

Zur Synthese monomerer cyclischer Cystinpeptidderivate, I

## Synthese der Sequenz A 6–9 des Schafinsulins als Cyclocystinylderivat<sup>1)</sup>

von Heinz Berndt<sup>\*)</sup>, Henning Klostermeyer<sup>\*\*)</sup> und Helmut Zahn<sup>\*\*\*)</sup>

Aus dem Deutschen Wollforschungsinstitut an der Technischen Hochschule, D-51 Aachen

Eingegangen am 3. Januar 1972

Es wird die Synthese der Sequenz A 6–9 des Schafinsulins in der geschützten Form Boc-Cys-Cys-Ala-Gly-OBu<sup>t</sup> (**5**) sowie das Verhalten dieses monomeren cyclischen Cystinpeptidderivates gegenüber den in der Peptidchemie gebräuchlichen Reagenzien Bortrifluorid/Eisessig, Triäthylamin und Hydrazinhydrat beschrieben.

*On the Synthesis of Monomeric, Cyclic Cystine-peptide Derivatives, I. — The Synthesis of the Sequence A 6–9 of Sheep Insulin as Cyclocystine Derivative<sup>1)</sup>*

The synthesis of the sequence A 6–9 of sheep insulin in the protected form: Boc-Cys-Cys-Ala-Gly-OBu<sup>t</sup> (**5**) is reported. The chemical reactivity of the monomeric, cyclic cystine-containing peptide with common reagents in peptide chemistry (boron trifluoride/glacial acetic acid, triethylamine and hydrazine hydrate) is evaluated.

Bei einer Synthese der B-Kette des Rinderinsulins<sup>2)</sup> ließ sich das Schwefelschutzproblem durch den Einbau interchenarer Cystinpeptide anstelle der zu schützenden Cysteinreste umgehen. Auf diese Weise wurden Polydisulfidpeptide erhalten, die durch Mercaptolyse bzw. oxidative Sulfitolyse in einsträngige Sulfhydryl- bzw. S-Sulfonat-Peptide überführt werden konnten.

Die Anwendung des geschilderten Syntheseweges beim Aufbau einer Insulin-A-Kette würde jedoch wegen der in der A-Kette vorhandenen vier Cysteinreste jeweils die Verknüpfung eines polymeren Polydisulfidpeptides mit einem symmetrischen offenkettigen Cystinpeptid, bzw. die Verknüpfung zweier polymerer Polydisulfidpeptide erfordern (vgl. Schema 1). Dieser Schritt dürfte praktisch kaum realisierbar sein (vgl. hierzu die Diskussion in Lit.<sup>3)</sup>).

<sup>\*)</sup> Teil der Dissertation H. Berndt, Techn. Hochschule Aachen 1972.

<sup>\*\*)</sup> Jetzige Anschrift: Institut für Chemie der Bundesanstalt für Milchwirtschaft, Kiel.

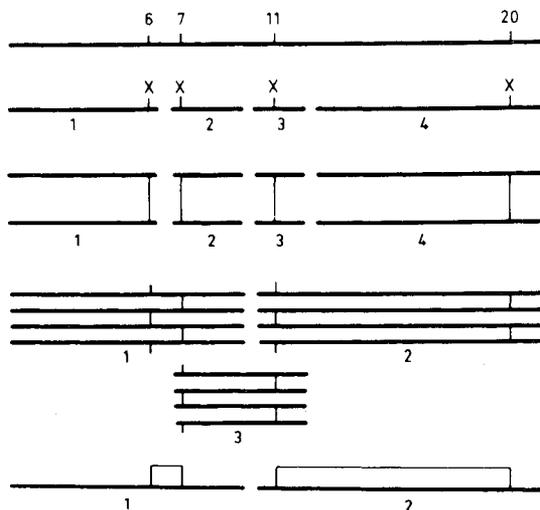
<sup>\*\*\*)</sup> Georg Wittig zum 75. Geburtstag in Verehrung gewidmet.

<sup>1)</sup> 83, Mitteilung über Peptide; 82, Mitt.: G. Krail, D. Brandenburg, H. Zahn und R. Geiger, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 352, 1595 (1971).

<sup>2)</sup> H. Zahn und G. Schmidt, Tetrahedron Letters [London] 1967, 5095; Liebigs Ann. Chem. 731, 91, 101 (1970).

<sup>3)</sup> K. Lübke und H. Klostermeyer, Advances in Enzymol. 33, 445 (1970).

Schema 1. Bausteine für Synthesen der Insulin-A-Kette unter Verwendung inter- bzw. intrachenarer Disulfidbrücken des Cysteins in den Positionen A 6, 7, 11 und 20 der Insulin-A-Kette als Thiolschutz; X = S-C(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>



Die Zahl der Cysteinreste in der A-Kette erlaubt es jedoch, eine Insulin-A-Kette zu synthetisieren, in welcher sich jeweils zwei Cysteinreste durch intrachenare Disulfidbildung zu den im Insulin nicht auftretenden Cystinbrücken A 6–7 und A 11–20 gegenseitig schützen. Die Brücke A 6–7 wird dabei vom achthgliedrigen Cyclocystinylringssystem gebildet.

Lindley und Haylett<sup>4)</sup> konnten zeigen, daß die Disulfidbrücke des L-Cyclocystins<sup>5,6)</sup> gegenüber konzentrierter Salzsäure stabil ist, die durch den Ringschluß bedingte *cis*-Peptideinheit jedoch hydrolytisch leichter angreifbar ist als eine *trans*-Peptidbindung. Ziel unserer Untersuchungen war, zu prüfen, ob sich das L-Cyclocystin infolge seines sterischen Aufbaues<sup>7)</sup> in einen Peptidverband einbauen läßt, und inwieweit das leicht gespannte Ringsystem<sup>8)</sup> den in der Peptidchemie üblichen Synthesebedingungen standhält.

Unter Berücksichtigung der Erfahrungen, die bei der Abspaltung von tert.-Butylestern mit Borfluorid/Eisessig<sup>9,10)</sup> an unsymmetrischen offenkettigen Cystinpeptiden

4) H. Lindley und T. Haylett, *Biochem. J.* **108**, 701 (1968).

5) N. Izumiya und J. P. Greenstein, *Arch. Biochem. Biophysics* **52**, 203 (1954).

6) B. Kamber, *Helv. chim. Acta* **54**, 927 (1971).

7) R. Chandrasekharan, *Proc. Indian Acad. Sci., Sect. A* **1968**, 13 [*C. A.* **70**, 4583k (1969)].

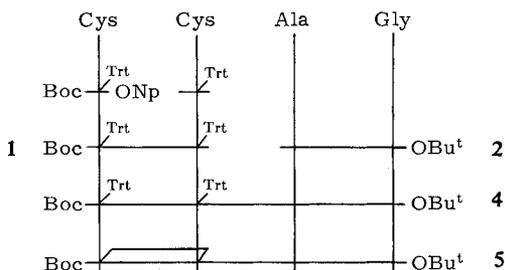
8) R. Chandrasekharan und R. Balasubramanian, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **188**, 1 (1969).

9) A. Cosmatos, I. Photaki und L. Zervas, *Proc. 6th Europ. Peptide Symposium*, Athen 1963, Pergamon Press, Oxford 1966, S. 301.

10) R. G. Hiskey und E. L. Smithwick Jr., *J. Amer. chem. Soc.* **89**, 437 (1967).

gemacht wurden und angeregt durch die Calcitoninsynthese von *Sieber* und Mitarbb.<sup>11)</sup> wurde die Synthese des cyclischen Cystinpeptidderivates Boc-Cys-Cys-Ala-Gly-OBu<sup>t</sup> (**5**) in Angriff genommen (siehe Schema 2).

Schema 2. Synthese von **5**



In eigenen Versuchen hatte sich das cyclische Disulfid L-Cyclocystin gegenüber Borfluorid in Eisessig als völlig stabil erwiesen. Nach der Behandlung mit dem Reagenz zeigte das IR-Spektrum die für das Cyclocystin charakteristischen Absorptionsbanden<sup>4)</sup> bei 1295 cm<sup>-1</sup> (*cis*-Amid-III) sowie bei 1483 cm<sup>-1</sup> [ $\delta$ -(CH<sub>2</sub>)-Deformationsschwingung].

Während sich die Darstellung des für die Synthese von **4** benötigten Amino-peptidderivates **2** problemlos gestaltete, wurde nach Chromatographie der rohen Dipeptidsäure **1** an Kieselgel zwar ein dünn-schichtchromatographisch einheitliches Produkt erhalten, dieses bedurfte jedoch der weiteren Reinigung über das Dicyclohexylammoniumsalz, um reproduzierbare Werte der optischen Aktivität zu liefern.

Die Dipeptidderivate **1** und **2** wurden mit Dicyclohexylcarbodiimid und *N*-Hydroxy-succinimid in Tetrahydrofuran zum allseitig geschützten Bis-[*S*-trityl]-cystein-peptid-Derivat **4** umgesetzt, welches nach Digerieren mit Essigester und Isopropylalkohol in 92proz. Ausbeute anfiel. In Analogie zu dem von *Kamber* und *Rittel*<sup>12)</sup> beschriebenen Verfahren zur Oxidation *S*-tritylierter Peptide zu cyclischen Disulfiden, wurde das Tetrapeptid **4** unter Verdünnungsbedingungen ( $c = 10^{-3}$  Mol · l<sup>-1</sup>) durch Eintropfen in eine Jod-Lösung zum cyclischen Disulfidderivat **5** oxidiert.

Das Molekulargewicht von **5** wurde ebullioskopisch zu  $506 \pm 36$  g · Mol<sup>-1</sup> bestimmt und bestätigte somit die anhand der Elementaranalyse für das monomere cyclische Cystinpeptidderivat postulierte Summenformel C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub> (Mol.-Gew. 506.6). Der Vergleich der IR-Spektren des Bis-[*S*-trityl]-cystein-peptid-Derivates **4** und des

<sup>11)</sup> P. Sieber, M. Brugger, B. Kamber, B. Riniker und W. Rittel, Helv. chim. Acta **51**, 2057 (1968).

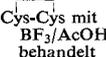
<sup>12)</sup> B. Kamber und W. Rittel, Helv. chim. Acta **51**, 2061 (1968).

monomeren cyclischen Disulfidpeptides **5** zeigte, daß die Amidbindung des Cyclocystinsystems in der *cis*-Konformation vorliegt [IR-Spektrum: *cis*-Amid-III-Bande<sup>13,14</sup> bei 1295,  $\delta$ -(CH<sub>2</sub>)-Deformationsschwingung bei 1483 cm<sup>-1</sup>; siehe Tab. 1].

Bei Behandlung des cyclischen Disulfidderivates **5** mit Triäthylamin in Essigester bei Raumtemperatur wurde kein basenkatalysierter Disulfidaustausch beobachtet. Im Gegensatz zu offenkettigen symmetrischen Cystinpeptiden ist jedoch das Cystinpeptidderivat **5** unter den Bedingungen der Hydrazinolyse instabil und wird von methanolischer Hydrazin-Lösung innerhalb einer halben Stunde zerstört. Die terminalen Schutzgruppen des Derivates **5** lassen sich aber mit Borfluorid in Eisessig<sup>15,16</sup> entfernen, wobei ein dünnschichtchromatographisch einheitliches Produkt mit intakter Disulfidbrücke anfällt [*cis*-Amid-III-Bande,  $\delta$ -(CH<sub>2</sub>)-Deformationsschwingung]. Da das achthgliedrige cyclische Disulfidsystem des L-Cyclocystins auch innerhalb eines Peptidverbandes stabil ist, zudem von Triäthylamin und Bortrifluorid/Eisessig nicht aufgespalten wird, sollte eine Synthese der Insulin-A-Kette, bei der sich die Cysteinreste in den Positionen A 6 und A 7 durch intrachenare Disulfidbildung gegenseitig schützen, realisierbar sein.

Die IR-Spektren des unbehandelten und behandelten L-Cyclocystins (siehe Tab. 1) weisen beide die für den intakten Disulfidring sprechenden Absorptionsbanden [*cis*-Amid-III und  $\delta$ -(CH<sub>2</sub>)-Deformationsschwingung] auf. Der Vergleich der Spektren von **4** und **5** zeigt, daß im cyclischen Disulfidpeptid **5** die für die Aromaten charakteristischen Banden bei 1488 (C—C-Schwingung) und bei 742, 698 cm<sup>-1</sup> (C—H-Schwingung des deformierten unebenen Benzolringes) fehlen, während nach der Oxi-

Tabelle 1. Die charakteristischsten IR-Absorptionsbanden [cm<sup>-1</sup>] des Cyclocystins, des mit Bortrifluorid/Eisessig behandelten Cyclocystins, der Substanzen **4** und **5** sowie die wichtigsten Absorptionsbanden der mit Bortrifluorid/Eisessig behandelten Substanz **5**

Verbindung	Boc-N	CO <sub>2</sub> Bu <sup>t</sup>	Amid I <i>trans</i>	Amid II <i>trans</i>	—CH <sub>2</sub>	Aromat	CH <sub>2</sub> Glycin	Amid III <i>cis</i>	Aro- mat
	—	—	1670	—	1485	—	—	1338	—
	—	—	1660	—	1475	—	—	1295	—
<b>4</b>	1745	1710	1668	1545	—	1488 1450	1433	—	698 742
<b>5</b>	1750	1710	1683 1648	1562 1548	1500	—	1428	1333 1295	—
<b>5</b> mit BF <sub>3</sub> /AcOH deblockiert	—	—	1668	1530	1483	—	1430	1295	—

<sup>13)</sup> T. Miyazawa, J. mol. Spectroscopy **4**, 155 (1960).

<sup>14)</sup> K. Blaha, J. Smolíkova und A. Vitek, Collect. czechoslov. chem. Commun. **31**, 4296 (1966).

<sup>15)</sup> R. G. Hiskey, L. M. Beacham, III., V. G. Math, J. N. Smith, E. B. Williams Jr., A. M. Thomas und E. T. Wolters, J. org. Chemistry **36**, 488 (1971).

<sup>16)</sup> E. Schnabel, H. Klostermeyer und H. Berndt, Liebigs Ann. Chem. **749**, 90 (1971).

dation drei neue Banden bei 1500, 1333 und 1295  $\text{cm}^{-1}$  auftreten. Nach *Blaha* und Mitarbeitern<sup>14)</sup> sollte es sich dabei um die  $\delta$ -( $\text{CH}_2$ )-Bande (1500  $\text{cm}^{-1}$ ) und die *cis*-Amid-III-Banden (1333 und 1295  $\text{cm}^{-1}$ ) handeln. Das nach der Abspaltung der terminalen Schutzgruppen aus **5** erhaltene Produkt zeigt ebenfalls die für einen intakten Disulfidring sprechenden Banden [*cis*-Amid-III bei 1295 und  $\delta$ -( $\text{CH}_2$ )-Deformationsschwingung bei 1483  $\text{cm}^{-1}$ ].

Wir danken dem *Landesamt für Forschung beim Minister für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen* für die Ermöglichung der vorliegenden Arbeit, sowie der *Deutschen Forschungsgemeinschaft*, Bad Godesberg, für die Förderung des Forschungsvorhabens Za 5/22: Organisch chemische Synthese makromolekularer Naturstoffe und synthetische Analoga. — Ferner danken wir dem *Verband der Chemischen Industrie* und seinen Mitgliedsfirmen für die Überlassung von Chemikalien im Rahmen der Hochschullieferung und dem *Fonds der Chemischen Industrie* für finanzielle Unterstützung.

## Beschreibung der Versuche

Die angegebenen *Schmelzpunkte* sind unkorrigiert. — Die Präparate wurden durch *Dünnschichtchromatographie* (DC) an Kieselgel ( $\text{HF}_{254}$ ; Fa. Merck) auf Einheitlichkeit geprüft. Laufmittel: Chloroform/Eisessig/Methanol (92.2 : 2.9 : 4.9); Chloroform/Methanol/Eisessigsäuremethylester/Eisessig (88.5 : 4.6 : 4.0 : 2.8); *n*-Heptan/*tert*.-Butylalkohol/Pyridin (75 : 15 : 10). — Die *Molekulargewichtsbestimmung* wurde in einem Mechrolab Dampfdruckkosmometermodell 30 der Fa. Kipp & Zonen durchgeführt. — Die IR-*Spektren* wurden mit dem Infrarot-Spektrophotometer Modell 21 (Fa. Perkin-Elmer) in KBr aufgenommen. — Verwendete *Abkürzungen*: DMF = Dimethylformamid, THF = Tetrahydrofuran, DCHA = Dicyclohexylamin, EE = Essigsäureäthylester.

*Boc-Cys(Trt)-Cys(Trt)* (**1**). — 8.26 g (0.02 Mol) *Cys(Trt)*<sup>17)</sup> wurden in einer Lösung von 11.68 g (0.02 Mol) *Boc-Cys(Trt)-ONp*<sup>18)</sup> in 200 ml absolutem *Pyridin* unter kräftigem Rühren aufgeschlämmt. Nach 12 Stdn. hatte sich alles *Cys(Trt)* gelöst und konnte dünnschichtchromatographisch kein *Boc-Cys(Trt)-ONp* mehr nachgewiesen werden. Das *Pyridin* wurde i. Vak. abgezogen, der Rückstand in 25 ml *EE/Chloroform* (1 : 4) aufgenommen und an Kieselgel (0.05–0.2 mm; Fa. Merck) in einer Säule (100 × 6 cm) chromatographiert, wobei man die Verunreinigung mit *EE/Chloroform* (1 : 4) und das Produkt **1** mit *EE/Chloroform/DMF* (1 : 4 : 1) eluierte. Das Lösungsmittel des Eluats von **1** wurde i. Vak. entfernt, der ölige Rückstand in wenig Äther aufgenommen und der Äther abdestilliert, wobei ein schaumartiger fester Rückstand verblieb. Das Produkt erwies sich bei der DC als einheitlich. Ausbeute 72 %. — Zur Charakterisierung wurde das vorgereinigte **1** als Dicyclohexylammoniumsalz aus Äther gefällt und wieder frei gesetzt. Dazu wurden 808 mg (1 mMol) vorgereinigtes **1** in 10 ml Äther/Petroläther (1:1) gelöst und nach Zugabe von 0.21 ml (1.1 mMol) *DCHA* eine Woche bei 0° stehen gelassen. Das ausgefallene Dicyclohexylammoniumsalz wurde abfiltriert, mit Äther/Petroläther gründlich gewaschen sowie i. Vak. über  $\text{P}_4\text{O}_{10}$  und

<sup>17)</sup> R. G. Hiskey und J. B. Adams Jr., *J. org. Chemistry* **30**, 1340 (1965).

<sup>18)</sup> H. Zahn und W. Lunkenheimer, *Liebigs Ann. Chem.* **740**, 1 (1970).

Paraffin getrocknet. Ausbeute 610 mg (61.5%) *Boc-Cys(Trt)-Cys(Trt)·DCHA* (3). Schmp. 154–158°;  $[\alpha]_D^{25} = +18.6^\circ$  ( $c = 1$ , Methanol).

$C_{61}H_{71}N_3O_5S_2$  (990.3) Ber. C 74.0 H 7.21 N 4.24 S 6.47  
Gef. 73.8 7.19 4.42 6.63

Zur Freisetzung von **1** wurden 990 mg (1 mMol) **3** in 100 ml Äther aufgeschlämmt, portionsweise mit der äquivalenten Menge *Schwefelsäure* (10 ml 0.1 *n*  $H_2SO_4$ ) versetzt; die organische Phase wurde dreimal mit 100 ml Wasser extrahiert. Die Ätherphase wurde dann über Magnesiumsulfat getrocknet, auf ein geringes Volumen eingeeengt und bis zur ersten Trübung mit *n*-Hexan versetzt. Der nach einer Woche ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert, mit Äther/*n*-Hexan gewaschen und i. Vak. bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ausbeute 606 mg **1** [75%, bez. auf **3**, 33.4% bez. auf Boc-Cys(Trt)-ONp]. Schmp. 105–107°;  $[\alpha]_D^{25} = +4.0^\circ$  ( $c = 0.98$ , EE).

$C_{49}H_{48}N_2O_5S_2$  (808.8) Ber. C 72.7 H 6.09 N 3.46 S 7.82  
Gef. 72.3 6.07 3.50 7.52

*Boc-Cys(Trt)-Cys(Trt)-Ala-Gly-OBu<sup>t</sup>* (**4**). — Es wurden 6 mMol (4.84 g) **1**\*, 6 mMol (1.21 g) *Ala-Gly-OBu<sup>t</sup>* (**2**)<sup>19)</sup>, 6 mMol (0.69 g) *N-Hydroxy-succinimid* und 6 mMol (1.24 g) *Dicyclohexylcarbodiimid* in jeweils 20 ml absolutem THF gelöst, die Lösungen auf –15° abgekühlt und in der angegebenen Reihenfolge unter Rühren zu **1** gegeben. Der Ansatz wurde 5 Stdn. bei –15° und anschließend vier Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zusatz einiger Tropfen Eisessig wurde die Reaktionslösung eine Stunde bei Raumtemperatur belassen, anschließend auf –15° abgekühlt und der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Das Filtrat wurde eingedampft, der verbleibende Rückstand bei 40° successive mit 100 ml EE und 100 ml Isopropylalkohol digeriert und i. Vak. getrocknet. Ausbeute 5.58 g (92%); Schmp. 203–204°,  $[\alpha]_D^{25} = -4.1^\circ$  ( $c = 1$ , DMF).

$C_{58}H_{64}N_4O_7S_2$  (993.1) Ber. C 70.1 H 6.49 N 5.64 S 6.45  
Gef. 70.3 6.31 5.95 6.46

*Boc-Cys-Cys-Ala-Gly-OBu<sup>t</sup>* (**5**). — 3.97 g (4 mMol) **4** wurden in 1000 ml absolutem DMF gelöst und mit 1000 ml absolutem Methanol verdünnt. Diese Lösung wurde innerhalb von vier Stunden in eine Lösung von 10.24 g (40 mMol) *Jod* in 2000 ml DMF/Methanol (1:1) eingetropft. Nach dem Zutropfen wurde noch eine Stunde weitergerührt und das überschüssige *Jod* bei 0° mit 0.1 *m* methanolischer *Hydrazinhydrat*-Lösung reduziert. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. abgezogen, der Rückstand in EE aufgenommen und die Lösung filtriert. Der EE wurde i. Vak. abdestilliert, der Rückstand wiederum in EE aufgenommen und von wenig ungelösten Anteilen abfiltriert. Die durch gelöstes *Jod* noch braun gefärbte Lösung wurde erneut durch Schütteln mit einer wäbr. 0.01 *m* *Hydrazinhydrat*-Lösung bis auf eine verbleibende blaßgelbe Farbe reduziert. Die EE-Phase wurde dann über Magnesiumsulfat getrocknet, auf ein Volumen von ca. 100 ml eingeeengt und portionsweise mit 600 ml Cyclohexan versetzt. Nach fünf Tagen wurde der kristalline weiße Niederschlag abfiltriert und i. Vak. in Gegenwart von *Diphosphorpentoxid* und *Paraffinschnitzeln* getrocknet. Ausbeute 1.08 g (53%);

\*) Es wurde an Kieselgel vorgereinigtes **1** eingesetzt, da vergleichende Reaktionssätze mit dem über **3** gereinigten **1** Substanz **4** in gleicher Ausbeute und Reinheit lieferten.

<sup>19)</sup> R. Osterloh, Dissertation Techn. Hochschule Aachen 1969.

Schmp. 204–206°,  $[\alpha]_D^{24} = +16.8^\circ$  ( $c = 1$ , DMF). Das Molekulargewicht von **5** wurde ebullioskopisch bestimmt. Als Lösungsmittel diente Chloroform, die Messungen wurden bei 37° ausgeführt. Zur Auswertung wurden 4 Meßwerte im Konzentrationsintervall von 0.0011–0.143 *m* herangezogen, die einen Mittelwert von  $506 \pm 36 \text{ g} \cdot \text{Mol}^{-1}$  ergaben (ber.:  $506.6 \text{ g} \cdot \text{Mol}^{-1}$ ).

$\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}_2$  (506.6) Ber. C 47.41 H 6.76 N 11.05 S 12.65  
Gef. 47.24 6.74 11.03 12.77

#### Stabilitätsprüfungen an **5**

a) *Abspaltung der terminalen Schutzgruppen mit  $\text{BF}_3/\text{AcOH}$* : 164 g (0.33 mMol) **5** wurden in 2 ml Eisessig gelöst und mit 3.3 mMol (0.42 ml) *Bortrifluoridätherat* versetzt. Die Lösung wurde 1 Stde. bei Raumtemperatur belassen und anschließend das  $\text{BF}_3/\text{AcOH}$ -Gemisch im Vakuum entfernt. Durch mehrmaliges Digerieren des Rückstandes mit absolutem Äther wurde ein laut DC einheitliches öliges Produkt erhalten. Sein IR-Spektrum (siehe Tab. 1) zeigte, daß die Abspaltung der terminalen Schutzgruppen ohne Schädigung des leicht gespannten Disulfidringes in **5** verlaufen war.

b) *Behandlung mit Triäthylamin (TÄA)*: 164 mg (0.33 mMol) **5** wurden, in 10 ml EE gelöst, mit 0.33 mMol (0.045 ml) *Triäthylamin* versetzt und 12 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde successive mit 0.01 *m* HCl und Wasser gewaschen, um das Amin zu entfernen. Die Essigesterphase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft. Die DC der mit TÄA behandelten und der unbehandelten Substanz **5** waren miteinander identisch, ebenso die Schmelzpunkte, während bei der Drehung keine volle Übereinstimmung herrschte. **5** *unbehandelt*:  $[\alpha]_D^{24} = +16.8 \pm 0.5^\circ$  ( $c = 1$ , DMF); Schmp. 204–206°. – **5** *mit TÄA behandelt*:  $[\alpha]_D^{24} = +13.9 \pm 0.5^\circ$  ( $c = 1$ , DMF); Schmp. 204–208°.

c) *Behandlung mit Hydrazinhydrat*: 164 mg (0.33 mMol) **5** wurden in 20 ml Methanol gelöst und mit 1.65 mMol *Hydrazinhydrat* in 1 ml Methanol versetzt. Bereits nach kurzer Zeit wurde eine leichte Trübung der Lösung beobachtet. Nach 30 Min. konnte dünnschichtchromatographisch kein **5** mehr nachgewiesen werden. Das Chromatogramm zeigte ein Gemisch von fünf Substanzen an.

[1/72]