Protochelin, ein Catechol-Siderophor aus einem Bakterium (DMS Nr. 5746) [1]

Protocheline – a Catecholate Siderophore from a Bacterium (DMS No. 5746) [1]

K. Taraz, G. Ehlert, K. Geisen und H. Budzikiewicz

Institut für Organische Chemie der Universität, Greinstraße 4,
D-5000 Köln 41, Bundesrepublik Deutschland

H. Korth und G. Pulverer

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität, Goldenfelsstraße 21,
D-5000 Köln 41, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **45b**, 1327–1332 (1990); eingegangen am 8. Februar 1990

Catecholate, Siderophore, Structure Elucidation

The structure elucidation of protocheline (1-N-[2-N',6-N'-di(2,3-dihydroxybenzoyl)-L-lysyl]-4-N-(2,3-dihydroxybenzoyl)-1,4-diaminobutane (**3a**) isolated from the culture filtrate of a bacterium (DMS No. 5746) grown in an iron-deficient medium is described.

Eine Reihe von Mikroorganismen scheidet bei Eisenmangel Komplexbildner, sogenannte Siderophore, aus. Eine wichtige Untergruppe sind die Catechol-Siderophore mit 2,3-Dihydroxybenzoesäure (DHB) als charakteristischem Baustein. Der bekannteste Vertreter ist das von *Escherichia coli* gebildete [2] Enterobactin (= Enterochelin) mit der größten je für einen Fe(III)-Komplex gemessenen Bildungskonstanten ($10^{52} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$) [3]. DHB ist in der Regel an Aminosäuren oder deren Derivate gebunden. Durch Kondensation von zwei oder drei Untereinheiten entstehen dann die eigentlichen Siderophore, die 3 DHB-Reste enthalten und so einen sechszähligen Liganden bilden (im Falle des Enterobactins bilden 3 DHB-Serin-Einheiten einen Trilactonring). Verbindungen, die weniger als 3 DHB-Reste enthalten, zeigen in der Regel nur unwesentliche Siderophorenaktivität [4], wie das aus *Azotobacter vinelandii* isolierte Aminochelin [4] (**1**) und Azotochelin [5] (**2a**). Es

handelt sich bei solchen Verbindungen wahrscheinlich eher um Hydrolyseprodukte oder um biogenetische Vorläufer des eigentlichen Siderophors. Der für *Azotobacter vinelandii* postulierte [4, 6] Siderophor mit 3 DHB-Resten ist jedoch bisher nicht gefunden worden. Wir möchten nun über die Isolierung und Strukturaufklärung von Protochelin (1-N-[2-N',6-N'-Di(2,3-dihydroxybenzoyl)-L-lysyl]-4-N-(2,3-dihydroxybenzoyl)-1,4-diaminobutan (**3a**) neben **2a** aus einem Bakterium (s. Exp. Teil) berichten. Protochelin ist das Kondensationsprodukt von **1** und **2a** und damit wahrscheinlich auch der vermutete (s.o.) Siderophor von *Azotobacter vinelandii*. Bei der Isolierung der Catechol-Siderophore ist einmal die leichte Oxidierbarkeit und zum anderen die Hydrolyseempfindlichkeit zu berücksichtigen. Als am günstigsten erwies sich eine Extraktion des auf pH 4 angesäuerten und mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gesättigten Kulturzentrifugats mit Ethylacetat und nachfolgende chromatographische Trennung an Polyamidgel.

2a R = H
2b R = CH₃

* Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Budzikiewicz.

wobei die blauweiß fluoreszierenden Fraktionen näher untersucht wurden. Reinigung erfolgte schließlich durch Chromatographie an Sephadex LH-20.

Die Fraktion mit dem niedrigsten R_f -Wert konnte aufgrund der Hydrolyseprodukte (DHB, Lysin) und der spektroskopischen Daten (Massen- und ^1H - sowie ^{13}C -NMR-Spektren der freien Verbindung sowie des Methylierungsproduktes **2b**) als Azotochelin (**2a**) [5] identifiziert werden.

Das Hauptprodukt Protochelin (**3a**) erwies sich als sehr empfindliche Verbindung. Dünnschicht-Chromatographie (Kieselgel) führt zu teilweiser Zersetzung. Bei Raumtemperatur färben sich Lösungen von **3a** gelb, wobei sich neben undefinierten Produkten **2a** chromatographisch nachweisen läßt.

Das UV-Spektrum von **3a** zeigt die für DHB und ihre Amide typischen Maxima bei 312 ($\log \epsilon$ 4,0) und 248 nm ($\log \epsilon$ 4,4) (zum Vergleich: DHB-Glycin [7] 314 und 250 nm, Enterobactin [2] 311 und 243 nm). Das VIS-Spektrum des Fe(III)-Komplexes zeigt die charakteristische pH-Abhängigkeit der Charge-transfer-Bande bei *ca.* 500 nm, verbunden mit der entsprechenden Farbänderung ($\text{nm}/\log \epsilon$): pH 1,5 (550, 3,3 – schwach violett), 3,1 (540, 3,7 – violett), 9,4 ($\sim$ 520, 3,6 – rotviolett), 13,0 (480, 3,6 – rot) (zur Theorie: partielle Protonierung, verbunden mit einem Übergang Catecholat-Salicylat-Komplex bzw. Fe(II)/Semichinon s. Ref. [8] bzw. [9]).

Zur Aminosäuren-Analyse wurde durch HPLC gereinigtes **3b** eingesetzt, um Fehler durch Zersetzungsprodukte zu vermeiden. Hydrolyse mit nachfolgender TAB-Derivatisierung (Trifluoracetylierung und Butylierung) ergab bei der GC/MS-Analyse TAB-Lysin [10] (durch GC des N,N'-Di-trifluoracetyl-isopropylesters in L-Chirasil-Val durch Koinjektion mit authentischem Material als L-Lysin identifiziert). 1-N,4-N-Di-trifluoracetyl-1,4-diaminobutan und 1-N,1-N,4-N-Tris-trifluoracetyl-1,4-diaminobutan (Vergleich mit authentischem trifluoracetylierten 1,4-Diaminobutan) sowie Derivate des Butylbenzoats (2,3-Di-trifluoracetoxy-, 2-Hydroxy-3-trifluoracetoxy-, 2-Methoxy-3-trifluoracetoxy-, 2-Hydroxy-3-methoxy-).

Das im DEI-Massenspektrum von **3a** beobachtete Molekül-Ion (m/z 624) entspricht der für ein Kondensationsprodukt von Lysin, 1,4-Diaminobutan und 3 mol DHB berechneten Masse. Cha-

rakteristische Fragmente sind das Dihydroxybenzoyl-Kation (m/z 137), begleitet von einem intensiveren Ion m/z 136 (H-Verlust typisch für *o*-Hydroxybenzoesäurederivate [11]) sowie m/z 224 (entspr. N-Dihydroxybenzoyl-diaminobutan) und $[\text{M}-224]^+$. Methylierung führt zu dem erwarteten Massenzuwachs von 6×14 u (M^{++} m/z 708). Entsprechend wird m/z 137 zu m/z 165 verschoben; m/z 164 fehlt, da keine freie *o*-Hydroxylgruppe mehr vorhanden ist.

Die ^1H -NMR-Daten von **3a**, **3b** (und zum Vergleich von **2b**) sind in Tab. I zusammengefaßt*.

Das α -Proton des Lysins erscheint in M als t, in A wegen der zusätzlichen Kopplung mit dem NH-2-Proton und der Nicht-Äquivalenz der Lysin- β -Protonen als m ($\neq$ bei 4,58 – vgl. [12] – führt zu entsprechender Signalvereinfachung bei 8,11 sowie bei 1,85 und 1,94). Die durch die Dihydroxybenzoylamidgruppen entschirmten Lysin- ϵ - und Diaminobutan- α' -Protonen fallen bei 3,40 zusammen (A), die zu einer Alkylamidgruppe benachbarte Diaminobutan- α -CH₂-Gruppe erscheint bei 3,25. Diese Zuordnung geht davon aus, daß die Signalen nur durch induktive Effekte der benachbarten Gruppen, nicht aber durch z. B. Anisotropieeffekte der aromatischen Systeme aufgrund bevorzugter Konformationen bestimmt werden. Ist diese Zuordnung richtig, so sind die bei 8,21 erscheinenden NH-Protonen N-1 und N-4 sowie das

* In der folgenden Diskussion bedeuten M: CD₃OD, A: Aceton, d: Dublett, t: Triplett, m: Multipllett; $\neq$ Einstrahlung bei einem Doppelresonanzexperiment. Chemische Verschiebungen sind in δ ppm angegeben.

Tab. I. ¹H-NMR-Daten.

Proton	δ [ppm] 3a		3b		2b	
	(CD ₃) ₂ CO	CD ₃ OD	(CD ₃) ₂ CO	CD ₃ OD	(CD ₃) ₂ CO	CD ₃ OD
NH-1	8,21 ^a		8,07 ^a		8,04	
NH-2	8,11		8,69		8,56	
NH-3	7,59 ^a		7,58 ^a			
NH-4	8,21 ^a		8,07 ^a			
H-4	3 Protonen im Bereich 6,91–6,98	6,91 6,90 6,90	6 Protonen im Bereich 7,19–7,06	6 Protonen im Bereich 7,19–7,04	4 Protonen im Bereich 7,22–7,06	4 Protonen im Bereich 7,21–7,07
H-5	6,71 6,69 6,66	6,69 6,68 6,68				
H-6	7,32 7,24 7,22	7,29 7,18 7,17	7,52 7,46 7,44	7,39 7,27 7,25	7,51 7,45	7,37 7,25
α -CH–Lys	4,58	4,51	4,65	4,59	4,72	4,69
ε -CH ₂ –Lys	3,40 ^a	3,36 ^a	3,49 ^a	3,38 ^a	3,41	3,40
α' -CH ₂ –DAB	3,40 ^a	3,36 ^a	3,49 ^a	3,38 ^a		
α -CH ₂ –DAB	3,25 ^a	3,23 ^a	3,28 ^a	3,28 ^a		
β -CH ₂ –Lys	1,94 1,85	1,86 ^b	1,95 1,80	1,91 1,79	1,90 ^c	2,01 1,87
β -CH ₂ –DAB β' -CH ₂ –DAB δ -CH ₂ –Lys γ -CH ₂ –Lys	} 1,46–1,69	} 1,44–1,72	} 1,58–1,70 1,50	} 1,58–1,69 1,51	1,67 1,54	1,66 1,52
OCH ₃			3,90 3,89 3,89 3,88 3,85 3,82	3,88 3,87 3,86 3,85 3,83 3,80	3,91 3,90 3,87 3,83 3,73	3,89 3,88 3,86 3,81 3,75

^a Bezüglich der Zuordnung s. Text; ^b die Signale der diastereotopen Protonen überlagern sich; ^c vermutlich vom Aceton-d₆-Signal überlagert.

bei 7,59 N-3 zuzuordnen ($\neq$ bei diesen Frequenzen führt zur partiellen Entkopplung der Signale bei 3,40 bzw. 3,25). Die Protonen der drei Benzolringe liefern AMX-Systeme, wobei dem der Carbonylgruppe benachbarten H der tiefste Wert zukommt. Die Kopplungskonstanten konnten im M-Spektrum ermittelt werden: ³J(H-6, H-5) 8,0, ⁴J(H-6, H-4) 1,4, ³J(H-4, H-5) 7,9 Hz. Eine Zuordnung zu den einzelnen Ringen ist wegen der nur geringfügigen Unterschiede der chemischen Verschiebungen nicht möglich.

Im ¹H-NMR-Spektrum von **3b** erkennt man die 9 Methoxysignale. Ansonsten ist erwähnenswert, daß die Lysin- γ -Protonen nicht mehr in dem CH₂-Berg liegen und daher durch $\neq$ bei den Resonanz-

frequenzen der Lysin- β -Protonen identifiziert werden konnten.

Die ¹³C-Daten von **3a**, **3b** und **2b** finden sich in Tab. II. Die Zuordnung von 174,7 zur Carbonylgruppe des Lysins erfolgte aufgrund des Literaturwertes [12] für peptidisch gebundenes Lysin (174,7) sowie der Tatsache, daß Permethylierung (**3b**) praktisch zu keiner Verschiebung führt (zum Unterschied von den DHB-Carbonyl-Signalen, Lit.-Wert [13] für DHB 172,8). Die übrigen Signale konnten aufgrund von DEPT-Experimenten bzw. durch heteronukleare Entkopplung identifiziert werden.

Die aufgeführten Daten sind nur mit der Struktur **3a** für den Siderophor zu vereinbaren.

C-Atom ^f		δ [ppm]		
		3a	3b	2b^{b,d}
C=O–Lys		174,4	173,9	174,0
C=O–DHB (DMeB)		171,5	168,6	168,6
		170,8	168,5	167,9
			167,4	
C-1	q	117,3	129,5	129,5
		116,8	129,4	128,0
		116,7	127,9	
C-2 ^{e,b}	q	150,3	149,0	149,0
		150,3	148,5	148,5
		149,6		
C-3 ^{e,b}	q	147,3	154,3	154,3
		147,2		151,3
C-4, C-5 ^a	t	119,7	125,4	117,1 (C-4 ^b)
		119,7	117,0 (C-4 ^b)	116,4 (C-4 ^b)
		119,5	116,4 (C-4 ^b)	122,6 (C-5 ^b)
				122,3 (C-5 ^b)
C-6	t	118,6	122,7	125,5
			122,3	125,4
			122,2	
α -C–Lys ^g	t	55,1	54,9	54,0
α' -C–DAB ^{a,g}		40,2 o. 40,1	40,4	
ε -C–Lys ^{a,g}		40,2 o. 40,1	40,3 ^c	40,3
α -C–DAB ^{a,g}		40,1	40,1	
β -C–Lys		33,0	33,8	30,0
δ -C–Lys ^a		30,1	30,1	32,6
β -, β' -C–DAB ^a		27,8	27,9	
			27,8	
γ -C–Lys ^g		24,4 ^d	24,1	24,1
OCH ₃ (am C-2 ^b)			62,1	62,1
			61,8	61,8
OCH ₃ (am C-3 ^b)			56,6	56,6
			56,5	56,5
COOCH ₃				52,8

Tab. II. ¹³C-NMR-Daten (CD₃OD).

^a Bezüglich der Zuordnung vgl. die Diskussion der ¹H-NMR-Spektren; ^b Zuordnung durch Vergleich mit Literaturdaten von DMeB [13]; ^c Zuordnung durch Vergleich mit den chemischen Verschiebungen von **2b**; ^d Zuordnung durch Vergleich mit Literaturdaten von peptidisch gebundenem Lysin [12]; ^e Zuordnung durch Vergleich mit Literaturdaten von DHB [13]; ^f Quartäres (q) bzw. tertiäres (t) C (DEPT); ^g Zuordnung durch heteronukleare Doppelresonanzexperimente.

Experimenteller Teil

Geräte

UV/VIS: Perkin-Elmer Hitachi 200. Lösungsmittel CH₃OH.

Massenspektren: Finnigan MAT HSQ-30 (EI), Kratos MS 25 RF (DEI), Finnigan 3200 (GC/MS, Säule SE 54).

NMR: Bruker AM 300 (300 MHz für ¹H, 75,5 MHz für ¹³C).

Chromatographiematerial: DC: Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck); Polygram Polyamid-6 UV₂₅₄ (Macherey & Nagel).

Säulenchromatographie: Polyamid 6 S (Riedel DeHaen), Sephadex LH-20 (Pharmacia), Polygosil 60-10 (Macherey & Nagel).

Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden besonders vorbehandelt: Isopropanol (24 h über CaCl₂ getrocknet und zweimal dest.), CH₃OH, Hexan, Ethylacetat (zweimal, die übrigen Lösungsmittel einmal dest.), H₂O (voll entsalzt und aus Quarzglas dest.), *n*-Butanol (10 h über CaCl₂ gekocht, mehrere Tage über Molekularsieb stehen gelassen, dest. und über Molekularsieb aufbewahrt), Acetylchlorid (zweimal dest., bei 5 °C unter Feuchtigkeitsausschluß aufbewahrt).

Bakterienzucht

Bei dem Bakterium (DMS Nr. 5746) handelt es sich um gramnegative, cytochromoxidasepositive

Stäbchen, das sich dadurch auszeichnet, daß es CH_3OH als einzige Kohlenstoffquelle nutzen kann. Es wurde folgendes Nährmedium mit der für das Wachstum benötigten Minimalmenge von Fe(III) verwendet: 4 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g KNO_3 , 1 g Na_2SO_4 , 100 mg CaCl_2 , 1 mg Fe(III)-citrat , 10 ml CH_3OH mit H_2O auf 1 l verdünnt (pH auf 7,2 eingestellt).

Allgemeine Arbeitsbedingungen

Wegen der leichten Zersetzung der Catecholate wurden alle catecholathaltigen Fraktionen vor intensiver Sonneneinstrahlung geschützt und sofort nach ihrer Elution im Wasserstrahlpumpenvakuum (25°C) einrotiert. Nach Trocknen im Ölpumpenvakuum wurden die Proben bei -25°C unter Feuchtigkeitsausschluß aufbewahrt.

Isolierung und Reinigung von **2a** und **3a**

Die hellbraune 5-l-Kultur wurde nach Abzentrifugieren der Zellen mit halbkonzentrierter wäßriger HCl auf pH 4 angesäuert. Nach Sättigung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wurde das Zentrifugat literweise fünfmal mit jeweils 200 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und zur Trockne eingeeengt (300 mg Extrakt/l Kulturlösung).

Die Auftrennung des Ethylacetatextraktes erfolgte durch Säulenchromatographie einer möglichst konzentrierten Lösung des Extrakts in CH_3OH an Polyamid mit CH_3OH als Elutionsmittel. Die ersten beiden Fraktionen wurden anhand ihrer UV-Absorption bei 254 nm und 310 nm, die dritte, sehr breite dünnschichtchromatographisch (Sprüh-Reagens FeCl_3) detektiert und UV/VIS-spektroskopisch auf ihren Catecholatgehalt überprüft. Die catecholathaltigen Fraktionen 2 und 3 wurden zur Trockne eingeeengt.

Die weitere Reinigung erfolgte dadurch, daß jeweils 4-mg-Portionen der Fraktionen 2 bzw. 3 an Sephadex LH-20 mit 80-proz. CH_3OH als Elutionsmittel chromatographiert wurden. Die Elution wurde anhand der UV-Absorption bei 254 nm und 310 nm verfolgt, das Eluat zur Trockne eingeeengt. Fraktion 2 enthielt **3a**, Fraktion 3 **2a**.

UV/VIS-Spektroskopie von $\text{Fe(III)}-\mathbf{3a}$

Zu einer methanolischen Lösung von **3a** (1,3 mg in 25 ml CH_3OH ; $c = 8,3 \times 10^{-5}$ mol/l) wurde so lange eine wäßrige Lösung von $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (15 mg in 25 ml H_2O ; $c = 2,2 \times 10^{-3}$ mol/l) gegeben, bis der Extinktionswert der Charge-transfer-

Bande nicht mehr meßbar zunahm. Die pH-Werte der Lösung wurden durch Zugabe von 5-proz. HCl bzw. mit 10-proz. KOH eingestellt.

Permethylierung von **3a** und **2a**

27 mg (0,04 mmol) **3a** bzw. 6 mg (0,014 mmol) **2a** wurden in 10 ml CH_3OH gelöst und durch 45-minütiges Einleiten von CH_2N_2 methyliert. Nach 30 min Stehenlassen bei R.T. wurden die Reaktionsprodukte im Wasserstrahlpumpenvakuum eingeeengt und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Die Reinigung von **3b** bzw. **2b** aus dem Methylierungsgemisch erfolgte durch präparative HPLC an Kieselgel mit Hexan/*i*-Propanol 5:3 bzw. 5:1 als Laufmittel. Die Detektion der Fraktionen erfolgte anhand der UV-Absorption bei 290 nm.

Aminosäuren-Analyse von **3b**

Alle Reaktionen wurden in Pyrex-Glasröhrchen (15 mm $\times$ 100 mm) mit teflonbeschichteten Schraubkappen durchgeführt, ohne die Proben nach den einzelnen Schritten in ein anderes Reaktionsgefäß zu überführen.

0,8–1 mg **3b** wurden in 4 ml 6 N HCl 30 h bei 110°C hydrolysiert. Nach dem Abkühlen wurde das Hydrolysat im Wasserstrahlpumpenvakuum bei 50°C zur Trockne eingeeengt. Durch wiederholtes Aufnehmen in wenig H_2O und Einengen des Rückstandes wurde die Säure azeotrop entfernt. Anschließend wurde das Hydrolysat im Ölpumpenvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde mit 1 ml einer 10-proz. (v/v) Lösung von Acetylchlorid in *n*-Butanol versetzt und 20 min bei 100°C erhitzt. Nach Einengen bei 40°C im Wasserstrahlpumpenvakuum wurde die Probe dreimal in je 0,1 ml CH_2Cl_2 aufgenommen und erneut eingeeengt, der Rückstand in 1 ml CH_2Cl_2 suspendiert und mit Hilfe von Ultraschall in Lösung gebracht. Nach Zugabe von 0,4 ml Trifluoressigsäureanhydrid wurde das Gemisch 5 min bei 150°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Probe bei Raumtemperatur im Wasserstrahlpumpenvakuum eingeeengt, in 0,1 ml CH_2Cl_2 gelöst und direkt auf die GC-Säule injiziert.

Die Derivatisierung der Referenzsubstanz (1,4-Diaminobutan) erfolgte unter den gleichen Bedingungen.

Konfigurationsbestimmungen des Lysins

Nach obiger Vorschrift hydrolysiertes **3b** wurde mit einem Gemisch von Isopropanol und Acetylchlorid (5:1, v/v) 1 h bei 110°C erhitzt. Nach Aufarbeitung wie angegeben wurde der Rückstand in

0,5 ml CH_2Cl_2 gelöst und mit 0,5 ml Trifluoressigsäureanhydrid 5 min auf 150°C erhitzt, wie angegeben eingengt und in 0,1 ml CH_2Cl_2 aufgenommen. Gaschromatographie erfolgte an einer L-Chirasil-Val-Säule.

Trifluoracetyl-L-lysin-isopropylester wurde durch Koinjektion mit authentischem Material identifiziert.

Danksagung

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie dem Fonds der Chemischen Industrie möchten wir unseren Dank für die Förderung dieser Arbeit aussprechen.

-
- [1] Teil XL der Reihe „Bakterieninhaltsstoffe“, Teil XXXIX: K. Taraz, E. Schaffner, H. Budzikiewicz, H. Korth und G. Pulverer, *Z. Naturforsch.* **45b**, 552 (1990).
 - [2] I. G. O'Brien und F. Gibson, *Biochim. Biophys. Acta* **215**, 393 (1970).
 - [3] W. R. Harris, C. J. Carrano, S. R. Cooper, S. R. Sofen, A. E. Avdeef, J. V. McArdle und K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 6097 (1979).
 - [4] W. J. Page und M. v. Tigerstrom, *J. Gen. Microbiol.* **134**, 453 (1988).
 - [5] J. L. Corbin und W. A. Bulen, *Biochemistry* **8**, 757 (1969).
 - [6] A. Chimiak und J. B. Neilands, *Structure Bonding* **58**, 89 (1984).
 - [7] T. Ito und J. B. Neilands, *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 4645 (1958).
 - [8] A. Avdeef, S. R. Sofen, T. L. Bregante und K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 5362 (1978).
 - [9] R. C. Hider, A. R. Mohd-Nor, J. Silver, I. E. G. Morrison und L. V. C. Rees, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1981**, 609.
 - [10] K. R. Leimer, R. H. Rice und C. W. Gehrke, *J. Chromatogr.* **141**, 121 (1977).
 - [11] H. Budzikiewicz, C. Djerassi und D. H. Williams, *Mass Spectrometry of Organic Compounds*, Holden-Day, San Francisco (1967).
 - [12] K. Wüthrich, *NMR in Biological Research: Peptides and Proteins*, North Holland Publ. Co., Amsterdam (1976).
 - [13] W. Bremser, L. Ernst, B. Franke, R. Gerhards und A. Hardt, *Carbon-13 NMR Spectral Data*, 3. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim 1981, Spektrum CNM 1 7134 bzw. CNM 3 5594.