

**45. Isolierung und Strukturaufklärung von Neapolitanose  
(*O*- $\beta$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]-D-glucose),  
einem neuen Trisaccharid aus den Stempeln von Gartenkrokussen  
(*Crocus neapolitanus* var.)**

von Martin Rychener<sup>1)</sup>, Peter Bigler und Hanspeter Pfander\*

Institut für Organische Chemie der Universität Bern, Freiestrasse 3, CH-3012 Bern

(24.VIII.83)

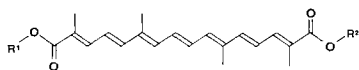
**Isolation and Structure Elucidation of Neapolitanose  
(*O*- $\beta$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]-D-glucose), a New Trisaccharide from the  
Stigmas of Garden Crocusses (*Crocus neapolitanus* var.)**

*Summary*

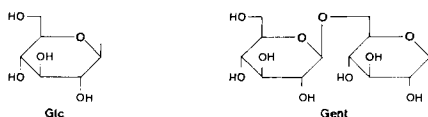
From the stigmas of *Crocus neapolitanus* var. 'Blue Bird' two new crocetin glycosyl esters were isolated. They contained a hitherto unknown trisaccharide. For the structure elucidation a homonuclear 2D-<sup>1</sup>H-NMR-shift-correlation experiment was carried out with the peracetate of the isolated trisaccharide. This experiment revealed that the carbohydrate is *O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]-D-glucose, for which we suggest the name 'neapolitanose'. The two new C<sub>20</sub>-carotenoids from *Crocus neapolitanus* are crocetin ( $\beta$ -gentiobiosyl) ( $\beta$ -neapolitanosyl) ester (**4**) and crocetin di( $\beta$ -neapolitanosyl) ester (**5**).

**1. Einleitung und Problemstellung.** – Im Hinblick auf die Abklärung der Biosynthese von Crocetin (8,8'-Diapocarotin-8,8'-disäure) wurden von uns in letzter Zeit verschiedene Arbeiten über die Pigmentzusammensetzung der Stempel von *Crocus sativus* L. (Safran) veröffentlicht [1–7]. DC- und UV/VIS-spektroskopische Voruntersuchungen [8–10] zeigten, dass verschiedene Gartenkrokus-Sorten (*Crocus neapolitanus* var.) in den Stempeln ebenfalls Crocetin-glycosylester enthalten. Aus der Sorte «Blauer Vogel» wurden durch Extrahieren mit 70proz. EtOH, Lyophilisieren, Gelfiltration an *Se-phadex G-10*, präparative DC (Kieselgel 60, AcOEt/*i*-PrOH/H<sub>2</sub>O 45:30:20) und Kristallisation neben Crocetin-di( $\beta$ -gentiobiosyl)ester (Crocin; **1**), Crocetin-( $\beta$ -D-glucosyl)( $\beta$ -gentiobiosyl)ester (**2**) und Crocetin-mono( $\beta$ -gentiobiosyl)ester (**3**) zwei neue Crocetin-glycosylester **4** und **5** isoliert. Die DC-Untersuchungen gaben Hinweise, dass **4** Gentiobiose sowie ein unbekanntes Trisaccharid und **5** nur dieses Trisaccharid [9–11] enthält.

<sup>1)</sup> Teil der Dissertation von M. Rychener, Bern, 1983.



- 1: R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=Gent  
 2: R<sup>1</sup>=Gent, R<sup>2</sup>=Glc  
 3: R<sup>1</sup>=Gent, R<sup>2</sup>=H  
 4: R<sup>1</sup>=Gent, R<sup>2</sup>=Trisaccharid  
 5: R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=Trisaccharid



In der vorliegenden Arbeit werden die Isolierung, die Charakterisierung und die Strukturaufklärung dieses Trisaccharides **6** beschrieben. Für die Strukturaufklärung können dabei u.a. die in der vorangehenden Mitteilung [12] veröffentlichten <sup>1</sup>H-NMR-Daten herangezogen werden.

**2. Resultate und Diskussion.** – *Isolierung des Trisaccharides 6.* Die anlässlich der Ernte 1982 aus der eigens dafür angelegten Pflanzung erhaltenen Stempel wurden vorerst lyophilisiert, wobei sie 84% ihres ursprünglichen Gewichts in Form von H<sub>2</sub>O und anderen leichtflüchtigen Verbindungen verloren. Dabei wurden die Zellwände zum Teil aufgebrochen, so dass die Zellinhaltsstoffe danach leichter extrahiert werden konnten. Nach dem Entfernen von apolaren Bestandteilen durch Extraktion mit Et<sub>2</sub>O wurden die Stempel mit 70proz. EtOH extrahiert. Um die freien niederen Kohlenhydrate zu entfernen, wurde die rohe wässrige Extraktlösung dialysiert<sup>2)</sup>.

Nach Lyophilisieren der Dialysierschlauch-Inhalte wurde ein oranger pulveriger Extrakt in einer Ausbeute von 19% (bzgl. getrockneter Stempel) erhalten. Der gesamte Extrakt wurde mit NaOMe/MeOH verseift. Dass das dabei freigesetzte Trisaccharid ausschliesslich aus den Pigmenten stammte, konnte im DC gezeigt werden, indem **6** vor der Verseifung nicht nachweisbar war. Die wässrige Phase enthielt nach dem Aufarbeiten das Trisaccharid **6** aus **4** und **5**, Gentiobiose aus **1–4** sowie Reste von Glucose und Fructose.

Aus dem so erhaltenen Zuckersirup wurde durch Säulenchromatographie (3mal an Kieselgel 60, AcOEt/*i*-PrOH/H<sub>2</sub>O 45:30:20) das Trisaccharid **6** als einheitliches gelbliches Produkt isoliert. Die Acetylierung ergab nach chromatographischer Reinigung (Kieselgel 60, Toluol/AcOEt/*i*-PrOH 40:10:1) ein  $\alpha/\beta$ -Gemisch des Trisaccharid-peracetates **7** ( $\alpha/\beta = 1:1$ ), welches sich chromatographisch (Kieselgel 60 (0,04–0,063 mm), Toluol/AcOEt/*i*-PrOH 30:10:1) in die beiden Epimeren **7a** und **7b** in Mengen von ca. 20 mg trennen liess. Das  $\alpha$ -Anomere wurde aus EtOH umkristallisiert, Schmp. 188–190°, während das  $\beta$ -Anomere als farbloses Glas isoliert werden konnte.

<sup>2)</sup> Die Crocetin-glycosylester wurden vom verwendeten Dialysierschlauch nicht vollständig zurückgehalten, so dass ein doppelter Dialysierschlauch angewendet wurde. Dadurch war der Verlust an den interessierenden Carotinoiden verhältnismässig klein. Die freien Kohlenhydrate, vor allem Glucose und Fructose, wanderten fast vollständig in das die Schläuche umgebende grosse Volumen von dest. Wasser, das während der Dialyse noch zweimal ausgewechselt wurde.

*Charakterisierung.* Um die im Trisaccharid enthaltenen Untereinheiten (Mono- und Disaccharid-Bruchstücke) zu bestimmen, wurde ein kleiner Anteil desselben partiell und ein anderer total hydrolysiert. Die Bedingungen zur sauren Hydrolyse wurden aufgrund verschiedener Literaturangaben gewählt [13–15] und die Hydrolysate mittels DC untersucht (Vergleich mit Fructose, Mannose, Glucose, Galactose, Gemisch dieser vier Monasaccharide, Arabinose, Rhamnose, Gentiobiose und Saccharose). Demnach ist **6** nur aus Glucoseeinheiten aufgebaut. Aus den Disaccharidbruchstücken im partiell hydrolysierten **6** konnten Hinweise auf Gentiobiose sowie eine weitere, nicht identifizierte Diglucose gewonnen werden.

Im MS deuten die charakteristischen Fragmente des Peracetates **7a** bei  $m/z$  619 und 331 auf Di- und Monohexose-Bruchstücke hin [16] [17], ebenso die um 60 Einheiten ( $-\text{HOAc}$ ) kleineren Fragmente bei  $m/z$  559 und 271. Das Fragment mit der höchsten Masse bei  $m/z$  965 ist das einfach deprotonierte Molekelion und auch die Bruchstücke bei  $m/z$  907 ( $M^+ - \text{OAc}$ ) und 847 ( $907 - \text{HOAc}$ ) stehen mit der vorgeschlagenen Struktur eines Trihexoseperacetates im Einklang. Über die Art der Hexosen sowie deren Verknüpfungsstellen kann allerdings aus dem Massenspektrum allein nichts gelesen werden.

*$^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Strukturklärung des Triglycose-peracetats **7**.* Das 400-MHz- $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der peracetylierten Triglycose **7 $\beta$**  lässt aufgrund der in [12] aufgestellten «Hochfeldverschiebung-Regel» sofort erkennen, dass im Molekül eine  $\beta(1\rightarrow6)$ -Verknüpfung vorhanden ist. Die Signallage der einen 6-ständigen Methylengruppe bei 3,52 (*dd*) und 3,94 ppm (*dd*), also bei vergleichsweise hohem Feld, zeigt, dass diese Methylengruppe einen Glucosylrest trägt. Ebenso ist durch das bei ziemlich hohem Feld erscheinende, gut aufgelöste Signal (*dd* bei 3,77 ppm) eines 2-ständigen Protons die zweite Verknüpfungsstelle als  $\beta(1\rightarrow2)$  zu charakterisieren. Dies wurde mit einem Entkopplungsexperiment (100 MHz) zusätzlich bewiesen. Wird nämlich bei 5,61 ppm ( $\text{H}-\text{C}(1)$ ) eingestrahlt, so kann eine Vereinfachung des Signals von  $\text{H}-\text{C}(2)$  zu einem *d* beobachtet werden.

Es bleibt somit noch die Frage offen, ob die vorliegende Triglycose **6** linear oder verzweigt ist. Die zutreffende Struktur konnte mit einem homonuklearen 2D- $^1\text{H-NMR}$ -Verschiebungskorrelationsexperiment von **7 $\beta$**  (vgl. dazu [18–23] ermittelt wer-

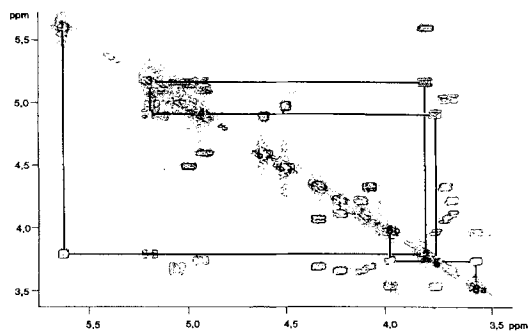


Fig. 1. 2D- $^1\text{H-NMR}$ -Verschiebungskorrelation von **7 $\beta$** . Mit Korrelationsdiagramm für die zentrale Glucose-Einheit (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

den. In *Fig. 1* werden, ausgehend von der bekannten Signallage von H-C(1) bei 5,61 ppm der Reihe nach die chemischen Verschiebungen der Protonen der ersten (in 1-Stellung einen O-Acetylrest tragenden) Glucoseeinheit ermittelt. Es zeigt sich dabei, dass sowohl die Signale von H-C(2) als auch diejenigen von H-C(6a)/H-C(6b) eine bemerkenswerte Hochfeldverschiebung aufweisen. Folglich müssen beide Verknüpfungen von derselben zentralen Glucoseeinheit ausgehen. Ausgehend von den Signalen der beiden übrigen glucosidischen anomeren Protonen (H-C(1'), H-C(1'')) können aus dem Diagramm des 2D-Experiments analog die Signale der beiden andern Glucoseeinheiten herausgelesen werden. Dabei ergibt sich eine Zuordnung der chemischen Verschiebungen gemäss *Fig. 2* und *Tab.* Ob eine solche Signalgruppe dem 2- oder dem 6-ständigen Glucosylrest angehört, kann mit diesem Experiment allein nicht bestimmt werden, doch dies ist für die Strukturaufklärung von Verbindung **7β** nicht notwendig.

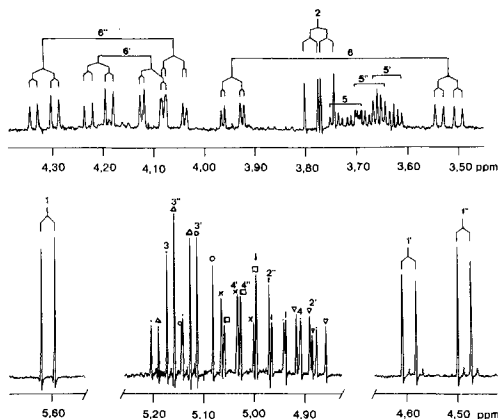


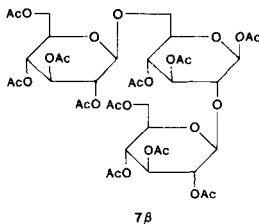
Fig. 2. Ausschnitte aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von **7β**

Tab.  $^1\text{H-NMR}$ -Verschiebungen [ppm] und charakteristische Kopplungskonstanten [Hz] von **7β** (TMS,  $\text{CDCl}_3$ )

	H-C	H-C'	H-C''
H-C(1, 1' bzw. 1'')	5,61,	4,59, $J = 8,0$	4,49, $J = 8,0$
H-C(2, 2' bzw. 2'')	3,77, $J = 9,5$	4,89, $J = 9,5$	4,97, $J = 9,5$
H-C(3, 3' bzw. 3'')	5,17, $J = 9,5$	5,11, $J = 9,5$	5,16, $J = 9,5$
H-C(4, 4' bzw. 4'')	4,91, $J = 10,0$	5,04, $J = 10,0$	5,03, $J = 10,0$
H-C(5, 5' bzw. 5'')	3,72	3,64	3,67
H-C(6a, 6a' bzw. 6a'')	3,52	4,10	4,06
H-C(6b, 6b' bzw. 6b'')	3,94	4,21	4,32

Die grossen *trans*-Kopplungen von 9,5–10,0 Hz zwischen den 2-, 3-, 4- und 5-ständigen Protonen beweisen zudem, dass es sich bei allen drei Monosaccharid-Einheiten tatsächlich um Glucose handelt, was die Ergebnisse der Hydrolyse-Experimente bestätigt.

Die isolierte, peracetylierte Triglycose **7β** ist somit in ihrer Struktur aufgeklärt. Es handelt sich dabei um das Peracetat des verzweigten Trisaccharids *O*-β-D-Glucopyra-



nosyl-(1→2)-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→6)]-D-glucose. Das entsprechende nicht-acetylierte Trisaccharid **6** ist unseres Wissens und nach [23] bisher in der Natur nicht gefunden worden. Auch über das Vorkommen von **6** als Kohlenhydratkomponente eines Glycosids oder eines Glycosylesters [24] ist nichts bekannt. Wir schlagen deshalb für das neue Trisaccharid den Namen «Neapolitanose» vor. Die einleitend erwähnten Crocetin-glycosylester sind somit Crocetin-(β-gentiobiosyl)(β-neapolitanosyl)ester (**4**) und Crocetin-di(β-neapolitanosyl)ester (**5**).

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung sowie der Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel, für ihre Unterstützung dieser Arbeit. Der Firma Bruker-Spectrospin danken wir für die Überlassung des AM-400-Spektrometers.

#### Experimenteller Teil

*Allgemeines.* S. [12]. Ausserdem: Sämtliche Operationen mit Crocetinderivaten und Extrakten wurden unter Lichtausschluss und unter Ar durchgeführt. Die DC-Analysen der Hydrolyse-Experimente erfolgten auf Kieselgel-60-Fertigplatten (Merck) durch 3mal Entwickeln in MeCN/H<sub>2</sub>O 85:15. Die Kohlenhydrate (KH.) wurden durch Eintauchen in KH.-Nachweisreagenz und 15 min. Erhitzen auf 105° sichtbar gemacht. KH.-Nachweisreagenz: 12 g Anilin (dest. über SnCl<sub>2</sub>), 12 g Diphenylamin (puriss.; Fluka AG, Schweiz) und 540 ml MeOH wurden gemischt und langsam mit 60 ml 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> versetzt (im Dunkeln aufbewahren). Das 2D-<sup>1</sup>H-NMR-Verschiebungskorrelationsexperiment (COSY) wurde bei 400 MHz auf einem AM-400-Gerät (Bruker-Spectrospin) durchgeführt. Ungefähr 5 mg Substanz wurden in 0,4 ml CDCl<sub>3</sub> mit TMS als internen Standard gelöst. Die Messung erfolgte in Quadratur-Detektion. Zur Unterdrückung der Diagonalspikes wurde die Sequenz 90°-t<sub>1</sub>-45°-t<sub>2</sub> eingesetzt. Es wurden 256 Spektren zu 1024 Datenpunkten registriert. Die Transformationsgrösse war 512 × 1024. Vor der Fourier-Transformation wurde entlang der beiden Zeitachsen mit «sinebell» gewogen. Es wurde bloss der Ausschnitt der Ringprotonen ausgeschrieben und das Korrelationsdiagramm für die zentrale Glucose-Einheit eingezeichnet.

*Lyophilisation, Extraktion und Dialyse.* Bei einer Anfangstemperatur von -30° wurden 415 g Gartenkrokus-Stempel lyophilisiert. Nach 48 Std. wurden bei einem Endvakuum von 0,01 Torr 65,9 g trockene, heuartige Stempel erhalten, welche leicht zermörsert wurden. Mit 2mal je 600 ml Et<sub>2</sub>O wurden 40 g dieser Stempel 3 Std. entfettet. Der Et<sub>2</sub>O wurde 2mal mit je 150 ml H<sub>2</sub>O gewaschen, welches zur Herstellung des nachfolgend verwendeten 70% EtOH eingesetzt wurde. Die derart vorbehandelten Stempel wurden 1mal mit 1000 ml und 1mal mit 700 ml 70% EtOH je 20 Std. extrahiert. Die vereinigten Filtrate wurden auf ca. 400 ml eingengt und mit 2mal je 150 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ausgezogen. Die H<sub>2</sub>O-Phase wurde auf 150 ml eingengt und in einen Dialysierschlauch (Medigell International, London) gefüllt, über welchen ein zweiter, etwas weiterer Schlauch gezogen wurde. Dieser wurde mit H<sub>2</sub>O gefüllt. Die Dialyse erfolgte bei 0-2° gegen ein grosses Volumen H<sub>2</sub>O, welches alle 8 Std. gewechselt wurde. Nach Beendigung der Dialyse nach 24 Std. wurde der Inhalt beider Schläuche vereint, auf 100 ml eingengt und lyophilisiert. Ausbeute: 7,79 g oranges Pulver.

*Versäufung.* Der pulverisierte Extrakt wurde in 210 ml abs. MeOH gelöst und mit 35 ml Lösung von 1,0 g Na in 100 ml trockenem MeOH versetzt und 0,5 Std. bei RT. gerührt, wobei eine Ausfällung entstand. Es wurde mit Amberlite IR-120 neutralisiert, filtriert, der Ionentauscher mit MeOH und H<sub>2</sub>O nachgewaschen und die Lösung i. RV. eingedampft. Der Rückstand wurde zwischen Et<sub>2</sub>O und H<sub>2</sub>O verteilt, die H<sub>2</sub>O-Phase 1mal mit

Et<sub>2</sub>O und 2mal mit n-BuOH ausgezogen und erneut i. RV. eingedampft. Ausbeute: 3,58 g gelbbrauner Sirup, welcher neben dem gewünschten **6** noch grössere Mengen Glucose, Fructose, Gentiobiose und andere Kohlenhydrate enthält. Der Sirup wurde 3mal an 120 g Kieselgel *60* mit AcOEt/i-PrOH/H<sub>2</sub>O 45:30:20 chromatographiert, wobei **6** von sämtlichen Verunreinigungen und Begleitstoffen abgetrennt werden konnte. Nach dem Trocknen bei 0,01 Torr ergaben sich 194,1 mg gelblicher, glasartiger Sirup.

*Acetylierung.* Das isolierte **6** wurde mit 7 ml Pyridin/Ac<sub>2</sub>O 4:3 und 20 mg 4-(*N,N*-Dimethylamino)pyridin versetzt und 5 Tage bei RT. gerührt, wobei das harzige Produkt sehr langsam in Lösung ging. Dann wurde mit 50 ml Eis/H<sub>2</sub>O versetzt, 2 Std. gerührt, mit 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert, die CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Phase mit H<sub>2</sub>O, ges. NaHCO<sub>3</sub> und wieder mit H<sub>2</sub>O gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und i. RV. eingedampft: 263,8 mg brauner Sirup. Nach Chromatographie an Kieselgel *60* mit Toluol/AcOEt/i-PrOH 40:10:1 wurden 119,3 mg **7** als fast farblosler Sirup erhalten, **7a/7b** ca. 1:1 (60-MHz-<sup>1</sup>H-NMR). Zur Auftrennung wurde an 50 g Kieselgel *60* (0,040–0,063 mm) mit Toluol/AcOEt/i-PrOH 30:10:1 chromatographiert. Bei einer Fraktionsgrösse von 5 ml wurden der Reihe nach 16 Fraktionen **7b**, 18 Mischfraktionen und 20 Fraktionen **7a** erhalten.

O-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-O-[(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-(1→6)]-1,3,4-tri-O-acetyl-α-D-glucopyranose (= α-Neapolitanose-peracetat; **7a**). Die Kristallisation aus abs. EtOH ergab nach Trocknen bei 0,01 Torr 27,4 mg chromatographisch einheitliches **7a**, Schmp. 188–109°, R<sub>f</sub> 0,33 (Kieselgel *60*, Toluol/AcOEt/i-PrOH 20:10:2). MS: u.a. 965 (*M*<sup>+</sup> – 1), 907, 847, 619 (1), 605, 559, 331 (18), 169 (24), 109 (16).

O-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-O-[(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-(1→6)]-1,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranose (= β-Neapolitanose-peracetat; **7b**). Es konnte keine Kristallisation erzielt werden. Nach 4 Std. Trocknen bei 0,01 Torr wurden 15,9 mg chromatographisch einheitliches, glasartiges **7b** erhalten. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): s. Tab.

*Hydrolyse von 6.* Für die totale Hydrolyse wurde eine kleine Probe von **6** in 3 ml 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5 Std. am Rückfluss gekocht. Darauf wurde abgekühlt, mit Amberlite IR A-410 (OH-Form) neutralisiert, filtriert, mit H<sub>2</sub>O nachgespült und auf 1 ml eingengt. Zum Auftragen bei der DC wurde die Probe mit 1 ml EtOH verdünnt. Für die partielle Hydrolyse wurde eine analoge Probe in 3% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nur 0,5–1 Std. am Rückfluss gekocht und analog aufgearbeitet [13–15].

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] F. Wittwer, Dissertation, Bern 1976.
- [2] H. Pfander & F. Wittwer, Helv. Chim. Acta 58, 1608 (1975).
- [3] H. Pfander & F. Wittwer, Helv. Chim. Acta 58, 2233 (1975).
- [4] H. Schurtenberger, Dissertation, Bern 1979.
- [5] H. Pfander, H. Schurtenberger & V. R. Meyer, Chimia 34, 179 (1980).
- [6] H. Pfander & H. Schurtenberger, Phytochemistry 25, 1039 (1982).
- [7] H. Pfander & M. Rychener, J. Chromatogr. 234, 443 (1982).
- [8] H. Pfander, Pure Appl. Chem. 47, 121 (1976).
- [9] M. Rychener, Lizentiatsarbeit, Bern 1979.
- [10] H. Pfander & M. Rychener, 6th Int. Symp. of Carotenoids, Poster Session, Liverpool, July 26–31, 1981.
- [11] M. Rychener, Dissertation, Bern 1983.
- [12] M. Rychener, P. Bigler & H. Pfander, Helv. Chim. Acta 67, 378 (1984).
- [13] B. Gestetner, Phytochemistry 10, 2221 (1971).
- [14] A. Bianco, M. Guiso, C. Iavarone, P. Passacantilli & C. Trogolo, Phytochemistry 20, 465 (1981).
- [15] H. W. Liu & K. Nakanishi, Tetrahedron 38, 513 (1982).
- [16] K. Biemann, D. C. DeJong & K. H. Schnoes, J. Am. Chem. Soc. 85, 1763 (1963).
- [17] D. C. DeJongh & K. Biemann, J. Am. Chem. Soc. 85, 2289 (1963).
- [18] H. Kessler & D. Ziessow, Nachr. Chem. Techn. Lab. 30, 488 (1982).
- [19] A. Kumar, G. Wagner, R. R. Ernst & K. Würthrich, Biochem. Biophys. Res. Commun. 96, 1156 (1980).
- [20] A. Bax, R. Freeman & G. A. Morris, J. Magn. Reson. 42, 164 (1981).
- [21] G. Wagner, A. Kumar & K. Würthrich, Eur. J. Biochem. 114, 375 (1981).
- [22] A. D. Bain, R. A. Bell, J. R. Everett & D. W. Hughes, Can. J. Chem. 58, 1947 (1980).
- [23] R. W. Bailey & J. B. Pridham, Adv. Carbohydr. Chem. 17, 121 (1962).
- [24] M. Läderach, Dissertation, Bern 1979.