DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

(12) **Wirtschaftspatent**

(19) **DD** (11) **229 429 A1**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

4(51) **C 12 P 19/56**
C 12 P 29/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 P / 270 576 4 (22) 11.12.84 (44) 06.11.85

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1086 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD
(72) Eckardt, Klaus, Dr. rer. nat.; Wagner, Christina, Dipl.-Biol.; Tresselt, Dieter-Klaus, Dr. rer. nat.; Ihn, Wolfgang, Dr. rer. nat.; Schumann, Gisbert, Dipl.-Biol.; Fleck, Werner, Dr. habil. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von Anthrazyklinonderivaten

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von 11-Desoxy-daunomycinon, 7-epi-11-Desoxydaunomycinon, 7,11-Didesoxy-13-dihydro-daunomycinon sowie Glykosiden des 11-Desoxy-daunomycinons auf mikrobiologischem Wege. Der zur Herstellung benutzte Mikroorganismus gehört zur Art Streptomyces griseus und trägt die Bezeichnung ZIMET 43699. Ziel der Erfindung ist die Herstellung der genannten Anthrazyklinonderivate, die als Ausgangssubstanzen zur Gewinnung neuer Anthrazyklin-Antibiotika mit potentiell cancerostatischen, antiviralen, antibakteriellen und immunsuppresiven Eigenschaften. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß durch aerobe Submersfermentation des Stammes ZIMET 43699 der Art Streptomyces griseus in Medien mit geeigneten C-, N-Quellen und Mineralsalzen die genannten Verbindungen gebildet, mit geeigneten Methoden aus dem Mycel sowie dem Kulturfiltrat isoliert und nachfolgend gereinigt werden.

ISSN 0433-6461

6 Seiten

Erfindungsanspruch:

Verfahren zur Herstellung von Anthrazyklinonderivaten auf mikrobiologischem Wege, **gekennzeichnet dadurch,** daß der Stamm Streptomyces griseus ZIMET 43699 unter aeroben Bedingungen in flüssigen Nährmedien, die eine Stickstoffquelle sowie Mineralsalze enthalten, bei einer Temperatur von 25 bis 37°C während eines Zeitraumes von 2 bis 6 Tagen kultiviert wird, und die gebildeten nichtglykosidischen und glykosidischen Anthrazyklinonderivate durch Extraktion aus dem Kulturfiltrat und dem abgetrennten Mycel bei einer Acidität von *p*H 3 bis *p*H 9,5 in organische Lösungsmittel übergeführt, nach Konzentrieren, Fällung und chromatographischer Trennung als reine Verbindungen erhalten werden.

Hierzu 1 Seite Formeln

Anwendungsgebiet der Erfindung

Bei der Erfindung handelt es sich um ein Verfahren zur Herstellung von 11-Desoxydaunomycinon, 7-epi-11-Desoxydaunomycinon, 7,11-Didesoxy-13-dihydrodaunomycinon sowie Glykosiden des 11-Desoxydaunomycinons auf mikrobiologischem Wege. 11-Desoxydaunomycinon und 7-epi-11-Desoxydaunomycinon sind geeignete Vorstufen zur Herstellung neuer wirksamer Antibiotika. Glykoside solcher Verbindungen sind antibiotisch wirksame Substanzen, die bei der Chemotherapie von Tumor-, Virus- und von Bakterien hervorgerufenen Erkrankungen bei Mensch und Nutztier sowie als Immunsuppressiva von potentiellem Nutzen sind.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bekannt, daß Glykoside des 11-Desoxydaunomycinons Antitumoraktivität besitzen (Cassinelli et al., 1980; J. Antib. **33**, 1468 — 73) und auf mikrobiellem Wege mit Hilfe genetisch modifizierter Mikroorganismen gewonnen werden können. 11-Desoxydaunomycinon und Derivate davon wurden bisher in Fermentationslösungen folgender Mikroorganismen-Arten identifiziert: **Micromonospora peucetica** (Arcamone, F. et al. 1980. J. Amer. Chem. Soc. **102**, 1462); **Streptomyces peuceticus** var. **aureus** (Cassinelli et al., 1982. J. Antib. **35**, 176–183); **Streptomyces coeruleorubidus** (Jizba, J. et al., 1980. Coll. Czech. Chem. Commun. **45**, 764–771). Die bisher beschriebenen 11-Desoxydaunomycinon-Glykoside sind Produkte aus Mikroorganismen, die sich in taxonomischen Merkmalen eindeutig von dem im Patent beschriebenen Bildner unterscheiden.

Stereoisomere des 11-Desoxydaunomycinons und Glykoside davon sind bisher unter den natürlich vorkommenden 11-Desoxyverbindungen nicht beschrieben worden.

Als Ausgangssubstanzen mit ähnlicher Struktur für Mutasynthesen bzw. Partialsynthesen von Anthracyclin-Antibiotika wurden bisher Anthracyclinone (Yoshimoto, A. et al., 1980. J. Antib. **33**, 1150–1157; Oki, T. et al., 1980. J. Antib. **33**, 1331–1340; Yoshimoto, A. et al., 1980. J. Antib. **33**, 1158–1340; Yoshimoto, A et al., 1980. J. Antib. **33**, 1158–1166; Yoshimoto, A. et al., 1981. J. Antib. **34**, 1492–1494; Eur. Pat. appl. EP 62, 327, 13 Oct. 1982; Jizba, J. et al., 1982. Coll. Czech. Chem. Commun., in press) bzw. Anthracycline (Arcamone, F.: Doxorubicin. Academic Press, New York 1981) eingesetzt.

Weiterhin ist bekannt, daß 11-Desoxydaunomycinon-Derivate auf Grund der potentiellen Nutzbarkeit als Antitumorantibiotika durch Totalsynthese gewonnen werden können: Arcamone, F. et al., 1980. J. Amer. Chem. Soc. 102, 4, 1462–1463; Bauman, J. G. et al., 1980. Tetrahedron Lett. **21**, 50, 4777; Gesson, J. P. et al., 1980. Tetrahedron Lett. **21**, 35, 3351; Umezawa. H. et al., 1980. J. Antib. **33**, 12, 1581–1585; Alexander, J. et al., 1981. Tetrahedron Lett. **22**, 38, 3711; Kimball, S. D. et al., 1981. J. Amer. Chem. Soc. **103**, 6, 1561; Krohn, K., 1981. Angew. Chem. **93**, 6–7, 575–576; Gesson, J. P. et al., 1982. J. Chem. Soc. Chem. Commun. **7**, 421–423; Jung, M. E. et al., 1982. J. Org. Chem. **47**, 6, 1150–52; Kende, A. S. et al., 1982; Rama Rao, A. V. et al., 1982. Tetrahedron Lett. **23**, 7, 775; Rama Rao, A. V. et al., 1982. Tetrahedron Lett. **23**, 2415–19; Sekizaki, H. et al., 1982. J. Amer. Chem. Soc. **104**, 25, 7372–74; King, N. L., 1982. CA **99**/3, 22183; Hauser, F. M., Mol. D. 1983. J. Amer. Chem. Soc. **105**/17, 5688–90; Riemer, J. A. 1983. CA 99/3, 22183.

Die Synthesen führen jedoch über eine Reihe von chemischen Reaktionen. Eine praktische Nutzung dieses Herstellungsweges ist daher aus ökonomischen Gründen noch nicht abzusehen.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat die ökonomische günstige Herstellung von 11-Desoxydaunomycinonen und ihren Glykosiden zum Ziel.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu beschreiben, mit dem 11-Desoxydaunomycinone für Mutasynthesen bzw. Partialsynthesen gemeinsam mit ihren biogenetisch gebildeten Glykosiden auf mikrobiologischem Wege hergestellt werden können.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß in dem Verfahren der Mikroorganismus ZIMET 43699, der in der ZIMET-Hinterlegungsstelle für Mikroorganismen im Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Akademie der Wissenschaften der DDR, 6900 Jena, Beutenbergstraße 11, hinterlegt wurde, Verwendung findet.

Die Kultivierung des Stammes ZIMET 43699 sowie seiner Varianten erfolgt unter aeroben Bedingungen. An Erde lyophil getrocknetes Sporenmaterial bzw. an Glucose/Gelatine (5%ig) lyophilisierte Mycelfragmente werden auf geeignete Agarnährböden und nachfolgend in flüssige, vorher sterilisierte Nährmedien geimpft, und das entstehende Mycel wird in an sich bekannter Weise bei einer Temperatur zwischen 25 und 37°C, vorzugsweise 28°C, über einen Zeitraum von 2 bis 6 Tagen, vorzugsweise 4 Tagen, kultiviert. Das Nährmedium besteht aus Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie aus anorganischen Salzen. Als Kohlenstoffquellen können Stärke, Glukose, Glyzerin, Dextrin, Mannit, Saccarose, Sojaöl und Sojamehl verwendet werden. Als Stickstoffquellen kommen außer den o.ä. 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 Isolierung des gesuchten Pigmentgemisches wird in der Weise durchgeführt, daß das abgetrennte Mycel mit organischen Lösungsmitteln, vorzugsweise Methanol und Chloroform, extrahiert wird. Nach Konzentrieren der vereinigten Extrakte bis zum wäßrigen Anteil und Ansäuern mit verdünnter Säure fällt der nichtglykosidische Anteil als gelber Niederschlag aus, der durch Abzentrifugieren oder Abfiltrieren, Waschen, sowie Trocknen im Vakuum in Form eines gelben Pulvers gewonnen wird.

Die glykosidischen Anteile bleiben bei saurem *p*H in der wässrigen Mutterlauge gelöst. Nachdem zunächst die saure Mutterlauge zur Entfernung der restlichen Anteile an nichtglykosidischen Verbindungen 2× mit einem nicht mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel, vorzugsweise Chloroform, ausgeschüttelt wurde, können nunmehr aus der wässrigen Phase die glykosidischen Anteile extrahiert werden. Dazu versetzt man mit verdünnter Lauge, bis der *p*H-Wert 8,5 erreicht wird. Nunmehr wird mehrfach mit einer Mischung von Chloroform — Methanol (9:1) extrahiert und die organischen Extrakte nach Vereinigen auf ein kleines Volumen konzentriert. Nach Zusatz von wenig verdünnter Salzsäure bis *p*H 5 läßt sich das Glykosidgemisch durch Fällen mit Petroläther oder n-Hexan als gelbes Pulver erhalten.
Sowohl die auf diese Weise isolierte nichtglykosidische Fraktion als auch die Glykosidfraktion bestehen aus mehreren Substanzkomponenten, die chromatographisch in die Einzelkomponenten getrennt werden können. Zur Trennung der nichtglykosidischen Fraktion ist besonders die Säulenchromatographie geeignet, wobei vorzugsweise Oxalsäure-behandeltes Kieselgel verwendet wird. Dabei wird eine Auftrennung in 3 gelbe Hauptzonen (G44 — K4/5, G44 — G1 und G44 — G2) und mehrere Nebenkomponenten erreicht. Die für die Erfindung wesentlichen Substanzen aus den 3 Hauptzonen erwiesen sich als 7,11-Didesoxy-13-dihydro-daunomycinon (G44 — K4/5), 11-Desoxy-daunomycinon (G44 — G1) und das aus Mikroorganismen noch nicht gewonnene 7-epi-11-Desoxy-daunomycinon (G44 — G2).
Die so erhaltenen Substanzen können weiter einer Feinreinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie unterzogen werden, wodurch Spuren von Nebenkomponenten noch abgetrennt werden.

Eigenschaften der nichtglykosidischen Verbindungen:

1. G44 — K4/5: Gelbe, mikrokristalline Substanz.
   Schmp.: 236–238 °C, Summenformel: $C_{21}H_{20}O_6$ (MG 368). Ber.: 368,1260; gef. 368,1300 (m/z M^+, hochauflösende MS). UV (max): 227,267,423 nm (CH_3OH). ^{1}H-NMR: Die Daten der NMR-Analyse sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Sie sind charakteristisch für 7,11-Didesoxy-13-dihydro-daunomycinon (Formel I) [Jizba et al., Coll. Czech. Chem. Commun. **45** (1980) 764].
2. G44 — G1: Gelbe mikrokristalline Substanz.
   Schmp.: 214–215 °C Zers. (Nach Schmelzen kristallisieren Nadeln aus, die erneut bei 280 °C schmelzen). Summenformel: $C_{21}H_{18}O_7$ (MG 382). Ber.: 382, 1052; gef. 382, 1098 (m/z M^+, hochauflösende MS). IR(KBr): 1630, 1670, 1709 cm^{-1}. UV (max): 227, 260, 419 nm (CH_3OH). ^{1}H-NMR: Die Daten sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Sie sind charakteristisch für 11-Desoxy-daunomycinon (Formel IIa). [Arcamone et al., J. Am. Chem. Soc. **102** (1980) 1462; Cassinelli et al., J. Antib. **33** (1980) 1468.]
3. G44 — G2: Gelbe, mikrokristalline Substanz.
   Summenformel: $C_{21}H_{18}O_7$ (MG 382). Ber.: 382, 1052; gef.: 382, 1052 (m/z M^+, hochauflösende MS). IR(KBr): 1630, 1670, 1710 cm^{-1}. UV: (max): 228, 260, 420 nm (CH_3OH). ^{1}H-NMR: Daten in Tab. 1. Die Daten sind charakteristisch für 7-epi-11-Desoxy-daunomycinon (Formel IIb), das bisher noch nicht aus Mikroorganismen bekannt ist.

Das Glykosidgemisch kann auf dem an sich bekannten Wege der Säulenchromatographie an gepufferter Zellulose und gepuffertem Kieselgel getrennt werden. Ebenfalls geeignet ist die präparative Dünnschichtchromatographie, wobei vorzugsweise $NaHCO_3$-gepuffertes Kieselgel zur Anwendung kommt. Dabei lassen sich insgesamt 7 Glykoside als gelbe Zonen abtrennen. Aus den einzelnen Zonen werden die reinen Verbindungen mit Methanol herausgelöst.

Eigenschaften der Glykoside:

1. R_f-Werte der Glykoside. Im Dünnschichtchromatogramm ($NaHCO_3$-gepuffertes Kieselgel, Merck 60 H für die DC, luftgetrocknet, Lösungsmittelsystem $CHCl_3$ — CH_3OH (95:5) haben die Glykoside folgende R_f-Werte:

	R_f-Wert
G44-A	0,24
G44-B	0,27
G44-C	0,38
G44-D	0,53
G44-E	0,63
G44-F	0,74
G44-G	0,79

2. Hydrolyse und Nachweis der Aglykone: Jeweils 2 mg der Glykoside wurden in 2 ml 0,1 N HCl gelöst und 1 Std. auf 80 °C erhitzt. Anschließend wurden die Lösungen mit $CHCl_3$ (1:1) extrahiert, die $CHCl_3$-Phase mit Wasser 2× gewaschen und anschließend chromatographiert. Alle Glykoside enthielten 11-Desoxy-daunomycinon und Aglykon G44 — G2 im Verhältnis 1:1.
3. Die Glykoside wurden wie unter 1. mit dem bekannten 11-Desoxy-daunomycin chromatographisch verglichen. G44-B zeigte das gleiche Verhalten wie 11-Desoxy-daunomycin (Standardsubstanz, Formel IIIa).
4. Massenspektrometrie. Das Triazetylderivat der Verbindung G44-B zeigte im Massenspektrum das charakteristische Fragmentierungsverhalten des Triazetyl-11-desoxy-daunomycins (Formel IIIb). Gefundene charakteristische Fragmentionen: m/z 577, 552, 424, 382, 364, 346. (Molpeak bei m/z 637 nicht nachweisbar.

Als Glykoside des 11-Desoxy-daunomycinons sind bisher nur 11-Desoxy-daunomycin als Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen beschrieben worden. Glykoside des 7-epi-11-Desoxydaunomycinons sind nicht bekannt. G44-A, C, D, E, F, G sind daher neue Substanzen.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert, jedoch nicht eingeschränkt.

1.A) Zwei 500 ml Steilbrustflaschen enthalten je 80 ml des folgenden Vorzucht-Mediums:

Bacto-Pepton	0,60 %
Hefe-Extrakt	0,30 %
Ca-Hydrogennitrat	0,05 %
in Leitungswasser	

Sterilisierung: 30 Min. bei 120 °C, *p*H 7,2 nach Sterilisierung.

Jede Steilbrustflasche wird mit einer Sporen- und/oder Mycelsuspension beimpft, welche mit steriler, isotonischer Kochsalzlösung von einer im Reagenzglas auf folgendem Anzucht-Nährboden gezüchteten 10 bis 14 Tage alten Kultur des Stammes ZIMET 43699 hergestellt wird:

Saccarose	0,300 %
Dextrin	1,500 %
Harnstoff	0,010 %
Hefeextrakt	0,100 %
Pepton (bakt.)	0,500 %
Natriumchlorid	0,050 %
Eisensulfat	0,001 %
primäres Kaliumphosphat	0,050 %
Agar-Agar (gewaschen in Aqua destillata)	

Sterilisierung: 40 Min. bei 116 °C. Nach der Sterilisierung liegt die Acidität zwischen *p*H 6,5 und *p*H 7,0. Die beimpften Vorzucht-Kulturen werden 48 Std. bei 28 °C auf einem Schütteltisch mit einer Frequenz von 180 U/Min. bebrütet. 8 ml einer so bebrüteten Vorzucht-Kultur dienen zur Beimpfung von 500 ml-Steilbrustflaschen, die 80 ml des folgenden Produktions-Mediums enthalten:

Glucose	3,0 %
Sojamehl	1,0 %
Natriumchlorid	0,5 %
Calciumkarbonat	0,3 %
in Leitungswasser	

Sterilisierung: 35 Min. bei 110 °C. Die Acidität beträgt nach dem Sterilisieren *p*H 6,3.

Die Temperatur während der Fermentation liegt bei 28 °C und die Schüttelfrequenz bei 180 U/Min. Nach 72- bis 96stündiger Fermentation wird die höchste Ausbeute an 11-Desoxydaunomycinon, 7-epi-11-Desoxy-daunomycinon und Glykosiden erreicht (20 mg Rohprodukt pro Liter Kulturflüssigkeit).

1.B) 5,6 l Kulturflüssigkeit, die man durch Vereinigen einer Reihe von Fermentationsansätzen nach 1.A) erhielt, wurden ohne Veränderung des *p*H-Wertes zentrifugiert, und das Mycel 3× mit je 200 ml Methanol, anschließend 2× mit je 200 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden im Vakuum eingeengt, bis eine wäßrige Restlösung zurückblieb. Dazu gab man 200 ml 0,1 N HCl, rührte gut durch und filtrierte ab. Der auf der Glasfritte verbleibende gelbe Niederschlag wurde mehrfach mit Wasser gewaschen und getrocknet. Der Niederschlag (800 mg) bestand aus einem Gemisch der Pigmente G44 — K4/5, G44 — G1 und G44 — G2 sowie verschiedener Nebenkomponenten.

Die saure Mutterlauge wurde zur Entfernung restlicher nichtglykosidischer Anteile 1× mit 200 ml $CHCl_3$ ausgeschüttelt. Zu der wäßrigen Phase gab man nunmehr 0,5 N NaOH bis zum Erreichen des *p*H-Wertes 8,5. Anschließend wurde 2× mit je 300 ml Chloroform extrahiert, wobei die glykosidischen Anteile mit gelber Farbe in die Chloroformphase übergingen. Die vereinigten Chloroformextrakte wurden nunmehr getrocknet und auf ein kleines Volumen eingeengt. Aus dem Restkonzentrat ließ sich das Glykosidgemisch durch Zufügen von n-Hexan als gelber Niederschlag ausfällen, der abgesaugt und mit n-Hexan gewaschen wurde. Ausbeute: 120 mg Rohsubstanz.

1.C) 100 mg des Gemisches nichtglykosidischer Anteile aus Vorschrift 1.B) wurden in 10 ml eines Gemisches von Chloroform — Methanol (95:5) gelöst und auf eine Säule (2.3 × 30 cm) mit KH_2PO_4-behandeltem Kieselgel gegeben. Bei Elution mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch trennten sich mehrere gelbe Haupt- und Nebenzonen ab. Die 3 Hauptzonen wurden getrennt aufgefangen und bestanden in der Reihenfolge der Elution aus G44 — G1, G44 — G2 und G44 — K4/5. Zur Isolierung der Substanzen wurden die Eluate jeweils zur Trockne eingeengt, mit wenig $CHCl_3$ aufgenommen und mit n-Hexan gefällt.

1.D) Zur präparativen Dünnschichtchromatographie wurden die Platten auf übliche Weise selbst hergestellt unter Verwendung von Kieselgel 60 H (Merck) für die DC, lufttrocken. Eine gesättigte Lösung von G44 — G1 in $CHCl_3$ wurde entlang der Startlinie aufgetragen und anschließend mit $CHCl_3$ — CH_3OH (95:5) entwickelt. Die schneller laufende Hauptzone G44 — G1 trennte sich gut von einer schwachen Zone G44 — G2 (Restgehalt) ab. Die intensiv gelbe Zone mit G44 — G1 wurde herauspräpariert mit CH_3OH eluiert und zur Trockne eingeengt. Anschließend wurde die Substanz G44 — G1 in wenig Chloroform gelöst und mit n-Hexan als hellgelbe, mikrokristalline Substanz ausgefällt.

1.E) Die nach Vorschrift 1.D) gewonnene Substanz G44 — G1 wurde in $CHCl_3$ gelöst und an $NaHCO_3$-behandeltem Kieselgel 60 H (Merck) für die DC chromatographiert.

Lösungsmittel: $CHCl_3$ — CH_3OH (95:5). G44 — G1 trennte sich gut von einer schwach gelben schneller wandernden Vorzone ab, die im UV-Licht im Gegensatz zu den rot fluoreszierenden 11-Desoxy-daunomycinonderivaten mit hellgelber Farbe fluoreszierte. Die Hauptzone wurde herauspräpariert, mit CH_3OH eluiert und mit verdünnter HCl schwach angesäuert. Anschließend wurde die wäßrige CH_3OH-Lösung mit Chloroform versetzt, die abgetrennte $CHCl_3$-Phase 2× mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die Gewinnung der reinen Komponente G44 — G1 erfolgte weiter wie unter 1.D) beschrieben.

1.F) Das Rohgemisch der nach Abschnitt 1.B) gewonnenen Glykoside wurde in Methanol gelöst und wie Abschnitt 1.E) beschrieben an $NaHCO_3$-gepuffertem Kieselgel chromatographiert. Zur besseren Auftrennung wurden die einzelnen Platten jedoch zweimal im gleichen Lösungsmittelsystem entwickelt. Dabei erfolgte eine Auftrennung in 7 intensiv gelbe Zonen, die in der Reihenfolge vom kleinsten zum größten R_f-Wert mit G44-A, B, C, D, E, F, G bezeichnet wurden. Zur Isolierung wurden die einzelnen Zonen aus den Chromatogrammen herauspräpariert, mit CH_3OH eluiert und die Eluate 1:1 mit $CHCl_3$ versetzt. Anschließend wurden durch Zugabe von Wasser die $CHCl_3$-Phasen abgeschieden und die einzelnen Glykoside wie im Abschnitt 1.D) beschrieben gewonnen.

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

Glukose	3,000 %
Sojamehl	3,000 %
Calciumkarbonat	0,300 %
Natriumchlorid	0,300 %
Eisenchloridhydrat	0,025 %

in Leitungswasser

Sterilisierung: 35 Min. bei 110 °C. Die Acidität liegt nach der Sterilisierung bei *p*H 6,5.

Fortsetzung von Tab. 1:

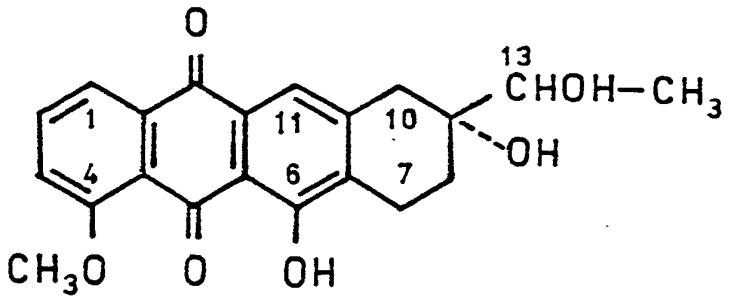
^{1}H-NMR-Daten der Anthracyclinone G44 — G1, G44 — G2 und G44 — K4/5.

Lösungsmittel: $CDCl_3$; Spektrometerfrequenz: 200 MHz.

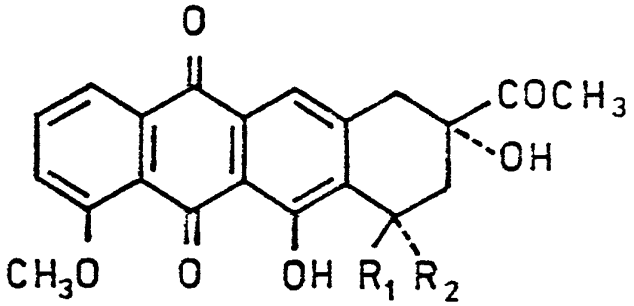
Die chemischen Verschiebungen wurden auf Tetramethylsilan als inneren Standard bezogen.

	Chemische Verschiebungen	(ppm) und Kopplungskonstanten J (Hz)	
	G44 — G1	G44 — G2	G44 — K4/5
	$J_{7e'\text{-}H,8e\text{-}H}$ + $J_{7e'\text{-}H,8a\text{-}H}$ = 7 Hz	$J_{7a'\text{-}H,8e\text{-}H}$ + $J_{7a'\text{-}H,8a\text{-}H}$ = 16 Hz	
10e'-H	2,98 D,D	2,74 D,D	2,80–3,15
10a'-H	3,24 D	3,37 D	
	$J_{10e'\text{-}H,10a'\text{-}H}$ = 17,6 Hz	$J_{10e'\text{-}H,10a'\text{-}H}$ = 16,8 Hz	
	$J_{10e'\text{-}H,8e\text{-}H}$ = 2 Hz	$J_{10e'\text{-}H,8e\text{-}H}$ = 2,3 Hz	
$COCH_3$	2,40 S	2,37 S	——
13-H	——	——	3,76 Q
13-CH_3	——	——	1,27 D

S, Singulett; D, Dublett; D,D, doppeltes Dublett; T, Triplett; Q, Quartett, e, äquatorial, e', quasi-äquatorial; a, axial; a', quasi-axial.

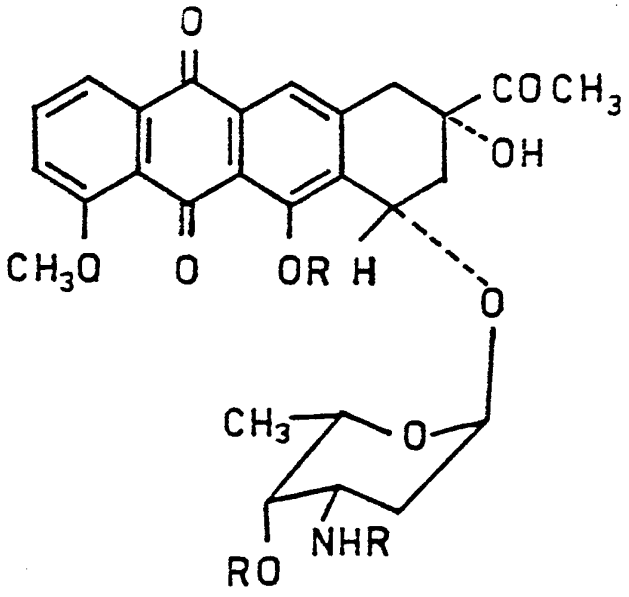


I



IIa: $R_1 = H$, $R_2 = OH$

IIb: $R_1 = OH$, $R_2 = H$



IIIa: R = H

IIIb: R = $COCH_3$