



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.<sup>3</sup>: C 12 K 1/55  
A 61 K 35/74

**Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein**

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

**643 591**

|                                  |                      |                |                                                                                           |
|----------------------------------|----------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| ⑳① Gesuchsnummer:                | 6589/78              | ㉔③ Inhaber:    | American Cyanamid Company, Wayne/NJ (US)                                                  |
| ㉔② Anmeldungsdatum:              | 16.06.1978           |                |                                                                                           |
| ㉔③ Priorität(en):                | 20.06.1977 US 807867 | ㉔⑦ Erfinder:   | Martin Roy Hertz, Pearl River/NY (US)<br>John Henry Edward James Martin, New City/NY (US) |
| ㉔④ Patent erteilt:               | 15.06.1984           |                |                                                                                           |
| ㉔⑤ Patentschrift veröffentlicht: | 15.06.1984           | ㉔⑦④ Vertreter: | A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG,<br>Patentanwälte, Basel                           |

⑤④ **Antibiotikum BL580 ZETA und Verfahren zu seiner Herstellung.**

⑤⑦ Das Antibiotikum BL 580 Zeta ist eine organische Säure, gekennzeichnet durch physikalische Daten und Analyse und wirksam gegen Coccidiose. Hergestellt wird es durch Züchtung von *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 11108 unter submersen aeroben Bedingungen.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Antibiotikum BL580 ZETA, freie Säure, gekennzeichnet durch

(a) anticoccidiale Wirksamkeit und praktisch reine kristalline Form,

(b) einen Schmelzpunkt von 105 bis 107 °C,

(c) folgende Elementaranalysenwerte: C 63,99, H 9,43%

(d) eine optische Drehung  $[\alpha]_D^{20} = +7^\circ \pm 2^\circ$

(C=0,9 in Methanol),

(e) das in Figur 4 dargestellte charakteristische Infrarotabsorptionsspektrum.

2. Antibiotikum BL580 ZETA, Natriumsalz, gekennzeichnet durch

(a) anticoccidiale Wirksamkeit und praktisch reine kristalline Form,

(b) einen Schmelzpunkt von 162 °C,

(c) folgende Elementaranalysenwerte: C 60,97, H 8,69, Na 2,70%,

(d) eine optische Drehung  $[\alpha]_D^{20} = -3^\circ \pm 2^\circ$

(c=0,94 in Methanol),

(e) das in Figur 1 dargestellte charakteristische Infrarotabsorptionsspektrum,

(f) das in Figur 2 dargestellte charakteristische  $^{13}\text{C}$  magnetische Kernresonanzspektrum,

(g) das in Figur 3 dargestellte charakteristische magnetische Protonenresonanzspektrum.

3. Verfahren zur Herstellung des Antibiotikums BL580 ZETA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 11 108 in einem wässrigen Nährmedium, das assimilierbare, Kohlehydrate, Stickstoff und anorganische Salze liefernde Stoffe enthält, unter submersen aeroben Bedingungen gezüchtet werden, bis das Medium eine beträchtliche Aktivität zeigt, und das Antibiotikum BL580 ZETA aus dem Medium gewonnen wird.

Die Erfindung bezieht sich auf ein neues Antibiotikum, das als BL580 ZETA bezeichnet wird, und auf ein Verfahren zu seiner fermentativen Erzeugung und zu seiner Gewinnung. Im Rahmen der Erfindung liegt auch das Antibiotikum BL580 ZETA in verdünnter Form, als Rohkonzentrat und in reiner kristalliner Form. Aufgrund seiner Wirksamkeit als anticoccidiales Mittel und seiner chemischen und physikalischen Eigenschaften unterscheidet sich dieses neue Antibiotikum von früher beschriebenen Antibiotika.

Das erfindungsgemäße neue Antibiotikum ist eine organische Säure und deshalb zur Bildung von Salzen mit Alkalitionen befähigt. Durch Vermischen des Antibiotikums als freie Säure mit stöchiometrischen Mengen an Alkalitionen, zweckmässigerweise in einem neutralen Lösungsmittel, werden Salze mit beispielsweise Natrium-, Kalium- und Ammoniumionen und ähnlichen Kationen gebildet. Die Alkalisalze von BL580 ZETA sind im allgemeinen kristalline Feststoffe, die in Wasser verhältnismässig unlöslich, aber in den meisten üblichen organischen Lösungsmitteln, wie Methanol, Ethylacetat, Aceton, Chloroform, Heptan, Ether und Benzol, löslich sind.

Das neue, als BL580 ZETA bezeichnete Antibiotikum wird bei der Züchtung eines neuen Mutantenstamms von *Streptomyces hygroscopicus* gebildet, der durch Behandlung eines aus natürlicher Selektion hervorgegangenen Einzelkoloniesolats von *S. hygroscopicus* NRRL 5647 mit N-Methyl-N'-nitro-N''-nitrosoguanidin erhalten wird. Eine lebensfähige Kultur des neuen Mutantenstamms ist am 25. März 1977 bei

dem Culture Collection Laboratory, Northern Regional Research Center, United States Department of Agriculture, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604 (USA) hinterlegt und unter der Zugänglichkeitsnummer NRRL 11108 in die zeitlich unbegrenzte Sammlung dieses Instituts aufgenommen worden.

Die Art des Wachstums und die physiologischen und morphologischen Merkmale von NRRL 11108 sind weitgehend die gleichen wie die von NRRL 5647 (bestimmt von Dr. H.D. Tresner, Lederle Laboratories Division, American Cyanamid Company, Pearl River, New York) mit der Ausnahme, dass NRRL 11108 auf den meisten Medien nur wenig oder keine Sporen bildet. Eine allgemeine Beschreibung von NRRL 5647 findet sich in US-PS 3 812 249.

Es sei ausdrücklich darauf hingewiesen, dass zum Zwecke der Erzeugung von BL580 ZETA die Erfindung nicht auf diesen bestimmten Mikroorganismus oder auf andere Mikroorganismen beschränkt ist, die den Wachstumseigenschaften und mikroskopischen Kennzeichen von NRRL 11108 voll entsprechen. Vielmehr ist beabsichtigt, die Verwendung von Mutanten einzuschliessen, die aus NRRL 11108 durch die verschiedenen üblichen Mittel, wie Röntgenbestrahlung, Ultraviolettbestrahlung oder Behandlung mit Stickstofflost, Senfölen, Phagen und dergleichen erzeugt worden sind.

Das Antibiotikum BL580 ZETA ist ein wirksames Mittel gegen Coccidien, was durch die folgenden in-vivo-Tests nachgewiesen worden ist, bei welchen die im folgenden beschriebene Geflügelnahrung verwendet wird.

|    |                                        |       |
|----|----------------------------------------|-------|
| 30 | Vitamin-Aminosäure-Vormischung         | 0,5%  |
|    | Spurenmineralien                       | 0,1%  |
|    | Natriumchlorid                         | 0,3%  |
|    | Dicalciumphosphat                      | 1,2%  |
|    | Kalkmehl                               | 0,5%  |
| 35 | stabilisiertes Fett                    | 4,0%  |
|    | dehydratisierte Alfalfa (17% Protein)  | 2,0%  |
|    | Mais-Gluten-Mehl (41% Protein)         | 5,0%  |
|    | Menhaden-Fischmehl (60% Protein)       | 5,0%  |
|    | Sojabohnenöl, getrocknet (44% Protein) | 30,0% |
| 40 | feingemahlener gelber Mais, ad         | 100 % |

Die Vitamin-Aminosäure-Vormischung der obigen Geflügelnahrung wird aus folgender Zubereitung hergestellt. Die Mengenangaben beziehen sich auf Einheiten je Kilogramm der Geflügelnahrung:

|    |                               |             |
|----|-------------------------------|-------------|
|    | butyliertes Hydroxytoluol     | 125 mg      |
|    | dl-Methionin                  | 500 mg      |
|    | Vitamin A                     | 3300 I.U.   |
| 40 | Vitamin D <sub>3</sub>        | 1100 I.C.U. |
|    | Riboflavin                    | 4,4 mg      |
|    | Vitamin E                     | 2,2 I.U.    |
|    | Niacin                        | 27,5 mg     |
|    | Pantothensäure                | 8,8 mg      |
| 45 | Cholinchlorid                 | 500 mg      |
|    | Folsäure                      | 1,43 mg     |
|    | Menadion-Natriumbisulfat      | 1,1 mg      |
|    | Vitamin B <sub>12</sub>       | 11 mcg      |
| 50 | feingemahlener gelber Mais ad | 5 g         |

Ein Mischinokulum aus 5000 sporulierten Oocysten von *Eimeria acervulina* und Oocysten von *Eimeria tenella*, das zur Erzielung einer Mortalität von 85 bis 100% im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen ausreicht, wird durch direkte Inokulation an Gruppen von 7 Tage alten Küken verabreicht. Die Küken haben während der gesamten Testdauer freien Zugang zu der Geflügelnahrung und zu Wasser. 2 Tage nach der Inokulierung wird den verschiedenen Gruppen von Küken

medizinhaltiges Futter aus der Geflügelernährung und BL580 ZETA in unterschiedlichen Mengen gegeben. 10 Tage nach dem Inokulieren werden die Tests beendet. Die Küken werden gewogen und getötet, und ihre Intestinaltrakte werden auf Schäden untersucht. Die Ergebnisse dieses Tests sind in Tabelle I wiedergegeben. Diese Ergebnisse lassen erkennen,

dass 80% der infizierten Küken überleben, wenn sie 60 ppm BL580 ZETA in ihrem Futter erhalten. Diese Ergebnisse zeigen ferner eine signifikante Unterdrückung von Schäden durch *Eimeria tenella* und *Eimeria acervulina*, wenn 30 oder 60 ppm BL580 ZETA den infizierten Küken in ihrer Nahrung verabreicht werden.

Tabelle I

| Konzentration von BL580 ZETA in der Nahrung, ppm | Anzahl der Tiere zu Beginn | Überlebende, Prozent | Prozentsatz der Tiere mit verminder-ten Schäden<br><i>Eimeria tenella</i> | <i>Eimeria acervulina</i> |
|--------------------------------------------------|----------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| 0                                                | 40                         | 15                   | 0                                                                         | 0                         |
| 60                                               | 10                         | 80                   | 80                                                                        | 90                        |
| 30                                               | 10                         | 50                   | 10                                                                        | 50                        |

Die Züchtung des Mikroorganismus *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 11108 kann in einer grossen Zahl verschiedener flüssiger Kulturmedien durchgeführt werden. Zu Medien, die sich für die Erzeugung des Antibiotikums BL580 ZETA eignen, gehören solche mit folgenden Bestandteilen: assimilierbare, Kohlenstoff enthaltende Stoffe, wie Stärke, Zucker, Melasse und Glycerin, assimilierbare stickstoffhaltige Stoffe, wie Protein, Proteinhydrolysat, Polypeptide, Aminosäuren, Maisquellwasser, und anorganische Kationen und Anionen, wie Kalium, Natrium, Calcium, Sulfat, Phosphat und Chlorid. Spurenelemente, wie Bor, Molybdän und Kupfer, werden als Verunreinigungen anderer Bestandteile des Mediums eingeführt. In Tanks und Flaschen wird die Belüftung durch Eindringen von steriler Luft in das Fermentationsmedium oder auf seine Oberfläche bewirkt. In Tanks wird für weitere Bewegung durch einen mechanischen Rührer gesorgt. Schaumverhütungsmittel, zum Beispiel 1% Octadecanol in Specköl, können nach Bedarf zugesetzt werden.

Ein Schüttelkolbeninokulum von *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 11108 kann durch Beimpfen von 100 ml Anteilen sterilen flüssigen Mediums in 500 ml Kolben mit Abschabungen oder Abwaschungen von Sporen einer Agar-Schräge der Kultur hergestellt werden. Üblicherweise wird folgendes Medium verwendet:

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Sojamehl          | 1,0%  |
| Glucose           | 2,0%  |
| Maisquellwasser   | 0,5%  |
| CaCO <sub>3</sub> | 0,3%  |
| Wasser, auf       | 100 % |

Die Inkubation der Kolben erfolgt mit Vorteil bei einer Temperatur von 25 bis 29 °C, vorzugsweise bei 28 °C, und unter kräftiger Bewegung auf einer Rundschtüttelvorrichtung während 48 bis 96 Stunden. Beispielsweise werden dann zwei Anteile von je 100 ml dieses Inokulums zum Beimpfen von 12 l des gleichen sterilen Mediums in einer 20 l-Flasche verwendet. Dieses Inokulum wird mit Vorteil unter Rühren und Belüftung mit steriler Luft 36 bis 64 Stunden bei 25 bis 29 °C, vorzugsweise bei 28 °C, inkubiert. Dann kann es zum Beimpfen von 300 l des gleichen sterilen Mediums in einem Fermentationstank verwendet werden. Anschliessend kann unter Bewegung und Belüftung mit steriler Luft z.B. 36 bis 64 Stunden bei 25 bis 29 °C, vorzugsweise bei 28 °C, inkubiert werden. Das so erhaltene Inokulum kann zum Beimpfen von 3000 l eines sterilen Mediums in einem 4000 l fassenden Fermentationstank verwendet werden. Dieses Medium kann beispielsweise folgende Zusammensetzung haben:

|                 |      |
|-----------------|------|
| Maisquellwasser | 0,5% |
| Sojamehl        | 1,0% |
| Maisstärke      | 4,0% |

|                   |       |
|-------------------|-------|
| CaCO <sub>3</sub> | 0,1%  |
| Wasser, auf       | 100 % |

Dieses Medium wird im allgemeinen 100 bis 200 Stunden bei einer Temperatur von 27 bis 32° unter Bewegung durch einen Rührer und Belüftung bei einem Verhältnis von 0,4 bis 0,8 l Luft je 1 Medium und Minute fermentiert. Üblicherweise wird ein Entschäumungsmittel, wie Hodag<sup>(R)</sup> FD82, in einem Verhältnis von etwa 3,5 Liter je 1000 Liter Medium zugegeben.

Die Isolierung des gebildeten Antibiotikums aus dem Fermentationsmedium kann mit Vorteil wie folgt durchgeführt werden:

Nach dem Ende der Fermentation wird die erhaltene Maische, die das Antibiotikum BL580 ZETA enthält, mit etwa der Hälfte ihres Volumens Ethylacetat versetzt und 2 bis 3 Stunden gerührt. Nach Zugabe von etwa 8% Diatomeenerde wird die Mischung durch eine Filterpresse mit Platte und Rahmen filtriert. Der Rückstand wird auf der Presse mit Ethylacetat gewaschen. Die Ethylacetatextrakte werden vereinigt und in einer Destillationsvorrichtung bis zu einem Sirup eingedunstet. Dieser Sirup wird mit dem doppelten seines Volumens an n-Heptan gerührt und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Die überstehende Flüssigkeit wird abgossen und bis zu einem gummiartigen Konzentrat eingedunstet, das mit 10 l Methanol behandelt und mehrere Stunden mit Hilfe von Trockeneis gekühlt wird. Die Mischung wird durch Sinterglas mit einer Diatomeenerdeschicht filtriert und mit kaltem Methanol gewaschen. Die Methanollösung wird im Vakuum bis zu einem sirupartigen Rückstand eingedunstet.

Es wird eine chromatographische Säule mit Aktivkohle in einem Verhältnis von etwa 1 l Kohle je 50 g Beschickung hergestellt. Der getrocknete Rückstand wird in Methylenchlorid in einem Verhältnis von 40 g/l gelöst und auf die Säule aufgebracht. Das Methylenchlorideluat wird als eine Fraktion aufgefangen und bis zu einem Sirup eingedunstet. Der Rückstand wird mit Methanol vermischt und 15 Minuten in einem Kühlraum mit Trockeneis zur Verminderung der Temperatur auf -10 °C belassen. Danach wird das verfestigte Öl abfiltriert, und die Methanollösung wird im Vakuum eingedunstet, wodurch ein Öl erhalten wird. Dieses Öl wird in der kleinstmöglichen Menge an Methylenchlorid gelöst, mit Kieselgel versetzt, vom Lösungsmittel befreit und auf eine trockene Kieselgelsäule aufgebracht. Die Säule wird mit Ethylacetat: Benzol (1:1) entwickelt. Dann lässt man sie abtropfen. Der Säulenabschnitt, der das Material mit einem Rf-Wert von 0,10 bis 0,45 enthält, wird herausgeschnitten und in Ethylacetat: Methylenchlorid: Methanol (2:2:1, Vol.) aufgeschlämmt. Diese Mischung wird filtriert, mit weiterem Lösungsmittelgemisch gewaschen und im Vakuum zur Trockne eingedampft.

Aus n-Heptan: Methanol: Ethylacetat: Wasser (3000:1500:20:40, Vol.) wird ein zweiphasiges System herge-

stellt. Diatomeenerde, Celatom<sup>(R)</sup> (Eagle-Picher Industries, Cincinnati, Ohio) wird mit der unteren Phase dieses Systems in einem Verhältnis von etwa 2000 g/1650 ml vermischt und in Anteilen in eine Säule mit einem Innendurchmesser von 7,5 cm eingefüllt. Die Beschickung wird als Mischung von Diatomeenerde und unterer Phase mit lyophilisiertem Produkt aufgebracht. Die beschickte Säule wird mit der oberen Phase entwickelt, und es werden Fraktionen aufgefangen. Die Aktivität wird durch Dünnschichtchromatographie von ausgewählten Fraktionen unter Verwendung einer Gelplatte und Chloroform: Ethylacetat (1:1) als Entwicklungsmittel mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ermittelt. Die Fraktionen 123 bis 186 (Ende) werden vereinigt und eingengt, wodurch das Antibiotikum BL580 ZETA erhalten wird.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter erläutert.

### Beispiel 1

#### a) Inokulumherstellung

Zur Züchtung des Primärinokulums wird folgendes Medium hergestellt:

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Sojamehl          | 1,0 g  |
| Glucose           | 2,0 g  |
| Maisquellwasser   | 0,5 g  |
| CaCO <sub>3</sub> | 0,3 g  |
| Wasser, auf       | 100 ml |

Die abgewaschenen oder abgeschabten Sporen einer Agarschräge von *Streptomyces hygroscopicus* NRLL 11108 werden zum Beimpfen von 2 Kolben von jeweils 500 ml Fassungsvermögen, die jeweils 100 ml des oben angegebenen Mediums in sterilisiertem Zustand enthalten, verwendet. Die Kolben werden auf eine Drehschüttelvorrichtung aufgebracht und bei 28 °C 72 Stunden lang kräftig bewegt. Das so erhaltene Kolbeninokulum wird in eine Glasflasche mit einem Fassungsvermögen von etwa 20 l überführt, die 12 l des gleichen sterilisierten Mediums enthält. Das Sekundärinokulum wird mit steriler Luft belüftet, während die Züchtung 48 Stunden bei 28 °C geführt wird. Das erhaltene Sekundärinokulum wird in einen Tank mit einem Fassungsvermögen von etwa 380 l übergeführt, der 300 l des gleichen sterilen Mediums enthält. Dieses tertiäre Inokulum wird mit steriler Luft in einem Verhältnis von 1 l Luft je 1 Medium und Minute belüftet und mit Hilfe eines mit 173 Umdrehungen/Minute betriebenen Rührers bewegt. Die Züchtung wird 48 Stunden bei 28 °C geführt. Der pH-Wert zu diesem Zeitpunkt beträgt 6,9 bis 7,0.

#### b) Fermentation

Ein Fermentationsmedium wird folgendermassen hergestellt:

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Maisquellwasser   | 0,5 g  |
| Sojamehl          | 1,0 g  |
| Maisstärke        | 4,0 g  |
| CaCO <sub>3</sub> | 0,1 g  |
| Wasser, auf       | 100 ml |

3000 l Fermentationsmedium der vorstehend angegebenen Zusammensetzung werden in einem Tank mit einem Fassungsvermögen von 4000 l 60 Minuten bei 120 °C sterilisiert. Der pH-Wert des Mediums beträgt nach der Sterilisation 6,4 bis 6,5. Dieses Medium wird mit 300 Liter des wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellten tertiären Inokulums beimpft. Die Fermentation wird unter Verwendung von 11,0 l Hodag<sup>(R)</sup> FD82 als Entschäumungsmittel bei 28 bis 29 °C geführt. Die Belüftung erfolgt in einem Verhältnis von 0,6 l steriler Luft je Liter Maische und Minute. Die Maische wird mit Hilfe eines

Rührers bewegt, der mit 150 Umdrehungen/Minute betrieben wird. Nach der Fermentationsdauer von 138 Stunden wird die Maische abgeerntet.

#### 5 c) Isolierung und Reinigung

2600 l der wie in Abschnitt b beschrieben hergestellten fermentierten Maische mit einem pH-Wert von 7,3 werden mit 1300 l Ethylacetat versetzt und 1/2 Stunde gerührt. Nach Zugabe von 8 Gewichtsprozent Diatomeenerde wird die Mischung unter Rühren in mehreren Anteilen durch ein Paar von Rahmenpressen filtriert. Die wässrigen Ethylacetatfiltrate werden vereinigt, wodurch 3300 l Flüssigkeit erhalten werden, die man sich trennen lässt.

Dadurch werden 1100 l Ethylacetatextrakt erhalten. Nach dem Filtrieren jedes einzelnen Anteils von Maische/Ethylacetat/Diatomeenerde durch eine Presse wird das Kissen auf der Presse mit Ethylacetat gewaschen. Die Ethylacetatwaschflüssigkeiten werden vereinigt und ergeben nach der Abtrennung 600 l Ethylacetatwaschflüssigkeiten. Die 1100 l an Ethylacetatextrakt und die 600 l an Ethylacetatwaschflüssigkeiten werden vereinigt und in einer Destillationsvorrichtung mit einem Fassungsvermögen von etwa 1500 l auf etwa 100 l eingengt. Das so erhaltene Konzentrat wird in einer Destillationsvorrichtung mit einem Fassungsvermögen von etwa 200 l auf ein Volumen von etwa 20 l weiter eingengt. Diese 20 l werden in einer Glasdestillierapparatur bis zu einem Sirup eingengt.

Der Sirup wird 48 Stunden bei 4 °C stehengelassen und dann mit dem Doppelten seines Volumens an n-Heptan vermischt. Die Mischung wird über Nacht bei 4 °C stehengelassen. Die überstehende Flüssigkeit wird durch Dekantieren gewonnen und bis zu einem gummiartigen Rückstand eingengt. Nach Zugabe von 10 l Methanol zu diesem Rückstand wird die Mischung mehrere Stunden mit Trockeneis gekühlt. Dann wird sie durch Sinterglas mit einer Diatomeenerdenschicht filtriert und mit kaltem Methanol gewaschen. Das mit den Waschflüssigkeiten vereinigte Filtrat wird im Vakuum bis zu einem Sirup eingedampft, wodurch 1124 g Rückstand erhalten werden. Dieser Rückstand wird in einem Verhältnis von 33 g/l in Methylenchlorid gelöst. Es wird eine chromatographische Säule unter Verwendung von 27 l körniger Kohle (840 × 420 Mikron, 20 × 40 mesh) hergestellt. Durch diese Säule wird der Rückstand in Methylenchlorid mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 400 ml/Minute geleitet. Das Methylenchlorideluat wird als eine Fraktion aufgefangen und bis zu einem Sirup eingengt. Der Rückstand wird gründlich mit Methanol vermischt. Die Mischung wird in einem Kühlraum mit Hilfe von Trockeneis auf -10 °C gekühlt und 15 Minuten bei dieser Temperatur belassen. Etwa verfestigtes Öl wird abfiltriert, und das Methanolfiltrat wird im Vakuum bis zu einem Sirup eingengt, wodurch 363,8 g Substanz als Öl erhalten werden.

4 kg Kieselgel werden trocken in eine Kunststoffsäule mit einem Umfang von 54 cm eingeführt. 200 g des wie oben beschrieben erhaltenen Öls werden in der kleinstmöglichen Menge Methylenchlorid gelöst. Nach Zugabe von 300 g Kieselgel wird gründlich gemischt, und die Mischung wird im Vakuum zur Trockne eingedampft. Die getrocknete Mischung wird auf die Säule aufgegeben, worauf auf das obere Ende der Säule etwas Seesand gegeben wird, damit das Bett während der Elution nicht aufgewühlt wird. Die Kunststoffsäule wird mit einem Glasmantel gestützt. Sie wird mit 9,4 l einer Mischung aus gleichen Teilen Ethylacetat und Benzol eluiert. Es werden Fraktionen aufgefangen, und die Säule wird vollständig abtropfen gelassen. Der Abschnitt der Säule der einen Rf-Wert von 0,10 bis 0,45 zeigt, wird herausgenommen und in Ethylacetat:Methylenchlorid:Methanol (2:2:1) aufgeschlämmt. Die Mischung wird filtriert, mit dem gleichen Lö-

sungsmittelgemisch gewaschen und im Vakuum zur Trockne eingedampft, wodurch 22 g Rückstand erhalten werden.

Durch Vermischen von n-Heptan, Methanol, Ethylacetat und Wasser im Verhältnis von 3000:1500:20:40 (Volumen) wird ein zweiphasiges System erhalten. Mit 1650 ml der unteren Phase dieses Lösungsmittelsystems werden 2000 g säuregewaschener Diatomeenerde vermischt und in Anteilen in eine Glassäule mit einem Innendurchmesser von 7,5 cm eingefüllt. 22 g Rückstand werden in der unteren Phase gelöst und filtriert, und das Filtrat wird mit Diatomeenerde vermischt und auf die Säule aufgegeben. Die Entwicklung der Säule erfolgt mit der oberen Phase des Lösungsmittelsystems, und mit Hilfe eines Fraktionssammlers werden Fraktionen aufgefangen. Die Lage der gewünschten Verbindung wird durch Dünnschichtchromatographie von Fraktionsproben ermittelt. Die Fraktionen 123 bis 186 (Ende) werden vereinigt, im Vakuum bis zu einem Rückstand eingeeengt, in t-Butylalkohol gelöst und gefriergetrocknet, wodurch 4,2 g des gebildeten BL580 ZETA erhalten werden.

### Beispiel 2

#### Herstellung des Natriumsalzes von BL580 ZETA

900 mg BL580 ZETA werden in einer Mischung aus 30 ml Diethylether und 70 ml niedrig siedenden Petrolethers gelöst. Diese Lösung wird mit einem gleichen Volumen Wasser verrührt, und die Mischung wird unter Rühren mit 1 n HCl auf einen pH-Wert von 2,0 eingestellt. Die wässrige Phase wird verworfen. Nach Zugabe frischen Wassers wird das zweiphasige System gerührt und mit 0,1 n NaOH auf einen pH-Wert von 10,0 eingestellt. Die gebildete Emulsion wird zentrifugiert. Die obere Phase wird im Vakuum eingeeengt und ergibt einen weissen Rückstand. Dieser Rückstand wird in 15 ml Diethylether und 30 ml niedrig siedenden Petrolethers gelöst. Die Lösung wird durch 18-stündiges Stehenlassen in einem Kühlraum bei 4 °C auf etwa die Hälfte ihres Volumens eingeeengt. Die unlöslichen Stoffe werden abfiltriert und mit Petrolether gewaschen, wodurch ein weisser Feststoff erhalten wird. Das Filtrat wird eingedampft und wie oben be-

schrieben behandelt, wodurch eine zweite Ausbeute erhalten wird. Das zweite Filtrat wird wiederum eingedampft und wie oben beschrieben behandelt, wodurch eine dritte Ausbeute erhalten wird. Die erste und die dritte Ausbeute werden vereinigt, wodurch 445 mg des Natriumsalzes von BL580 ZETA erhalten werden.

Dieses Natriumsalz von BL580 ZETA hat einen Schmelzpunkt von 162 °C, eine spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20} = -3^\circ \pm 2^\circ$  (C=0,94 in Methanol) und folgende Analysenwerte: C 60,97, H 8,69, Na 2,70%. Das Natriumsalz von BL580 ZETA zeigt folgende Infrarotabsorptionswerte: 2,93  $\mu$ , 3,43  $\mu$ , 6,12  $\mu$ , 7,27  $\mu$ , 8,63  $\mu$ , 9,07  $\mu$ , 9,57  $\mu$ , 10,05  $\mu$  und 10,45  $\mu$ . Die beigefügte Figur 1 zeigt das Infrarotabsorptionsspektrum von BL580 ZETA-Natriumsalz. Die beigefügte Figur 2 zeigt ein  $^{13}\text{C}$  magnetisches Kernresonanzspektrum von BL580 ZETA-Natriumsalz. Die beigefügte Figur 3 zeigt ein magnetisches Protonenresonanzspektrum von BL580 ZETA-Natriumsalz.

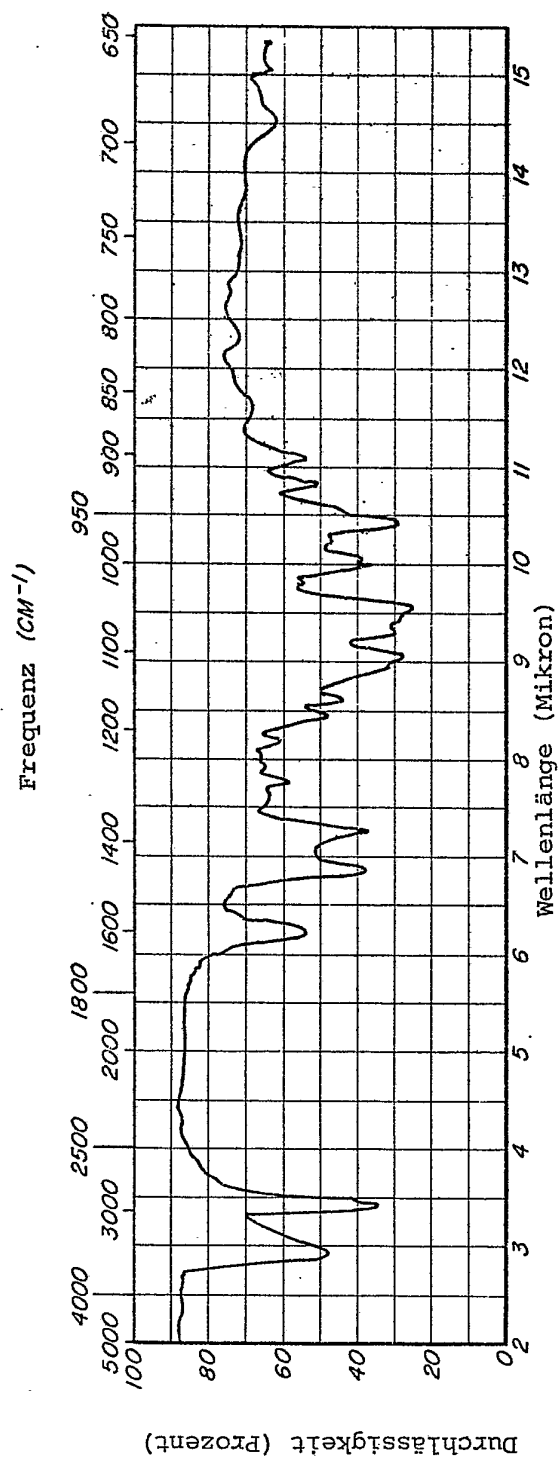
### Beispiel 3

#### Herstellung der freien Säure von BL580 ZETA

125 mg des Natriumsalzes von BL580 ZETA werden in 100 ml Diethylether gelöst. Nach Zugabe von 100 ml Wasser wird der pH-Wert mit 1 n HCl unter Rühren auf 2,0 eingestellt. Die etherische Schicht wird abgetrennt und mit frischem Wasser gewaschen. Dann wird sie im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wird in t-Butanol gelöst und gefriergetrocknet, wodurch 106 mg der freien Säure von BL580 ZETA erhalten werden.

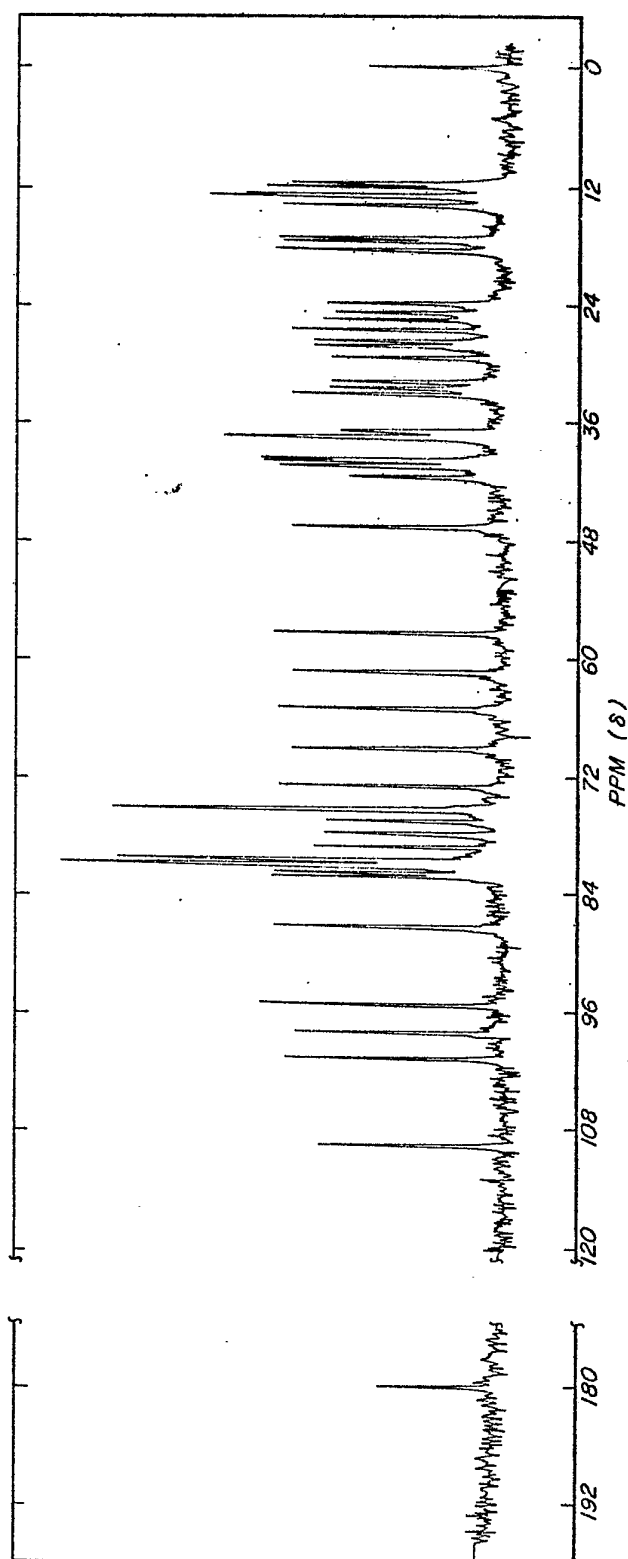
Diese freie Säure von BL580 ZETA hat einen Schmelzpunkt von 105 bis 107 °C, eine spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20} = 7^\circ \pm 2^\circ$  (C=0,9 in Methanol) und folgende

Analysenwerte: C 63,99, H 9,43%. Die freie Säure von BL580 ZETA zeigt im Infraroten Absorptionen bei folgenden Wellenlängen: 2,87  $\mu$ , 3,40  $\mu$ , 3,80  $\mu$ , 5,87  $\mu$ , 8,62  $\mu$ , 9,02  $\mu$ , 9,45  $\mu$ , 9,57  $\mu$ , 10,04  $\mu$  und 10,43  $\mu$ . Ein Infrarotabsorptionsspektrum der freien Säure von BL580 ZETA ist in der beigefügten Figur 4 wiedergegeben.



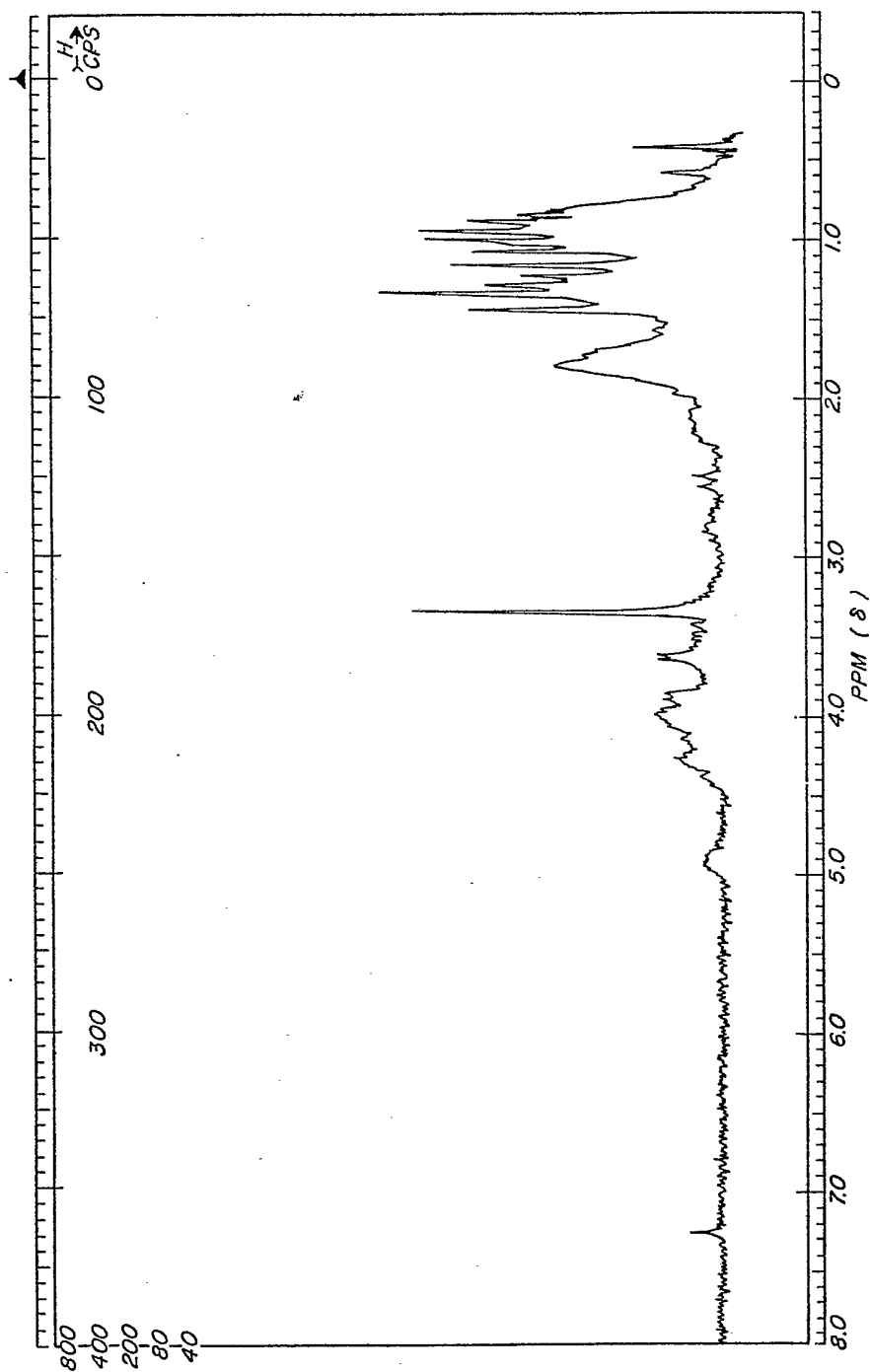
Infrarot-Absorptionsspektrum  
von BL580 ZETA, Natriumsalz, in einer KBr-Scheibe

**FIG. 1**



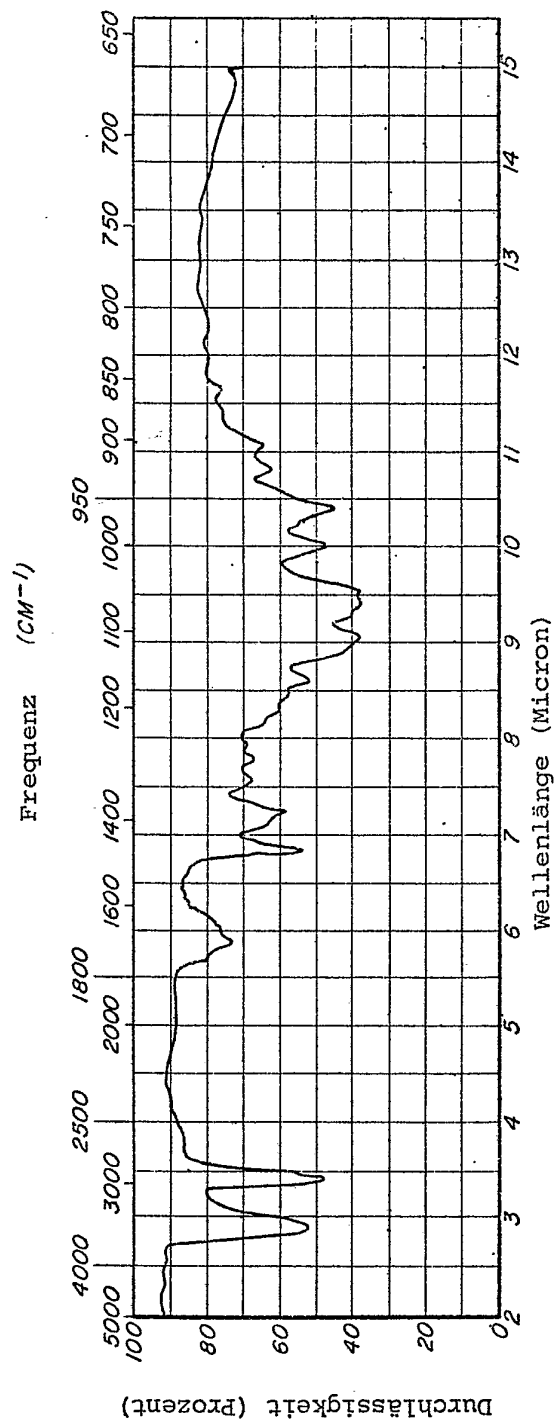
$^{13}\text{C}$  magnetisches Kernresonanz-Spektrum  
von BL580 ZETA, Natriumsalz, in  $\text{CDCl}_3$

FIG. 2



magnetisches Protonenresonanz-Spektrum  
von BL580 ZETA, Natriumsalz, in  $\text{CDCl}_3$

**Fig. 3**



Infrarotabsorptions-Spektrum  
von BL580 ZETA, freie Säure, in einer KBr-Scheibe

**FIG. 4**