$ bei 25°C ; für $\text{Br}\cdot\cdot\text{Br}$ gilt: $a = b = 5.441(1)$, $c = 85.51(4)$ bei 25°C .
- [10] Die Größe der Doppelbrechung ist geringer als man für eine perfekt angeordnete alternierende Struktur erwarten sollte. Diese Abweichung wird derzeit mit optischen und Röntgenbeugungsmethoden untersucht.
- [11] Die Polarisationsebene wird in dünnen Kristallen um weniger als 1° gedreht [8].
- [12] Diese Schlussfolgerung konnte inzwischen durch Röntgenbeugung bestätigt werden. Ein zusätzlicher Hinweis auf Asymmetrie ergibt sich aus der Richtung der Polarisierbarkeitsmaxima in Abb. 3. Diese liegen nicht entlang der Zellachsen, die ihrerseits parallel zu den Kristallkanten verlaufen.
- [13] Dieses Phänomen ist kürzlich an Granaten und anderen Mineralien beobachtet worden: F. Allen, P. R. Busek, *Am. Mineral.* 73 (1988) 568. Wir danken Dr. Allen für einen Vorabdruck dieser Veröffentlichung sowie für anregende Diskussionen.
- [14] Zur vollständigen Charakterisierung richtungsabhängiger Unterschiede sind selbstverständlich Beugungsexperimente erforderlich, aber durch die Genauigkeit, mit der sich die Polarisierbarkeit eines Kristalls durch Addition der Bindungspolarisierbarkeiten voraussagen läßt, wird die Messung von Phasenverschiebungen auch quantitativ wertvoll (siehe [3], S. 152–157).

Totalsynthese des Antitumor-Antibioticums WF-3161**

Von Ulrich Schmidt*, Ulrich Beutler und Albrecht Lieberknecht

Über die Isolierung, biologische Aktivität und Strukturaufklärung von WF-3161 1 wurde 1983 berichtet^[1]. Die Konfiguration der Aminosäuren und die Konformation des Cyclopeptids in Lösung haben Rich et al. bestimmt^[2]. Der Wirkstoff 1 gehört zur Gruppe der biologisch hoch aktiven Cyclotetrapeptide Chlamydocin^[3] 2, HC-Toxine I^[4] 3, II^[5] 4, III^[6] 5, Cyl-1^[7] 6 und Cyl-2^[8] 7, die als charakteristischen Baustein (2S,9S)-2-Amino-9,10-epoxy-8-oxodecansäure (Aoe) und eine (*R*)-Aminosäure enthalten. 3–7 sind Phytotoxine, 1 und 2 gehören zu den in vitro stärksten Cytostatica, wobei WF-3161 1 die biologisch aktiveren Verbindungen ist. Seine hohe cancerostatische Aktivität und die Schwierigkeit des Aufbaus der (*S*)-Pip-(*S,S*)-Aoe-Sequenz haben uns zur Synthese stimuliert (Pip = Pipеридин-2-carbonsäure).

[*] Prof. Dr. U. Schmidt, Dipl.-Chem. U. Beutler, Dr. A. Lieberknecht
Institut für Organische Chemie,
Biochemie und Isotopenforschung der Universität
Pfaffenwaldring 55, D-7000 Stuttgart 80

[**] Über Aminosäuren und Peptide, 69. Mitteilung; Cyclopeptide, 16. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der BASF AG, vom Fonds der Chemischen Industrie und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. – 68. und 15. Mitteilung: U. Schmidt, M. Kröner, H. Griesser, *Tetrahedron Lett.* 29 (1988) 4407.