



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **258 420 A1**4(51) **C 12 P 19/44**
A 61 K 31/71**AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 P / 300 592 2

(22) 09.03.87

(44) 20.07.88

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Patentabteilung, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72) Ihn, Wolfgang, Dr. rer.nat.; Schlegel, Brigitte, Dipl.-Biol.; Fleck, Werner, Dr. rer. nat. habil.; Tresselt, Dieter-Klaus, Dr. rer. nat.; Wetzstein, Horst, Dr. rer. nat.; Ose, Dieter, DD

(54) Verfahren zur Herstellung eines Anthracyclin-Antibiotikums sowie seines Aglykons

(55) Anthracyclin-Antibiotikum, Pyrraculomycin, ϵ -Pyrrromycinonglykosid, Krebschemotherapeutikum mikrobielle Herstellung, Mikroorganismus *Streptomyces spec. JA 6705*, Hinterlegungsnummer ZIMET 43 806

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines Anthracyclin-Antibiotikums, das als Pyrraculomycin bezeichnet wird, sowie seines Aglykons auf mikrobiologischem Wege. Der zur Herstellung benutzte Mikroorganismus *Streptomyces spec. JA 6705* ist in der ZIMET-Hinterlegungsstelle unter der Registriernummer ZIMET 43 806 hinterlegt. Ziel der Erfindung ist die Gewinnung des genannten Anthracyclin-Antibiotikums mit potentiell cancerostatischen Eigenschaften sowie seines Aglykons als Ausgangssubstrat für Mutasyntese und Halbsynthese, um die Palette derartiger Pharmaka zu erweitern. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß durch aerobe Submersfermentation des Mikroorganismus *Streptomyces spec. JA 6705* in Medien mit geeigneten C-, N-Quellen und Mineralsalzen Pyrraculomycin gebildet, mit geeigneten Methoden aus der Kulturlösung isoliert, nachfolgend gereinigt und gegebenenfalls hydrolysiert wird.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines Anthracyclin-Antibiotikums sowie seines Aglykons, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Mikroorganismus ***Streptomyces spec.*** JA 6705, unter aeroben Bedingungen in flüssigen Nährmedien, die eine Kohlenstoff- und Stickstoffquelle sowie Mineralsalze enthalten, bei einer Temperatur zwischen 25°C und 37°C während eines Zeitraumes von 2 Tagen bis 6 Tagen kultiviert wird und das gebildete Anthracyclin-Antibiotikum Pyrraculomycin aus dem Mycel mittels üblicher Lösungsmittel extrahiert, nachfolgend mit an sich bekannten Methoden konzentriert, chromatographisch gereinigt und gefällt oder mit anorganischen bzw. organischen Säuren in seine Salze überführt oder durch Säurehydrolyse in sein Aglykon umgewandelt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet durch** die Ausführung des Fermentationsprozesses bei 28°C über einen Zeitraum von 3 Tagen.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, **gekennzeichnet durch** die Verwendung von Wasser-Aceton-Gemischen zur selektiven Extraktion des Pyrraculomycins aus dem Mycel.

Hierzu 1 Seite Zeichnung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung einer antibiotisch wirksamen Substanz sowie deren Derivate, die bei der Chemotherapie von Tumor-, Virus- und durch Bakterien hervorgerufene Erkrankungen bei Mensch und Nutztier von potentiellern Nutzen sind. Insbesondere betrifft die Erfindung die Gewinnung eines neuen Anthracyclin-Antibiotikums, eines ϵ -Pyrraculomycinoglykosids, das als Pyrraculomycin bezeichnet wird, sowie seines Aglykons.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Anthracycline, die ein oder mehrere Zuckerreste enthaltenden Glykoside der Anthracyclinone, stellen antibiotisch wirksame Verbindungen dar. Die biologisch inaktiven Aglykone der Anthracyclin-Antibiotika (= Anthracyclinone), die man ihrem Kohlenstoffgerüst nach als Derivate des 7,8,9,10-Tetrahydro-5,12-naphthacenchinons und ihrem chromophoren Molekülteil nach als Hydroxyanthrachinone ansehen kann, werden je nach Zahl und Stellung der α -Hydroxygruppen am Anthrachinonringsystem in verschiedene Gruppen mit charakteristischen Elektronenabsorptionsspektren unterteilt (Brockmann, H., 1963, Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe, **21**, 121). Mehr als 100 Anthracycline sind bisher bekannt, wovon die Mehrzahl Gemische von schwer voneinander trennbaren Einzelkomponenten darstellen.

Zwei Anthracyclin-Antibiotika (Doxorubicin — US-Patent 3590028; Daunorubicin — GB-Patent 1 003383) sind seit längerer Zeit auf Grund ihrer chemotherapeutischen Wirksamkeit gegen akute Leukämien und solide Tumoren des Menschen in klinischer Anwendung. Ein wesentliches Problem bei der krebsschemotherapeutischen Anwendung von Anthracyclin-Antibiotika resultiert aus deren allgemeiner, hämatologischer, digestiver und kardialer Toxizität, die eine umfassendere Anwendung in der Tumorchemotherapie einschränkt und z. B. bei Herzkranken zur Kontraindikation führt. Da sich die Herztotoxizität der Anthracycline als besonders störend erwiesen hat, werden ständig neue Derivate bereits bekannter Verbindungen hergestellt und hinsichtlich einer verringerten Toxizität untersucht. Ein Nachteil ist hierbei, daß zur Gewinnung chemisch modifizierter Anthracyclin-Antibiotika zwar chemische Methoden wie Total- und Partialsynthese sowie biochemische Methoden zur enzymatischen Konversion verfügbar sind, deren Anwendung jedoch zu einer unzureichenden Ökonomie der Produktherstellung führt, die eine großtechnische Gewinnung dieser Derivate nicht gestattet. Bei den bisher bekannten mikrobiologischen Herstellungsverfahren für Anthracyclin-Antibiotika werden bevorzugt Gemische chemisch ähnlicher Anthracycline gewonnen, die aus den Mono-, Di-, Tri- oder Polysacchariden unterschiedlicher und unter industriellen Bedingungen praktisch nicht trennbarer Anthracyclinone bestehen. Das bringt Standardisierungsprobleme für das Endprodukt mit sich, wenn in Abhängigkeit vom Fermentationsverlauf Verschiebungen qualitativer und quantitativer Art im Vielkomponenten-Gemisch auftreten.

Es ist bekannt, daß Glykoside des ϵ -Pyrraculomycins Antitumoraktivität besitzen (Bush et al. 1982, J. Antib. **35**, 1174) und auf mikrobiellem Wege mit genetisch modifizierten Mikroorganismen gewonnen werden können. ϵ -Pyrraculomycinon und Glykoside davon wurden bisher in Fermentationslösungen folgender Mikroorganismen-Arten identifiziert: ***Streptomyces bobilliae*** Stamm ATCC 3310 (Corbaz u. Mitarb., 1957, Arch. Mikrobiol., **25**, 325); ***Streptomyces antibioticus*** Stamm ETH 6143, ***Streptomyces galilaeus*** Stamm ETH 18822, ***Streptomyces niveoruber*** Stamm ETH 17403 (Corbaz u. Mitarb., 1958, Arch. Mikrobiol., **31**, 326); ***Streptomyces spec.*** Stamm DOA 1205 (Brockmann u. Lenk, 1959, Chem. Ber., **92**, 1880); ***Actinomycete*** Stamm No A 220 (Asheshov u. Gordon, 1961, Biochem. J. **31**, 101); ***Streptomyces tauricus*** Stamm R 1 A 1417, ATCC 27470 (Ivanitskaya u. Mitarb., 1966, Antibiotiki, **11**, 973); ***Streptomyces diastatochromogenes*** Stamm IMET JA 10081/9 (Fleck u. Mitarb., 1972, Antimicrob. Agents Chemother., **1**, 385); ***Streptomyces galilaeus*** Stamm 3043 (Brandler u. Mitarb., 1977, Z. Allg. Mikrobiol., **6**, 361); ***Streptomyces galilaeus*** Stamm MA 144-M 1, ATCC 31133 (Oki u. Mitarb., 1977, J. Antib., **30**, 683); ***Streptomyces spec.*** Stamm ME 505 HEI, ATCC 31273 (Kitamura u. Mitarb., 1977, J. Antibiot., **30**, 616); ***Streptomyces ryensis*** Stamm No 44, ATCC 29805,

Streptomyces griseorubiginosus Stamm No 4915 (David u. Mitarb., 1980. J. Antib., **33**, 49); **Actinosporangium bohemicum spec. nov** Stamm C36415 ATCC 31273 (Bush u. Bradner, 1982. J. Antib., **35**, 1174), **Streptomyces violaceochromogenes** Stamm C73 (Nakagawa u. Mitarb., 1986. J. Antib., **39**, 1178).

Weiterhin ist bekannt, daß der endständige Zucker (L.-Cinerulose A) des ϵ -Pyrrromycinontriglykosids Rhodirubin C (Cinerubin A) enzymatisch zur L-Aculose oxidiert werden kann und zu einem Anthracyclin führt, das möglicherweise mit dem hier beschriebenen ϵ -Pyrrromycinonglykosid (Pyrraculomycin) identisch ist. Genaue Angaben zu den physikochemischen Eigenschaften des aus Rhodirubin C auf enzymatischem Wege gewonnenen Anthracyclins (Yoshimoto und Mitarb., 1979, J. Antib., **32**, 472) liegen bisher nicht vor. Die Nachteile dieses enzymatischen Verfahrens bestehen in der Verwendung teurer Einsatzstoffe bzw. in der aufwendigen Präparation des benötigten Enzyms.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung dient der Herstellung eines neuen Anthracyclin-Antibiotikums sowie seines Aglykons wie auch der Salze des Antibiotikums, um die aufgeführten Nachteile bisher bekannter Verfahren zu vermeiden und die Palette potentiell cancerostatisch, virostatisch und antimikrobiell wirksamer Anthracycline durch einen Vertreter, der eine Einzelkomponente darstellt, zu erweitern, sowie um die hydrolytischen Abbauprodukte als Ausgangssubstrat für die Mutasyntese und Halbsynthese neuer Anthracyclin-Antibiotika verwenden zu können.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu beschreiben, das es gestattet, ein Anthracyclin-Antibiotikum mit Hilfe eines Mikroorganismus aus leicht zugänglichen und billigen Einsatzstoffen in guten Ausbeuten als Einzelkomponente herzustellen.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß in dem Verfahren der Mikroorganismus **Streptomyces spec.** JA 6705, der in der ZIMET-Hinterlegungsstelle für Mikroorganismen im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Akademie der Wissenschaften der DDR, Beutenbergstr. 11, Jena 6900 unter der Registriernummer ZIMET 43806 hinterlegt wurde, Verwendung findet. Die Kultivierung des Stammes JA 6705 sowie seiner Varianten erfolgt unter aeroben Bedingungen. An Erde lyophil getrocknetes Sporenmaterial bzw. Mycelfragmente werden in Agarnährboden und nachfolgend in flüssige vorher sterilisierte Nährmedien geimpft und das entstehende Mycel wird in an sich bekannter Weise bei einer Temperatur zwischen 25°C und 37°C, vorzugsweise 28°C, über einen Zeitraum von 2 bis 6 Tagen, vorzugsweise 4 Tagen, bei einer Acidität kultiviert, die zu Beginn des Fermentationsprozesses zwischen pH 6,2 und pH 7,0 und am Ende des Prozesses zwischen pH 7,5 und pH 8,3 liegt. Das Nährmedium besteht aus Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie aus anorganischen Salzen. Als Kohlenstoffquellen können Stärke, Glukose, Glycerol, Mannit, Dextrin, Saccharose, Sojaöl und Sojamehl verwendet werden. Als Stickstoffquellen kommen außer den oben erwähnten stickstoffhaltigen Substraten auch Trockenhefe, Fleischpepton und Casein in Frage. Gute Ergebnisse können bei Zusatz von Mineralsalzen erzielt werden. Letztere begünstigen den Verlauf der Fermentation in Abhängigkeit vom eingesetzten Nährmedium. In komplexen Medien, die verschiedene Mehle enthalten, haben sich Zusätze von Kalziumkarbonat, Natrium-Phosphat bzw. Kalium-Phosphat als vorteilhaft erwiesen. Die Fermentation des Bildners JA 6705 kann in Steilbrustflaschen und Rundkolben verschiedenen Inhalts im Glasfermenter sowie in V 2 A-Stahltanks durchgeführt werden. Die Isolierung des Pyrraculomycins wird in der Weise durchgeführt, daß das Antibiotikum aus dem Mycel mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln extrahiert, nach Konzentration der Extrakte mit einem mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel reextrahiert, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, vom Lösungsmittel durch Destillieren im Vakuum befreit und auf üblichem Wege säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt wird.

Pyrraculomycin kristallisiert aus Benzen/Methanol in dunkelroten Kristallen vom Fp. 160/167, die sich gut in Chloroform, mäßig in niederen Alkoholen und fast nicht in Wasser und Petroläther lösen. Das basische Antibiotikum bildet bei der Umsetzung mit der äquivalenten Menge methanolischer Salzsäure in Äther ein rotes Hydrochlorid, das gut löslich ist in Wasser und niederen Alkoholen, dagegen nahezu unlöslich in Chloroform und Ether.

Bei der Hydrolyse mit verdünnter Säure in der Wärme liefert das Anthracyclin ein in saurer wäßriger Lösung unlösliches Aglykon, das durch vergleichende dünnschichtchromatographische und verschiedene spektroskopische (MS, UV/VIS, IR und ¹H-NMR) Untersuchungen als ϵ -Pyrrromycinon (Brockmann und Lenk, 1959. Chem. Ber. **92**, 1880) identifiziert wurde.

Die in Abb. 1 dargestellte Struktur des Antibiotikums Pyrraculomycin wurde durch die chemischen Abbau- und Derivatisierungsaktionen sowie durch umfassende spektroskopische Untersuchungen am intakten Antibiotikum-Molekül ermittelt.

Spektroskopische Daten des Pyrraculomycins:

UV/VIS λ max (Chloroform) nm/ 259, 298, 495

IR_{max}^{KBr}, cm⁻¹: 3470, 2970, 2935, 2820, 2755, 1740, 1700, 1620, 1605, 1015

¹³C-NMR-Spektrum: Die Daten der ¹³C-NMR-Analyse, die in Tab. 1 zusammengefaßt sind, werden mit den entsprechenden ¹³C-NMR-Daten von Pyrrromycin (Doyle u. Mitarb., 1979. J. Am. Chem. Soc., **101**, 7041) bzw. Aclacinomycin-Y (Oki u. Mitarb., 1979. J. Antib., **32**, 801) verglichen. Sie sind charakteristisch für Pyrraculomycin mit der in Abb. 1 gezeigten Struktur.

¹H-NMR-Daten: Die Daten der ¹H-NMR-Analyse sind in Tab. 2 zusammengefaßt und sind ebenfalls charakteristisch für Pyrraculomycin mit der Struktur (Formel Abb. 1).

Sowohl frische Fermentationslösungen des Pyrraculomycin-Bildners JA 6705 als auch das aus ihnen isolierte Pyrraculomycin besitzen eine starke antibiotische Aktivität, wobei bevorzugt das Wachstum von grampositiven Bakterien und Mycobakterien gehemmt werden.

Im Vergleich zur entsprechenden Wirksamkeit des klinisch als Krebschemotherapeutikum eingesetzten Anthracyclin-Antibiotikums Aclacinomycin A zeigte Pyrraculomycin gegen den Sporenbildner **Bacillus subtilis** SG 119 doppelte Aktivität.

Pyrraculomycin kann als ein bisher nicht verfügbares Anthracyclin-Antibiotikum angesehen werden, dessen biologische Wirkung eine potentielle Anwendung als Chemotherapeutikum gegen Tumor-, Virus- und durch Bakterien hervorgerufene Erkrankungen bei Mensch und Nutztier ermöglicht.

Ausführungsbeispiele

Die folgenden Beispiele dienen dazu, die Erfindung zu erläutern, ohne sie darauf zu beschränken.

1. Zwei 500-ml-Steilbrustflaschen enthalten je 80 ml des folgenden Vorzuchtmediums:

Glukose	1,5 %
Sojamehl	1,5 %
Na-Chlorid	0,5 %
Ca-Karbonat	0,1 %
primäres K-Phosphat	0,1 %
in Leitungswasser	

Sterilisation: 35 min bei 110°C. Acidität nach Sterilisation liegt bei pH 6,3. Jede Steilbrustflasche wird mit einer Sporen- oder Mycelsuspension des Pyrraculomycin-Bildners JA 6705 beimpft, welche mit steriler, isotonischer Kochsalzlösung von einer im Reagenzglas auf folgendem Anzucht-Nährboden gezüchteten, 10 bis 14 Tage alten Kultur des Pyrraculomycin-Bildners hergestellt wird.

Hafermehl	1,0 %
Haferflocken, gemahl.	1,0 %
Agar-Agar	2,0 %
in Leitungswasser	

Sterilisation: 35 min bei 120°C, natursauer.

Die beimpften Vorzuchtkulturen werden 48 Std. bei 28°C auf einem Schüttelgerät mit einer Frequenz von 180 U/min bebrütet. 8 ml einer so bebrüteten Vorzuchtkultur dienen zur Beimpfung von 500-ml-Steilbrustflaschen, die je 80 ml des folgenden Produktionsmediums enthalten:

Glukose	3,0 %
Sojamehl	1,0 %
Na-Chlorid	0,5 %
Ca-Karbonat	0,3 %
in Leitungswasser	

Sterilisation: 35 min bei 115°C. Die Acidität beträgt nach Sterilisation pH 6,3. Die Temperatur während der Fermentation liegt bei 28°C und die Schüttelfrequenz bei 180 U/min.

Mit einer Kultur des Pyrraculomycin-Bildners von einem festen Nährboden, wie oben beschrieben, beimpft man 80 ml des angeführten flüssigen Vorzucht-Mediums, welches in einer 500-ml-Steilbrustflasche enthalten ist. Man brütet 48 Std. bei 28°C auf einem Schüttelgerät mit einer Schüttelfrequenz von 180 U/min. 12 ml der so erhaltenen Kulturbrühe dienen zur Beimpfung von 400 ml des gleichen Vorzucht-Mediums, welches in einem 2-l-Glas Kolben enthalten ist. Man bebrütet weitere 24 Std. bei 28°C und einer Schüttelfrequenz von 180 U/min, ehe die so erhaltene 400-ml-Kulturbrühe zur Beimpfung von 20 l des beschriebenen Produktions-Mediums dienen. Letzteres ist in einem 32-l-Glasfermenter enthalten. Während der 96stündigen Fermentation, die mit einer Rührgeschwindigkeit von 400 U/min und mit einer Luftzufuhr von 15 l/min ausgeführt wird, kann die Schaumbildung durch Zusatz kleiner Mengen von Sonnenblumenöl oder anderer Schaumschutzmittel kontrolliert werden. 20 l auf diese Weise gewonnene Kulturlösung werden mit Salzsäure auf pH 5,0 eingestellt und separiert. Man erhält 2 kg Mycel, die zunächst mit 10 l Aceton und anschließend mit 5 l Chloroform jeweils kurzzeitig (30 min) ausgerührt werden. Das von den Lösungsmitteln abfiltrierte Mycel wird dann mit 2 l Wasser und 4 l Aceton über einen längeren Zeitraum (24 Stunden) gerührt, das Lösungsmittel abfiltriert, im Vakuum bis zur wäßrigen Phase konzentriert und mit Chloroform erschöpfend reextrahiert. Die vereinigten Chloroformextrakte werden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert, der ölige Rückstand in wenig Chloroform aufgenommen und an Kieselgel (KH_2PO_4 — gepuffert — 0,063 bis 0,2 mm) mit Chloroform/Aceton = 2/1, 1/1, 1/2, 1/4 und schließlich mit Chloroform/Aceton/Methanol = 8/32/1, 8/32/2 chromatographiert. Fraktionen, die dünnschichtchromatographisch einheitliches Pyrraculomycin enthalten, werden vereinigt, im Vakuum das Lösungsmittel abdestilliert, der ölige Rückstand in wenig Chloroform aufgenommen und das Antibiotikum mit Hexan gefällt.

Man erhält 390 mg Pyrraculomycin rein, das zur Feinstreinigung nochmals chromatographiert und aus Benzen/Methanol umkristallisiert werden kann.

2. Man verfährt wie im Beispiel 1 mit dem Unterschied, daß das Produktions-Medium folgende Zusammensetzung hat:

Sojamehl	2 %
Glukose	2 %
Kartoffelstärke	2 %
prim. K-Phosphat	0,025 %
Na-Chlorid	0,025 %
Ca-Karbonat	0,5 %
Mg-Sulfat	0,5 %
in Leitungswasser	

Sterilisation: 35 min. bei 115°C. Die Acidität liegt nach der Sterilisation bei pH 6,2.

Hierzu 2 Blatt Tabellen und 1 Blatt Strukturformeln (Abb. 1).

Tabelle 1 ^{13}C -NMR-Daten von Pyrraculomycin im Vergleich zu Literaturangaben von Pyrromycin (Doyle et al. [1] bzw. Aclacinomycin y (oki et al. [2]). Die chemischen Verschiebungen wurden auf Tetramethylsilan als inneren Standard bezogen. Lösungsmittel: CDCl_3

C-Atom	Chemische Verschiebungen (ppm)	
	Pyrraculomycin	Pyrromycin [1]
5	190,7	190,6
12	185,8	185,6
15	171,3	171,2
6	162,3	162,4
4	158,4	158,5
1	157,8	157,9
10 a	142,5	142,8
6 a	132,8	132,9
11 a	131,6	131,7
3	130,1	130,1
2	129,7	129,6
11	120,4	120,5
5 a	114,8	114,9
12 a	112,6	112,6
4 a	112,4	112,5
Q Aclacinomycin y [2]		
9	71,7	71,7
7	70,6	70,7
10	57,2	57,2
16	52,5	52,5
8	33,8	33,8
13	32,2	32,2
14	6,7	6,7
1'	101,6	101,6
2'	29,3	29,4
3'	61,5	61,6
4'	74,1	74,2
5'	66,6	66,6
6'	16,9	17,0
$\text{N}(\text{CH}_3)_2$	43,3	43,3
1''	99,3	99,4
2''	34,2	34,3
3''	65,7	65,8
4''	83,8	83,8
5''	68,4	68,4
6''	17,8	17,9
1'''	95,7	95,7
2'''	142,3	142,3
3'''	127,2	127,2
4'''	195,7	195,7
5'''	71,5	71,5
6'''	15,1	15,2

[1] T. W. Doyle, D. E. Nettleton, R. E. Grulich, D. M. Balitz, D. L. Johnson and A. L. Vulvano. J. Am. Chem. Soc. **101**, 7041 (1979)

[2] T. Oki, I. Kitamura, Y. Matsuzawa, N. Shibamoto, T. Ogasawara, A. Yoshimoto and T. Inui. J. Antibiotics **32**, 801 (1979).

Tabelle 2

Charakteristische ^1H -NMR-Daten von Pyrraculomycin in CDCl_3 (100-MHz-Gerät).

Die chemischen Verschiebungen (Angaben in ppm) beziehen sich auf Tetramethylsilan als inneren Standard.

1-OH	12,92 S,b	
4-OH	12,80 S,b	
6-OH	12,21 S,b	
11-H	7,72 S	
2-H	7,30 S	
3-H		
7-H	5,26 M	$W_{1/2} = 6 \text{ Hz}$
10-H	4,12 S	
CO_2CH_3	3,70 S	
CH_3 von C_2H_5	1,08 T	$J = 7 \text{ Hz}$
1'-H	5,50 M	$W_{1/2} = 6 \text{ Hz}$
$\text{N}(\text{CH}_3)_2$	2,16 S	
5'-H	4,56 Q	$J = 6,5 \text{ Hz}$ und ca. 1 Hz
6'-H	1,18 D	$J = 6,5 \text{ Hz}$
1''-H	5,03 M	$W_{1/2} = 5,5 \text{ Hz}$
5''-H	4,00 Q	$J = 6,5 \text{ Hz}$ und ca. 1 Hz
6''-H	1,26 D	$J = 6,5 \text{ Hz}$
1'''-H	5,26 D	$J = 3,2 \text{ Hz}$
2'''-H	6,87 DD	$J = 10,3 \text{ Hz}$ und 3,2 Hz
3'''-H	6,10 D	$J = 10,3 \text{ Hz}$
5'''-H	4,75 Q	$J = 7 \text{ Hz}$
6'''-H	1,40 D	$J = 7 \text{ Hz}$

Abkürzungen:

S = Singulett, D = Dublett, DD = doppeltes Dublett, T = Triplett, Q = Quartett, M = Multiplett, b = Signal verbreitert,

 $W_{1/2}$ = Signalbreite in halber Höhe

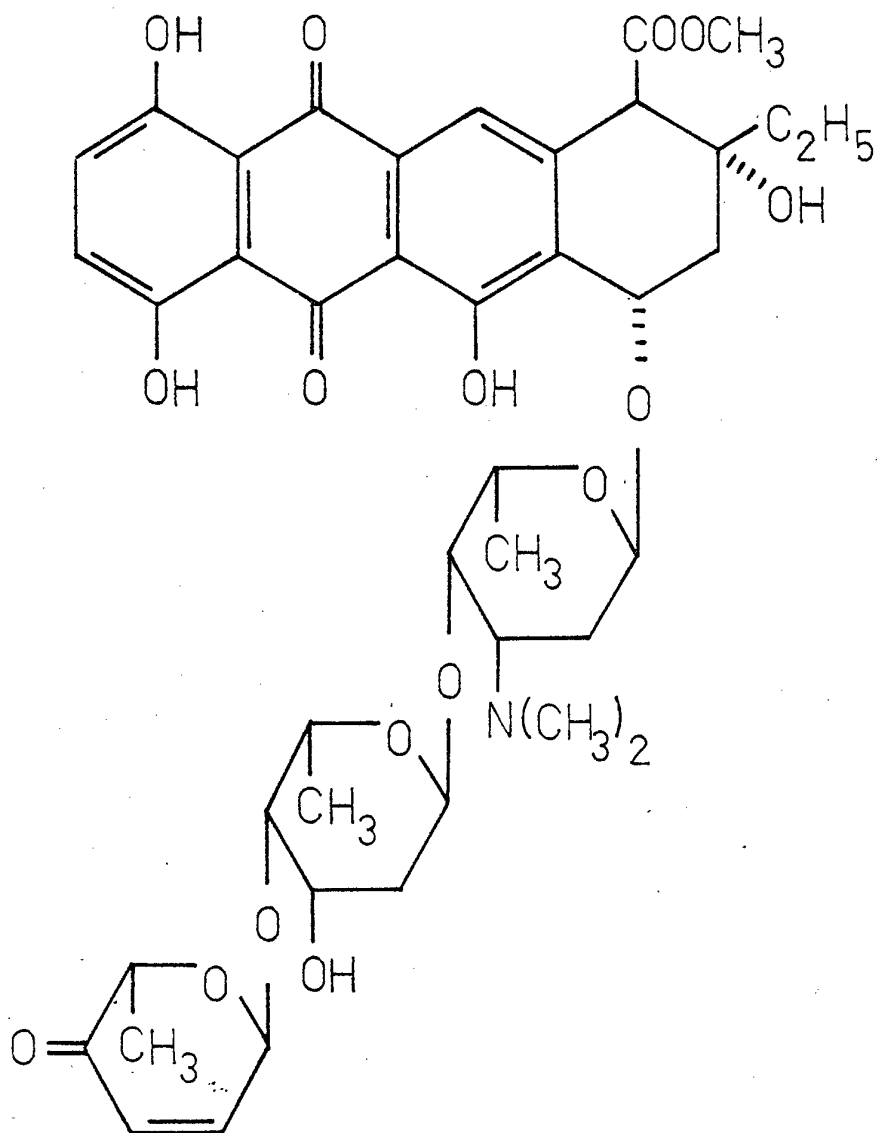


Abb. 1