

## Die Herstellung von für die Peptidsynthese geeigneten, optisch aktiven Pipecolinsäurederivaten

Von

L. Balásperi, B. Penke, J. Petres und K. Kovács

Aus dem Institut für organische Chemie der Attila-József-Universität Szeged,  
Ungarn

(Eingegangen am 27. Dezember 1969)

Zur Darstellung der optisch aktiven L- und D-Formen der den im Pflanzenreich häufig vorkommenden „nicht-proteinogenen“ Aminosäuren zuzuzählenden Pipecolinsäure werden eine neue Spaltungsmethode und in Verbindung damit sechs neue N-Carbobenzoxo-L- und -D-Pipecolinsäurederivate sowie vier „aktivierte Ester“ der N-Carbobenzoxo-L- und -D-Pipecolinsäure, die N-o-Nitro-phenylsulfonyl- und N-t-Butyloxycarbonyl-abkömmlinge der beiden Antipoden, beschrieben. Diese Derivate werden zur Synthese biologisch aktiver Oligopeptide empfohlen. Es wurden auch die physikalischen Daten der reinen L- und D-Pipecolinsäure ermittelt.

### *Preparation of Optically Active Pipecolic Acid Derivatives Suitable for Peptide Synthesis*

A new method for the resolution of pipecolic acid, a non-proteinogenic amino acid frequently occurring in plants, is described. Six new benzyloxycarbonyl derivatives, four activated esters of benzyloxycarbonyl L- and D-pipecolic acid and the o-nitro-phenylsulfonyl and t-butoxycarbonyl derivatives of L- and D-pipecolic acid, useful for the synthesis of biologically active oligopeptides, were prepared. The physical constants of pure L- and D-pipecolic acid are reported.

Die in der Literatur als „nicht-proteinogene“<sup>1</sup> Aminosäuren bezeichneten Verbindungen sind — obwohl nicht Bestandteile der natürlichen Peptide und Proteine — biologisch dennoch in zahlreichen Fällen von großer Bedeutung. Deshalb haben diese Aminosäuren in letzter Zeit bei der Synthese von Analogen der bekannten biologisch aktiven Peptide häufig als Substituenten der verschiedenen „proteinogenen“ Amino-

<sup>1</sup> J. Rudinger, 6. Peptid-Symposion, Athen 1963, S. 133. Macmillan (Pergamon), New York.

säuren Verwendung gefunden<sup>2</sup>. Über derartige, in unserem Institut laufende Untersuchungen wurde bereits 1966 berichtet<sup>3</sup>.

In zahlreichen biologisch aktiven Peptiden kommt die eine NH-Gruppe enthaltende „proteinogene“ eiweißbildende Aminosäure Prolin vor. Unter anderem enthalten das Bradykinin und das Oxytocin, aus den wohlbekannten Aminosäuren bestehenden Peptide, welche Träger bedeutsamer biologischer Funktionen sind, drei bzw. einen Prolinrest. Substitution dieser Prolinkomponenten zeitigt beträchtliche biologische Veränderungen<sup>2</sup>. Für eine solche Substitution kommt z. B. die als Analogon des Prolins aufzufassende L-Pipecolinsäure (Piperidin-2-carbonsäure) in Betracht, die aus zahlreichen Pflanzen isoliert worden ist, da sie eine im Pflanzenreich ziemlich häufig vorkommende Verbindung darstellt und in den pflanzlichen Stoffwechselprozessen eine gewisse Precursorrolle einnimmt<sup>4</sup>.

Im Schrifttum berichten drei Mitteilungen über die Verwendung der L-Pipecolinsäure bei peptidchemischen Arbeiten. *Katchalski* und Mitarb.<sup>5</sup> teilen die Anwendung der Pipecolinsäure beim Studium kollagener Modelle mit, *Nicolaides* und Mitarb.<sup>6</sup> bedienen sich ihrer bei der Synthese von Bradykinin-Analoga und *Bešpalova* und Mitarb.<sup>7</sup> bei der Synthese von Oxytocin-Analoga. Die zuletzt genannten Autoren teilen keine Einzelheiten über die Herstellung der in ihren Arbeiten benutzten Derivate, die im Schrifttum unbekannt sind, mit.

Da die Pipecolinsäure nur als Racemat im Handel ist, für unsere peptidchemischen Arbeiten aber optisch aktive Stoffe erforderlich sind, nimmt bei solchen synthetischen Arbeiten eine mit möglichst wenig Verlusten einhergehende zu optisch möglichst reinen aktiven Antipoden führende Spaltungsmethode eine Schlüsselposition ein. Die Schwächen der seit langem ausgearbeiteten und benutzten *Mendeschen* Spaltungsmethode<sup>8</sup> mittels Weinsäure, ihrer Modifikationen und der enzymatischen Verfahren sind bekannt. Nimmt man noch hinzu, daß zu

<sup>2</sup> *E. Schröder* und *K. Lübke*, The Peptides, II. Acad. Press, New York—London, 1966.

<sup>3</sup> *K. Kovács*, *J. Czombos* und *B. Matkovics*, Acta Chim. Acad. Sci. Hung. **50**, 361 (1966).

<sup>4</sup> *J. P. Greenstein* und *M. Winitz*, Chemistry of the Amino Acids, Wiley, New York, 1960.

<sup>5</sup> *E. Katchalski*, *A. Berger* und *J. Kurtz*, Internat. Symposium on Protein Structure and Crystallography, Madras, 1963, Acad. Press, London, 205.

<sup>6</sup> *E. D. Nicolaides*, *H. A. De Wald* und *M. K. Craft*, Ann. N. Y. Acad. Sci. **104**, 15 (1963).

<sup>7</sup> *Ž. D. Bešpalova*, *O. A. Kairov*, *U. F. Martinov*, *V. U. Natoški*, *M. I. Titov* und *E. I. Sachmatova*, Vest. Leningrad. Univ., Ser. Fiz. Chim. **21**, 157 (1966).

<sup>8</sup> *F. Mende*, Ber. dtsh. chem. Ges. **29**, 2887 (1869).

peptidsynthetischen Arbeiten die optisch aktiven Aminosäuren je nach der Art des Einbaues zumindest entweder an der  $\alpha$ -Amino- oder an der Carboxylgruppe vorübergehend geschützt werden müssen, so erscheint die Anwendung des Prinzips der von *Vogler* und *Lanz*<sup>9</sup> beschriebenen Methode bei der Darstellung der optisch aktiven L- und D-Pipecolinsäuren höchst günstig. Das Verfahren beruht auf der fraktionierten Trennung der aus L-Tyrosinhydrazid und der N-Benzoyloxycarbonyl-DL-pipecolinsäure hervorgehenden diastereomeren Salzpaare auf Grund der großen Löslichkeitsdifferenzen. In diesem Falle können beide Antipoden mit geringem Verlust, d. h. mit großen Ausbeuten, in optisch reinem Zustand isoliert werden. Vorteilhaft ist dabei, daß sie gleich in geschützter Form anfallen, wie sie bei der weiteren Verwendung zu peptidsynthetischen Arbeiten erforderlich ist. Im Laufe der Spaltung könnten die beiden Stereoisomeren in Gestalt von N-Benzoyloxycarbonyl-L-pipecolinsäure-Dicyclohexylaminsalz und N-Carbobenzoxycarbonyl-D-pipecolinsäure in optisch reiner Form isoliert werden.

Im Laufe dieser Arbeiten gelang uns die Herstellung mehrerer in der Literatur bisher nicht ausführlich beschriebener Derivate, in denen die Iminogruppen durch eine Benzoyloxycarbonylgruppe geschützt sind. Unter Anwendung der Dicyclohexylcarbodiimid-Kupplungsmethode gelang es, die aktivierten p-Nitrophenyl- und Pentachlorphenylester dieser N-Benzoyloxycarbonyl-L- und -D-pipecolinsäuren herzustellen<sup>10,11</sup>; die p-Nitrophenylester sind Öle, die Pentachlorphenylester kristallisieren. Bei der Bereitung der N-Benzoyloxycarbonyl-derivate bedienten wir uns einer modifizierten Form der von *Zervas* und Mitarb.<sup>12</sup> eingeführten Acylierungsmethode; die Vorschrift dieser Autoren<sup>13</sup> war auch die Grundlage für die N-o-Nitrophenylsulfenyl-L- und -D-pipecolinsäuren, die als stabile Dicyclohexylaminsalze isoliert wurden. Wir haben auch die im Schrifttum ebenfalls nicht bekannten N-t-Butyloxycarbonyl-L- und -D-pipecolinsäure nach der abgewandelten Methode von *Schnabel*<sup>14</sup> dargestellt, wobei unter Konstanzhaltung des pH-Wertes des Reaktionsgemisches für kontinuierliche Einspeisung der erforderlichen Natriumhydroxyldlösung gesorgt werden mußte.

<sup>9</sup> *K. Vogler* und *P. Lanz*, *Helv. Chim. Acta* **49**, 1348 (1966).

<sup>10</sup> *M. Bodanszky* und *V. du Vigneaud*, *J. Amer. Chem. Soc.* **81**, 5688 (1959).

<sup>11</sup> *J. Kovács*, *M. Q. Ceprini*, *C. A. Dupraz* und *G. N. Schmit*, *J. Org. Chem.* **32**, 3696 (1967).

<sup>12</sup> *M. Bergmann* und *L. Zervas*, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **65**, 1192 (1932).

<sup>13</sup> *L. Zervas*, *D. Borovas* und *E. Gazis*, *J. Amer. Chem. Soc.* **85**, 3660 (1963).

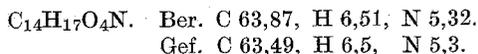
<sup>14</sup> *E. Schnabel*, *Ann. Chem.* **702**, 188 (1967).

Unser Dank gebührt der Fa. Aldrich Chemical Co. für die Überlassung der DL-Pipecolinsäure zu unseren Arbeiten, sowie der Analytischen Abteilung des Instituts für die Durchführung der mikroanalytischen Arbeiten.

### Experimenteller Teil

#### Vers. 1. *N*-Benzylloxycarbonyl-DL-pipecolinsäure

6,16 g (40 mMol) racem. Pipecolinsäure wurden in 20,1 ml 2*n*-NaOH gelöst und der Lösung unter Eiskühlung bei 0° in etwa 30 Min. gleichzeitig 6,8 g (5,83 ml, 40 mMol) Benzylloxycarbonylchlorid und 20,1 ml 2*n*-NaOH zutropft. Nach beendeter Zugabe folgte 1 Stde. Rühren bei 0° und dann 2 Stdn. Rühren bei Raumtemp. Das Reaktionsgemisch wurde 2mal mit je 25 ml Äther extrahiert und die wäßr. Phase mit 2*n*-HCl angesäuert. Das gebildete Öl wurde mit 150 ml Essigester extrahiert, die Essigesterlösung 2mal mit wenig kaltem Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vak. eingedampft. Das so gewonnene Öl kann aus Äther—Petroläther (*PÄ*) kristallisiert werden; Ausb. 7,12 g (67,8% d. Th.). Die weiße, kristalline Substanz schmilzt nach Umkristallisieren (zur Analyse) aus Äther—*PÄ* bei 83°.



#### Vers. 2. *L*-Tyrosinhydrazidsalz der *N*-Benzylloxycarbonyl-D-pipecolinsäure

a) Mit äquivalenten Mengen *L*-Tyrosinhydrazid. 24,38 g (125 mMol) *L*-Tyrosinhydrazid und 32,89 g (125 mMol) *N*-Benzylloxycarbonyl-DL-pipecolinsäure werden in 500 ml heißem Methanol gelöst und 20 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Nach Abfiltrieren und 2maligem Waschen mit je 25 ml Methanol wogen die ausgeschiedenen weißen Kristalle 25 g (87,32% d. Th.); Schmp. 186—187°,  $[\alpha]_D^{25} = +69^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ , Wasser).

b) Mit der halben Menge *L*-Tyrosinhydrazid. 24,38 g (125 mMol) *L*-Tyrosinhydrazid und 65,78 g (250 mMol) *N*-Benzylloxycarbonyl-DL-pipecolinsäure werden in 500 ml heißem Methanol gelöst und 20 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Aufarbeitung wie unter a): 50,6 g (88% d. Th.); Schmp. 187—188° C,  $[\alpha]_D^{25} = +71^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ , Wasser).



#### Vers. 3. *L*-Tyrosinhydrazidsalz der *N*-Benzylloxycarbonyl-L-pipecolinsäure

Enthalten in der Mutterlauge von Versuch 2 a oder 2 b; wurde nicht isoliert, sondern weiter verarbeitet (Versuch 5).

#### Vers. 4. *N*-Benzylloxycarbonyl-D-pipecolinsäure

22,92 g (50 mMol) *L*-Tyrosinhydrazidsalz von *N*-Benzylloxycarbonyl-D-pipecolinsäure (Versuch 2 a oder 2 b) werden in einem Gemisch aus 50 ml Wasser und 25 ml konz. HCl gelöst; nach einigen Minuten Schütteln wird die Lösung 4mal mit je 100 ml Äther extrahiert. Dann folgt zweimaliges Waschen der äther. Lösung mit je 25 ml kaltem Wasser, Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Eindampfen im Vak. Kristallisierung des gebildeten Öles aus

Äther—*PÄ* liefert 11,2 g (85,15% d. Th.) kristalline Substanz, Schmp. 112—113° C,  $[\alpha]_D^{25} = + 57,2^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 5,3$ , Eisessig).

$C_{14}H_{17}NO_4$ . Ber. C 63,87, H 6,51, N 5,32.

Gef. C 63,75, H 6,53, N 5,24.

Vers. 5. *Dicyclohexylaminsalz von Benzyloxycarbonyl-L-pipecolinsäure*

Das nach Eindampfen der Mutterlauge von Versuch 2 a oder 2 b erhaltene Öl wird in einem Gemisch aus 50 ml Wasser und 25 ml konz. HCl gelöst und die Lösung nach einigen Min. Schütteln 4mal mit je 100 ml Äther extrahiert. Nach 2maligem Waschen der äther. Lösung mit je 25 ml H<sub>2</sub>O und Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird im Vak. zur Trockne eingedampft. Das gebildete Öl ( $Rf^A = 0,9$ ,  $Rf^C = 0,1$ ) wird in 75 ml Essigester gelöst, auf 60° C erwärmt und der Lösung 9,8 ml (50 mMol) Dicyclohexylamin zugesetzt, worauf binnen 1 Stde. bei Raumtemp. das Salz auskristallisiert. Nach Filtrieren und Waschen der Kristalle mit Essigester Ausb. 26,1 g (93,89% d. Th.), Schmp. 156—158° C,  $[\alpha]_D^{25} = - 29^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 2$ , Methanol).

$C_{12}H_{23}N \cdot C_{14}H_{17}NO_4$ . Ber. C 70,25, H 9,07, N 6,3.

Gef. C 69,98, H 8,9, N 6,2.<sup>3</sup>

Vers. 6. *N-Carbobenzoxy-L-pipecolinsäure*

8,9 g (20 mMol) Dicyclohexylaminsalz der N-Benzyloxycarbonyl-L-pipecolinsäure wird in 50 ml Essigester—CHCl<sub>3</sub> gelöst, die Lösung mit 20 ml Wasser und 10 ml konz. HCl versetzt und 5 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Nach Abfiltrieren des ausgeschiedenen *DCHA*-Hydrochlorids wird die organische Phase 3mal mit 1*n*-HCl und Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, im Vak. zur Trockne eingedampft und das erhaltene Öl aus Äther—*PÄ* kristallisiert. Ausb. 4,1 g (78% d. Th.) farblose Kristalle, Schmp. 112—113° C,  $[\alpha]_D^{25} = - 57^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 5,3$ , Eisessig).

$C_{14}H_{17}NO_4$ . Ber. C 63,87, H 6,51, N 5,32.

Gef. C 63,75, H 6,3, N 5,27.

Vers. 7. *L-Pipecolinsäure*

13,15 g (50 mMol) Benzyloxycarbonyl-L-Pipecolinsäure werden in Methanol in Gegenwart eines Pd/C-Katalysators bei Raumtemp. und atmosphärischem Druck 5 Stdn. hydriert. Nach Filtrieren des Katalysators und Trockendampfen des Filtrats im Vak. wird aus Äthanol—Äther kristallisiert. Ausb. 5,1 g (79% d. Th.), Schmp. 263—264° C,  $[\alpha]_D^{25} = - 26^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 5$ , Wasser)<sup>4</sup>.

$C_6H_{11}NO_2$ . Ber. C 55,77, H 8,58, N 10,84.

Gef. C 55,47, H 8,34, N 10,69.

Vers. 8. *D-Pipecolinsäure*

Analog zu Vers. 7 aus N-Benzyloxycarbonyl-D-pipecolinsäure. Ausb. 5,2 g (80,67% d. Th.), Schmp. 263° C,  $[\alpha]_D^{25} = + 26^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 5$ , Wasser)<sup>4</sup>.

$C_6H_{11}NO_2$ . Ber. C 55,77, H 8,58, N 10,84.

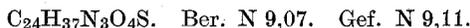
Gef. C 55,97, H 8,3, N 11,12.

Vers. 9. *Dicyclohexylaminsalz der N-o-Nitrophenylsulfenyl-L-pipecolinsäure*

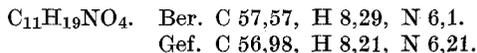
5,26 g (20 mMol) L-Pipecolinsäure wird in 10 ml 2*n*-NaOH und 25 ml Dioxan gelöst und bei Raumtemp. unter ständigem Rühren in 10 Min. gleichzeitig 4,16 g (22 mMol) N-o-Nitrophenylsulfenylchlorid<sup>13</sup> und 12 ml 2*n*-NaOH zugegeben. Nach Verdünnung des Reaktionsgemisches mit 100 ml Wasser wird filtriert und das Filtrat mit 1*n*-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 2 eingestellt. Die Lösung wird 3mal mit je 10 ml Äther extrahiert, 3mal mit Wasser gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Zugabe von 4 ml Dicyclohexylamin zu der Lösung scheiden sich binnen 2 Tagen im Eisschrank schwach orangefarbene Kristalle des Dicyclohexylaminsalzes der gebildeten N-o-Nitrophenylsulfenyl-L-pipecolinsäure aus. Ausb. 6 g (66,9% d. Th.), Schmp. 154—156° C,  $[\alpha]_D^{25} = -91,2^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ , Dimethylformamid [DMF]).

Vers. 10. *Dicyclohexylaminsalz von N-o-Nitrophenylsulfenyl-D-pipecolinsäure*

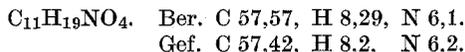
Analog zu Versuch 9, ausgehend von D-Pipecolinsäure. Ausb. 6,1 g (60,1% d. Th.), Schmp. 154—156° C,  $[\alpha]_D^{25} = +92^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ , DMF).

Vers. 11. *N-t-Butyloxycarbonyl-L-pipecolinsäure*

7,7 g (59,7 mMol) L-Pipecolinsäure werden in einem Gemisch aus 15 ml Wasser und 15 ml Dioxan suspendiert, der Suspension bei pH 10 12,88 g (90 mMol) N-t-Butyloxycarbonylazid zugesetzt und bei ständiger pH-Kontrolle bei Raumtemp. dem Reaktionsgemisch im Verlaufe von 10 Stdn. fortlaufend tropfenweise die nötige Menge 4*n*-NaOH zugegeben. Nach Extraktion der Lösung mit 50 ml Äther und Ansäuern der wäßr. Phase mit 10proz. Citronensäurelösung auf pH 3 scheidet sich ein Öl aus, das in Äther gelöst wird. Die äther. Lösung wird mit 5proz. Citronensäurelösung sowie mit gesätt. NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, im Vak. zur Trockne eingedampft und das erhaltene Öl unter P $\ddot{A}$  im Tiefkühlschrank kristallisiert. Ausb. 10,87 g (79,5% d. Th.),  $R_f^E = 0,78$ ,  $[\alpha]_D^{25} = -56^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ , Eisessig). Zur Analyse Umkristallisieren aus Äther—P $\ddot{A}$ , Schmp. 124° C.

Vers. 12. *N-t-Butyloxycarbonyl-D-pipecolinsäure*

Analog Vers. 11, ausgehend von D-Pipecolinsäure. Ausb. 10,95 g (80,1% d. Th.),  $R_f^E = 0,78$ ,  $[\alpha] = +56^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ , Eisessig). Umkristallisieren zur Analyse aus Äther—P $\ddot{A}$ , Schmp. 123° C.

Vers. 13. *N-Benzoyloxycarbonyl-L-pipecolinsäure-p-nitrophenylester*

5,27 g (20 mMol) N-Benzoyloxycarbonyl-L-pipecolinsäure und 3,36 g (24 mMol) p-Nitrophenol wurden in 45 ml Essigester gelöst, nach Abkühlen der Lösung auf 0° C das Reaktionsgemisch mit 4,32 g (21 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) versetzt und 30 Min. bei 0° C und weitere 2 Stdn. bei

Raumtemp. schnell gerührt. Nach Abfiltrieren des gebildeten Dicyclohexylharnstoffs (*DCU*) und Trockendampfen des Filtrates resultiert ein gelbes Öl; Ausb. 6,02 g (78,32% d. Th.),  $Rf^B = 0,95$ ,  $Rf^C = 0,86$ ,  $Rf^D = 0,9$ .

Vers. 14. *N*-Benzyloxycarbonyl-D-pipecolinsäure-p-nitrophenylester

Analog Versuch 13, ausgehend von *N*-Benzyloxycarbonyl-D-pipecolinsäure. Gelbes Öl, Ausb. 6,19 g (80,62% d. Th.),  $Rf^B = 0,95$ ,  $Rf^C = 0,86$ ,  $Rf^D = 0,9$ .

Vers. 15. *N*-Benzyloxycarbonyl-L-pipecolinsäure-pentachlorphenylester

2,66 g (10 mMol) Pentachlorphenol wurden in 35 ml *DMF* gelöst, die Lösung auf 0° C gekühlt, das Reaktionsgemisch mit 2,26 g (11 mMol) *DCCI* versetzt und 7 Min. gerührt, dann 2,63 g (10 mMol) in 15 ml *DMF* gelöste *N*-Carbobenzyloxy-L-pipecolinsäure zugesetzt, 3 Stdn. bei 5° C und weitere 2 Stdn. bei Raumtemp. gerührt und 12 Stdn. stehengelassen. Nach Abfiltrieren des *DCU* und Eindampfen des Filtrats im Vak. wurde der Rückstand in Essigester gelöst. Eine Nacht im Kühlschrank über *PA* gehalten, kommt es zur Kristallisation. Umkristallisieren aus Methanol; Ausb. 3,4 g (66,5% d. Th.), Schmp. 110—111° C,  $[\alpha]_D^{25} = -38,5^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ , *DMF*).

$C_{20}H_{16}NO_4Cl_5$ . Ber. C 48,87, H 3,28, N 2,85, Cl 36,07.

Gef. C 48,22, H 3,12, N 2,7, Cl 35,85.

Vers. 16. *N*-Benzyloxycarbonyl-D-pipecolinsäure-pentachlorphenylester

Analog Versuch 15, ausgehend von *N*-Benzyloxycarbonyl-D-pipecolinsäure. Ausb. 3,65 g (71,4% d. Th.), Schmp. 111—112° C,  $[\alpha]_D^{25} = +38^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 1$ , *DMF*).

$C_{20}H_{16}NO_4Cl_5$ . Ber. C 48,87, H 3,28, N 2,85, Cl 36,07.

Gef. C 48,5, H 3,14, N 2,7, Cl 35,85.

Die Verfolgung der Reaktion und die Kontrolle der Reinheiten im Laufe der experimentellen Arbeiten geschahen durch Dünnschicht-Chromatographie. Die benutzten Lösungsmittelsysteme waren:

A. *n*-Butanol : Eisessig : Wasser 4 : 1 : 1.

B. Essigester : Pyridin : Eisessig : Wasser 60 : 20 : 6 : 11.

C. Chloroform : Aceton 9 : 1.

D. Chloroform : Methanol 8 : 2.

E. Aceton : Eisessig 98 : 2.

Die Bestimmung der Schmelzpunkte (unkorr.) erfolgte am *Kofler*-Block. Die Drehungswerte wurden am *Zeiss*schen Polarimeter ermittelt; sie sind unkorrigiert.