

Die Ausfällung der Asparaginase aus wäßrigen Lösungen bei niedriger Salzkonzentration mit Polyäthylenglykol ist weitgehend pH-unabhängig. Eine Verfeinerung der Fraktionierung gelingt durch Harnstoffzusatz (3 mol/l) und durch Fällung in der Nähe des isoelektrischen Punktes (I.P.) bei pH \approx 5 (s. Tabelle 1).

Asparaginase-Präparate ab 180 Einh./mg sind durch vorsichtiges Ausfällen am I.P. mit Polyäthylenglykol-Lösung kristallin erhältlich. Die Züchtung gut ausgebildeter Kristalle (Nadeln) gelingt besonders leicht durch Fällung mit einer Mischung aus 50 g Polyäthylenglykol (mittleres Molekulargewicht 6000), 25 ml Wasser und 25 ml Methanol. Die so erhaltene kristalline L-Asparaginase hat eine spezifische Aktivität von 280 Einh./mg Protein^[4], die sich durch weiteres Umkristallisieren nicht erhöhen läßt.

Die L-Asparaginase aus Stamm 9637 und Stamm 11303 unterscheiden sich in ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit. Durch geringfügige Änderung der Fraktionierungsgrenzen (s. Tabelle 1) ist auch aus Stamm ATCC 11303 kristalline L-Asparaginase (Asparaginase B) zugänglich. Unser Verfahren^[5] liefert die gleichen L-Asparaginase wie die säulenchromatographische Aufarbeitung der Roh-asparaginase aus den beiden Bakterien-Stämmen.

Eingegangen am 15. September 1969 [Z 94]

[*] Dr. O. Wagner, Dr. K. Bauer, Dr. E. Irion, Dr. E. Rauenbusch, Dr. W. Kaufmann und Dr. A. Arens Biochemisches Laboratorium der Farbenfabriken Bayer AG 56 Wuppertal-Elberfeld, Friedrich-Ebert-Straße 217

[1] H. A. Campbell, L. T. Mashburn, E. A. Boyse u. L. I. Old, Biochemistry 6, 721 (1967).

[2] K. Bauer, A. Arens, E. Rauenbusch, E. Irion, O. Wagner, W. Kaufmann, W. Scholtan u. S. Y. Lie, Abstracts 6. FEBS Meeting, Madrid 1969, Nr. 246; A. Arens, E. Rauenbusch, E. Irion, O. Wagner, K. Bauer u. W. Kaufmann, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., im Druck.

[3] Polyäthylenglykol wurde erstmals zur Plasmafraktionierung verwendet: P.-A. Albertsson: Partition of Cell Particles and Macromolecules. Wiley, New York 1960, S. 155; A. Polson, G. M. Potgieter, I. F. Largier, G. E. F. Mears u. F. I. Joubert, Biochim. biophysica Acta 82, 463 (1964).

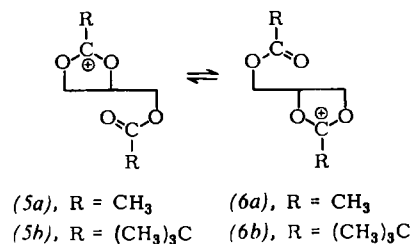
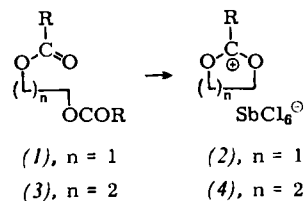
[4] K. Bauer, Med. Klinik 64, 9 (1969).

[5] O. Wagner, K. Bauer, W. Kaufmann, E. Rauenbusch, A. Arens u. E. Irion, Dtsch. Pat.-Anm. Nr. P 1642615.6 (1967), Farbenfabriken Bayer AG.

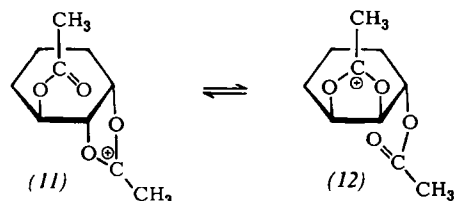
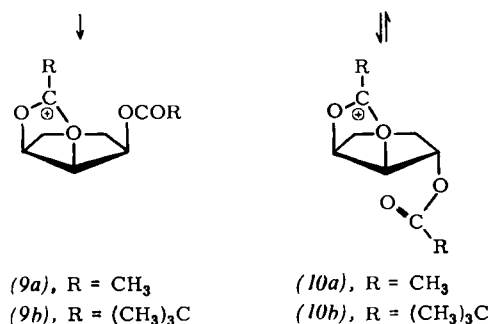
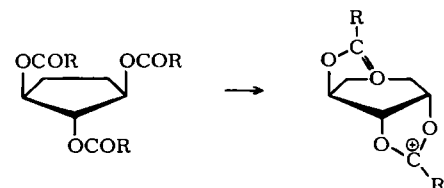
Valenzisomerie bei Acyloxonium-Kationen von 1,2,3-Triolen. Einfache Darstellung von Acyloxonium-Salzen^[1]

Von H. Paulsen und H. Behre^[*]

Eine einfache, allgemein anwendbare Darstellungsmethode für Acyloxonium-Salze^[2,3] vom Typ (2) und (4) fanden wir in der Umsetzung von 1,2- oder 1,3-Diolesteren (1) bzw. (3) mit SbCl₅ in CH₂Cl₂. Die Reaktion verläuft eindeutig unter Nachbargruppenbeteiligung und Abspaltung eines Carboxylations, denn von Diestern cyclischer Diöle reagiert nur die *trans*-Form; so erhielten wir Acetoxonium-Salze aus den Essigsäureestern von *trans*-1,2-Cyclopentandiol (56%); *trans*-1,2-Cyclohexandiol (25%); *trans*-1,3-Cyclopentandiol (40%); *trans*-1,3-Cyclohexandiol (59%). Je nach Nachbargruppenaktivität und Stereochemie der Verbindung kristallisieren die Salze in wenigen min bei Raumtemperatur oder nach bis zu 48 Std. Erhitzen bei 40°C aus. Aus (1) bzw. (3) werden (geordnet nach abnehmender Reaktivität) erhalten an (2): R = CH₃ (55%, 5 min bei 20°C), C₂H₅ (56%, 5 min bei 20°C), tert.-Butyl (60%, 5 min bei 20°C), C₆H₅ (65%, 1 Std. bei 20°C), *p*-C₆H₄CH₃ (56%, 24 Std. bei 40°C), *p*-C₆H₄OCH₃ (70%, 48 Std. bei 40°C) bzw. an (4): R = CH₃ (48%, 3 Std. bei 40°C), C₆H₅ (51%, 5 Std. bei 40°C), *p*-C₆H₄CH₃ (67%, 12 Std. bei 40°C), *p*-C₆H₄OCH₃ (69%, 48 Std. bei 40°C). Die Acetyl- und Pivaloyl-Verbindungen reagieren jeweils am schnellsten.



Ester cyclischer Triole bilden dann Acyloxonium-Salze, wenn sie wie (7) *trans*-Diol-Gruppierungen enthalten. — Aus Glycerintriacetat entsteht ein (5a)-Salz. Das Kation (5a) ist interessant, da es sich in einer *trans*-Öffnungsreaktion in das Kation (6a) umwandeln kann, welches mit (5a) identisch ist.



Das NMR-Spektrum von (5a) in CD₃NO₂ weist bei Raumtemperatur ein scharfes Acetoxonium-Methyl-Signal (τ = 6.95) bei niedriger Feldstärke und ein normales Acetyl-Methyl-Signal (τ = 7.84) auf. Beim Erwärmen verbreitern sich beide Signale und koaleszieren bei 105°C.

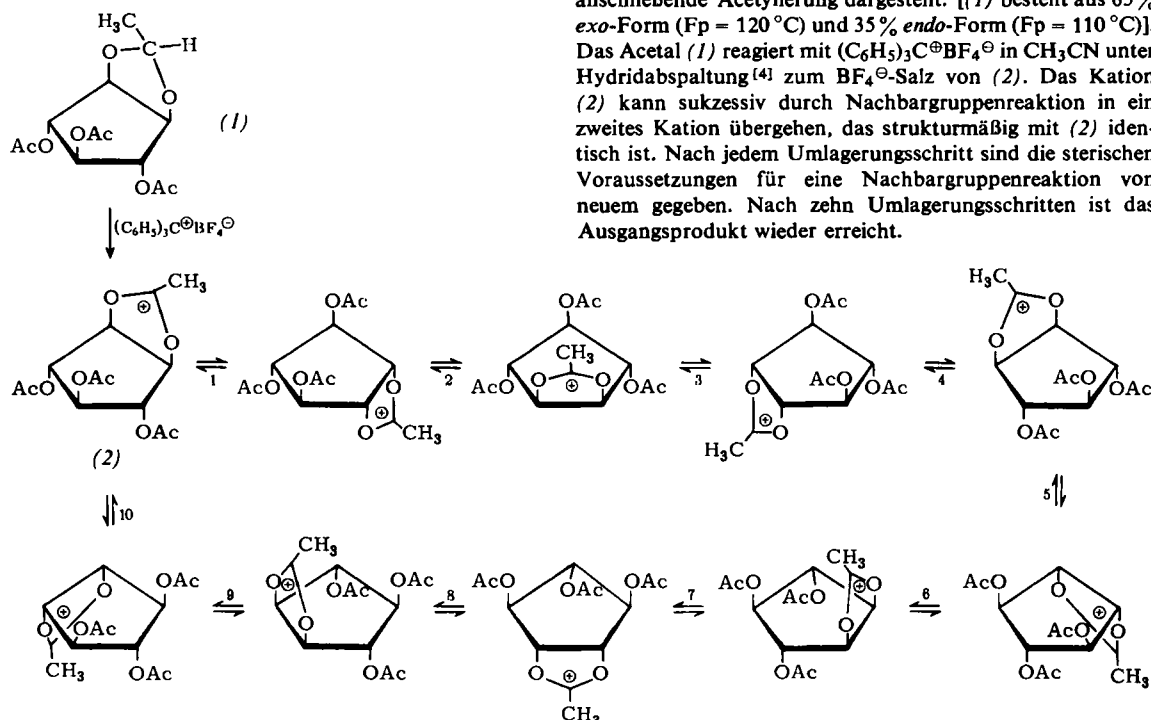
Es findet jetzt eine im Sinne der NMR-Zeitskala schnelle reversible Umwandlung (5a) \rightleftharpoons (6a) statt. Beim Pivaloxonium-Ion (5b) läßt sich die Umwandlung noch besser beobachten, da die Frequenzaufspaltung beider tert.-Butylsignale kleiner und die Koaleszenztemperatur (87°C) somit niedriger ist, so daß weniger Zersetzungsreaktionen die Untersuchung stören. Die Umwandlungen (5) \rightleftharpoons (6) können als Valenzisomerie eines Kations angesehen werden (ΔG^\ddagger -Werte s. Tabelle 1).

Ester des (1,3/2)-Cyclopentantriols (7) können mit SbCl₅ zum Acyloxonium-Kation (8) oder (9) reagieren. Das Triacetat

Tabelle 1. NMR-spektroskopisch ermittelte ΔG^\ddagger -Werte für die Umwandlungen von Acyloxonium-Kationen. T_c = Koaleszenztemperatur; Lösungsmittel: CD_3NO_2 .

	Signal	T_c (°K)	$\Delta\nu$ (Hz)	ΔG^\ddagger (kcal/mol)
(5a) \rightleftharpoons (6a)	CH ₃	≈ 378	53.5	18.7
(5b) \rightleftharpoons (6b)	(CH ₃) ₃ C	360	21.8	18.4
(8a) \rightleftharpoons (10a)	CH ₃	365	54.0	18.0
(8b) \rightleftharpoons (10b)	(CH ₃) ₃ C	348	22.3	17.8
(11) \rightleftharpoons (12)	CH ₃	≈ 368	43.0	18.4

(7a) liefert nur (8a). Dieses zeigt bei erhöhter Temperatur eine schnelle Valenzisomerisierung (8a) \rightleftharpoons (10a) (s. Tabelle 1). Das Tripivalat (7b) liefert dagegen 43 % (8b) und 57 % (9b). Das Ion (8b) zeigt eine schnelle Umwandlung (8b) \rightleftharpoons (10b) (s. Tabelle 1), das Ion (9b) dagegen nicht. Aus dem Gemisch der Hexachloroantimonate von (8b) und (9b) ist das (9b)-Salz durch Kristallisation zu gewinnen, wodurch (1,2,3/0)-Cyclopentantriol zugänglich wird. Auch das Kation (11)



zeigt eine schnelle Valenzisomerie (11) \rightleftharpoons (12) (s. Tabelle 1). (11) ist besser durch Hydridabspaltung aus 3-O-Acetyl-1,2-O-äthyliden-(1,2/3)-cyclohexantriol mit $(C_6H_5)_3C^+ BF_4^-$ als Tetrafluorborat zu gewinnen.

4-Acetoxyethyl-2-methyl-1,3-dioxolan-2-ylum-hexachloroantimonat (5a)

7.7 g Glycerintriacetat werden in 7 ml wasserfreiem CH_2Cl_2 gelöst. Bei $-10^\circ C$ werden 4.5 ml $SbCl_5$ gelöst in 5 ml CH_2Cl_2 , unter Rühren eingetropft. Nach 24 Std. bei Raumtemperatur kristallisiert das Acetoxonium-Salz (5a) aus (50% Ausb.), $F_p = 145-148^\circ C$.

Eingegangen am 29. August 1969 [Z 98a]

[*] Prof. Dr. H. Paulsen und Dipl.-Chem. H. Behre
Institut für Organische Chemie der Universität
2 Hamburg 13, Papendamm 6

[1] Carboxoniumverbindungen in der Kohlenhydratchemie, 7. Mitteilung. — 6. Mitteilung: F. Garrido Espinosa, W. P. Trautwein u. H. Paulsen, Chem. Ber. 101, 191 (1968).

[2] H. Meerwein, V. Hederich u. K. Wunderlich, Arch. Pharmaz. 291, 541 (1958); H. Meerwein, K. Bodenbrenner, P. Börner, F. Kunert u. K. Wunderlich, Liebigs Ann. Chem. 632, 38 (1960); H. Meerwein, V. Hederich, H. Morschel u. K. Wunderlich, ibid. 635, 1 (1960).

[3] C. B. Anderson, E. C. Friedrich u. S. Winstein, Tetrahedron Letters 1963, 49.

Cycloumlagerung von 3,4,5-Tri-O-acetyl-(1,2,4/3,5)-cyclopentanpentol-1,2-O-acetoxonium-tetrafluorborat

Von H. Paulsen und H. Behre[*]

An Acyloxonium-Salzen von 1,2,3-Triolen findet eine schnelle Valenzisomerisierung zwischen den beiden möglichen Dioxolanylium-Kationen statt^[1]. Der ΔG^\ddagger -Wert dieser Umwandlung ist bei (1,2/3)-Cyclopentantriol-Derivaten niedriger als bei Glycerin- oder (1,2/3)-Cyclohexantriol-Verbindungen, da offenbar am Cyclopentanring die Nachbargruppenreaktion^[2] sterisch begünstigt ist. Wir fanden, daß beim Cyclopentanpentol-System wie erwartet eine totale Valenzisomerisierung eintritt.

Penta-O-acetyl-(1,2,4/3,5)-cyclopentanpentol reagiert mit $SbCl_5$ nicht einheitlich. Wir haben daher 3,4,5-Tri-O-acetyl-1,2-O-äthyliden-(1,2,4/3,5)-cyclopentanpentol (1) durch Reaktion des freien Pentols^[3] mit Acetaldehydiäthylacetat und anschließende Acetylierung dargestellt. [(1) besteht aus 65% *exo*-Form ($F_p = 120^\circ C$) und 35% *endo*-Form ($F_p = 110^\circ C$)]. Das Acetal (1) reagiert mit $(C_6H_5)_3C^+ BF_4^-$ in CH_3CN unter Hydridabspaltung^[4] zum BF_4^- -Salz von (2). Das Kation (2) kann sukzessiv durch Nachbargruppenreaktion in ein zweites Kation übergehen, das strukturmäßig mit (2) identisch ist. Nach jedem Umlagerungsschritt sind die sterischen Voraussetzungen für eine Nachbargruppenreaktion von neuem gegeben. Nach zehn Umlagerungsschritten ist das Ausgangsprodukt wieder erreicht.

Das NMR-Spektrum des Acetoxonium-Salzes (2) in CD_3CN zeigt bei Raumtemperatur ein Acetoxonium-Methyl-Signal bei niedriger Feldstärke mit $\tau = 7.13$ (3 H) und ein aufgespaltenes Signal für normale Acetyl-Methyl-Gruppen bei $\tau = 7.90$ (6 H) und 7.95 (3 H). Bei $80^\circ C$ sind beide Signale stark verbreitert, was anzeigt, daß jetzt die Umlagerungsschritte schnell im Sinne der NMR-Zeitskala sind. Sorgfältige Integration der veränderten Methyl-Signale ergibt, daß alle Acetyl-Methyl-Gruppen an dem Prozeß beteiligt sind, was als Beweis dafür angesehen werden kann, daß sich die Substanz tatsächlich in der angegebenen Weise umlagert. Die genaue Koaleszenztemperatur kann nicht bestimmt werden, da (2) sich oberhalb von $80^\circ C$ äußerst schnell zersetzt. Durch Extrapolation und Vergleich mit den Erhitzungskurven der Acetoxonium-Salze der 1,2,3-Triole läßt sich der ΔG^\ddagger -Wert auf etwa 18 kcal/mol abschätzen.

Wir haben ferner überprüft, ob Entgleisungen im Umlagerungszyklus in dem Sinne auftreten, daß durch 1,3-Nachbargruppenreaktionen ein C-Atom während der Reaktion übersprungen wird. Hierbei müßten andere Isomere des Cyclopentanpentols gebildet werden. Die gaschromatographische Analyse des hydrolysierten Ansatzes zeigt, daß andere isomere Cyclopentanpentole^[5] zu 3% vorliegen.

Eingegangen am 29. August 1969 [98b]