

NORGE



**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

Utlegningskrift nr. 122237

Int. Cl. C 12 d 9/14 Kl. 6b-16/03

Patentsøknad nr. 168.620 Inngitt 16.VI 1967

Løpedag -

Søknaden alment tilgjengelig fra 1.VII 1968

Søknaden utlagt og utlegningskrift utgitt 7.VI 1971

Prioritet begjært fra: -

The UPJOHN COMPANY,
301 Henrietta Street, Kalamazoo, Mich., USA.

Oppfinner: Donald Joseph Mason, 4802 Romence Road, Portage,
Mich. og Alexander Demetrios Argoudelis, 751
Keenway Circle, Kalamazoo, Mich., USA.

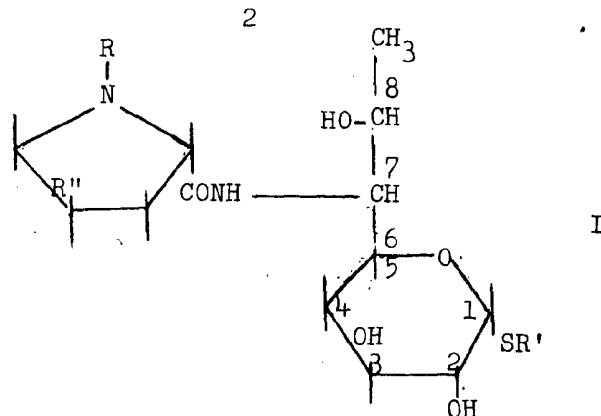
Fullmektig: Siv.ing. Erling Quande.

Fremgangsmåte ved fremstilling av anti-
biotikumet lincomycin S.

Foreliggende oppfinnelse angår fremstilling av en ny for-
bindelse N-demethyl-N-ethylincomycin C, også benevnt lincomycin
S (U-25,468).

Ved foreliggende fremgangsmåte fremstilles antibiotikumet
lincomycin S med formelen:

122237



hvor R og R' er ethyl og R'' er n-propyl, eller salter derav, og fremgangsmåten er særpreget ved at *Streptomyces lincolnensis* var. *lincolnensis* dyrkes i et vandig næringsmedium i nærvær av tilsatt ethionin under aerobe betingelser, hvorpå det derved dannede lincomycin S skilles fra samtidig dannede andre lincomyciner og, om ønskes, overføres til et salt.

Lincomycin S er en basisk forbindelse med hemmende virkning på veksten av Gram-positive og Gram-negative bakterier, f.eks. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus hemolyticus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* og *Salmonella schottmülleri*. Lincomycin S kan derfor benyttes alene eller sammen med andre antibiotiske midler for å hindre vekst av eller for å redusere antallet av bakterier, som angitt ovenfor, under forskjellige omgivelser. Det kan f.eks. benyttes som desinfeksjonsmiddel for forskjellig tannbehandlings- og medisinsk utstyr som er infisert med *Staphylococcus aureus*. Det kan også benyttes i vaskeoppløsninger for sanitærformål, som f.eks. for håndvasking, og for rensing av utstyr, gulver eller møbler i forurensede værelser eller laboratorier. Det kan også benyttes som industrielt konserveringsmiddel, f.eks. som bakteriostatisk rensemiddel for vaskede klær og for impregnering av papir og tekstiler. Det er også anvendbart for å undertrykke veksten av ømfintlige organismer i skålforsøk og andre mikrobiologiske media.

Den actinomycet som anvendes for fremstilling av lincomycin S ved foreliggende fremgangsmåte, er *Streptomyces lincolnensis* var. *lincolnensis*. Dette er en velkjent actinomycet som er deponert i den permanente samling til the Northern Utilization and Research Division, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, U.S.A. Dens registreringsnummer i denne samling er NRRL 2936.

Lincomycin S er strukturmessig beslektet med antibiotikaene Lincomycin, lincomycin B (U-21,699) og lincomycin C (U-11,921).

Strukturene er som følger under henvisning til formel I:

	$\frac{R}{\text{CH}_3}$	$\frac{R'}{\text{CH}_3}$	$\frac{R''}{\text{C}_3\text{H}_7}$
Lincomycin	$\frac{R}{\text{CH}_3}$	$\frac{R'}{\text{CH}_3}$	$\frac{R''}{\text{C}_3\text{H}_7}$
Lincomycin B	CH_3	CH_3	C_2H_5
Lincomycin C	CH_3	C_2H_5	C_3H_7
Lincomycin S	C_2H_5	C_2H_5	C_3H_7

Kjemiske og fysikalske egenskaper til lincomycin S-hydrogenklorid

Krystallinsk lincomycin S-hydrogenklorid har følgende fysikalske og kjemiske egenskaper:

Beregnet for $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_6\text{S} \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$: C 49,12, H 8,47, O 22,95, H 5,74, S 6,57. Cl 7,27.

Molekylvekt: 488,5 (beregnet)

Optisk dreining: $[\alpha]_D^{25} = +144,5^\circ$ (c, 0,38 vann).

Infrarødt spektrum: Lincomycin S-hydrogenklorid viser topper ved de følgende bølgelengder uttrykt i reciproke centimetre ved bruk av en KBr-skive:

3350 (S)	1456 (M)	993 (M)
3060 (M)	1392 (M)	977 (M)
2960 (S)	1320 (M)	900 (W)
2920 (S)	1264 (M)	867 (W)
2865 (M)	1210 (W)	801 (M)
2720 (W)	1143 (M)	750 (W)
1680 (S)	1095 (S)	707 (W)
1562 (S)	1077 (S)	675 (M)
1545 (M)	1048 (S)	

Lincomycin S-hydrogenklorid viser topper ved de følgende bølgelengder uttrykt i reciproke centimetre ved undersøkelse i en mineraloljesuspensjon:

3310 (S)	1545 (M)	1095 (S)
3060 (M)	1460 (S) (olje)	1077 (S)
2950 (S) (olje)	1378 (S) (olje)	1049 (S)
2920 (S) (olje)	1365 (M)	991 (M)
2860 (S) (olje)	1338 (M)	977 (M)
2850 (S) (olje)	1300 (M)	900 (W)
2720 (M)	1262 (M)	867 (M)
1683 (S)	1210 (M)	801 (M)
1567 (M)	1142 (M)	713 (M)
		675 (M)

Båndintensiteter i de ovennevnte IR-spektra er angitt som "S", "M" og "W" resp. og er tilnærmede i overensstemmelse med bakgrunnen i nærheten av båndene. Et "S"-bånd har samme intensitetsgrad som det sterkeste bånd i spektret. "M"-båndene er mellom 1/3 og 2/3 ganger så intense som det sterkeste bånd, og "W"-båndene er mindre enn 1/3 ganger så intense som det sterkeste bånd.

Oppløselighet: Lincomycin S-hydrogenklorid er oppløselig i vann og methanol. Det er moderat oppløselig i 95 % ethanol eller absolutt ethanol og forholdsvis uoppløselig i aceton, ethylacetat og klorerte og mettede hydrocarbonoppløsningsmidler.

Selv om lincomycin S er strukturmessig beslektet med lincomycin, lincomycin B og lincomycin C, er det et klart forskjellig antibiotikum med overraskende antibakterielle egenskaper. Lincomycin, lincomycin B og lincomycin C er antibakterielt aktive overfor Gram-positive organismer mens lincomycin S ikke bare er aktivt overfor Gram-positive organismer, men også overfor Gram-negative organismer. En sammenligning mellom lincomycin og lincomycin S overfor vanlige Gram-positive og Gram-negative organismer er gjengitt i tabell I.

Antibakteriell prøvemethode

Det antibakterielle spektrum ble bestemt ved anvendelse av en rørfortynningsmetode med BHI (Brain Heart Infusion Broth, Difco, Detroit, Michigan) som media. Prøverørene (18 x 150 mm) ble fremstilt på vanlig måte som beskrevet i Snell, E.E., "Vitamin Methods", bind 1, Academic Press, Inc., New York 1950, side 327. Forsøksorganismer som var dyrket i 18 timer ved 37°C, ble benyttet for innpodning av forsøksmediet. Prøvene ble avlest etter 20 timer.

Tabell I

<u>Forsøksorganismer</u>	<u>Minste hemmende konsentrasjon i mcg/ml</u>	
	<u>Lincomycin</u>	<u>Lincomycin S</u>
S.aureus	0,8	0,4
Streptococcus hemolyticus	0,4	0,4
Streptococcus faecalis	0,4	0,4
E. coli	> 200	50
K.pneumoniae	50	12,5
S. schottmuelleri	>200	50

Det har nu vist seg at når ethinnin tilsettes til en gjæringsvæske og man benytter mikroorganismen *Streptomyces lincolnensis* var. *lincolnensis*, fremstilles ikke bare lincomycin C og noe lincomycin og lincomycin B, men også lincomycin S. Ved de vanlige fremgangsmåter for isolering av lincomycin, lincomycin B og lincomycin C fra næringsmedier inneholdende disse er hittil lincomycin S blitt ødelagt eller dets isolering og oppdagelse blitt hindret. Ved behandlingen av slike næringsmedier ble lincomycin, lincomycin B og lincomycin C isolert og restene kastet. Selv om lincomycin S således ble dannet sammen med lincomycin, lincomycin B og lincomycin C, har det hittil ikke vært kjent, erkjent eller utvunnet i en nyttig og gjenkjennelig form. Ved foreliggende fremgangsmåte kan lincomycin S separeres og utvinnes uten å være forurenset av lincomycin, lincomycin B, lincomycin C og lignende ledsagere.

Selv om lincomycin S kan fremstilles i en gjæringsvæske som beskrevet i eksempel 1 i U.S. patent nr. 3 086 912 ved tilsetning av ethionin, er produksjonen av lincomycin S i denne gjæringsvæske utilstrekkelig til at det effektivt kan gjenvinnes. Et foretrukket medium for fremstilling av lincomycin S er et syntetisk næringsmedium, som vist i eksemplet, hvortil ethionin tilsettes. Carbonkilden i dette medium er glucosemonohydrat og nitrogenkilden er ammoniumnitrat. Spormetaller som sink, jern og magnesium settes til mediet. Selv om det foretrukne medium for tiden produserer den hittil høyeste mengde utvinnbart lincomycin S, er det klart at mediet kan varieres på en måte som er velkjent for fagmannen ved anvendelse av andre carbon- og nitrogenkilder. Av andre carbonkilder kan nevnes sukker, sucrose, glycerol, stivelse, maisstivelse, galactose, dextrin, melasse og lignende. Som andre nitrogenkilder kan benyttes maisstøpevann, gjær, autolysert bryggerigjær uten faste stoffer, soyamel, bomullsfrömel, maismel, melketörrstoffer, bukspyttfordøyelsesprodukt av casein, oppløselige produkter fra destillerier, fiskemel, animalske peptonvæsker, kjøtt og benavfall etc.

Fremstilling av lincomycin S kan utføres ved en hvilken som helst temperatur som vil gi tilfredsstillende vekst av mikroorganismen, f.eks. mellom ca. 18 - 40°C, fortrinnsvis 25 - 30°C. Den optimale fremstilling av forbindelsen oppnåes i alminnelighet i løpet av 2 - 10 dager. Mediet holder seg meget nær nøytrali-

122237

6

tetspunktet eller er noe basisk under gjæringen. Den avsluttende pH er delvis avhengig av de eventuelle puffere som er tilstede, og delvis av næringsmediets opprinnelige pH som fortrinnsvis reguleres til ca. 6 - 8 før sterilisering.

Når dyrkingen utføres i store beholdere og tanker, foretrekkes det å anvende den for innpodning benyttede mikroorganisme i vegetativ form fremfor i sporeform for å unngå en sterk forsinkel-
se i fremstillingen av den nye forbindelse og den dermed følgende ueffektive utnyttelse av produksjonsutstyret. Det foretrekkes derfor å fremstille en vegetativ podeorganisme i en næringsvæske ved å innpode i næringsvæsken en alikvot mengde av en jordkultur eller skråkultur. Når en ung, aktiv vegetativ podeorganisme er blitt dannet på denne måte, overføres den aseptisk til store beholdere eller tanker. Mediet i hvilket den vegetative podeorganisme fremstilles, kan være det samme som, eller forskjellig fra, det medium som benyttes for fremstilling av den nye forbindelse så lenge mediet sikrer god vekst av mikroorganismen.

Ved en foretrukken dyrkning for fremstilling av lincomycin S tilsettes ca. 500 mg ethionin pr. liter til gjæringsvæsken etter 72 timer. En hvilken som helst større eller mindre mengde, f.eks. ca. 0,5 - 4 mg/ml, som gir effektiv fremstilling av lincomycin S, kan anvendes. Gjæringsvæsken opparbeides så etter 6 dager. Både DL-ethionin eller L-ethionin kan benyttes, men tilsetning av L-ethionin gir en mer effektiv fremstilling av lincomycin S. Uansett hvilken av de to ethioninformen som benyttes, kan det være tilstede en viss giftvirkning som hindrer veksten av mikroorganismen og som kan redusere utbyttet av lincomycin S i næringsvæsken. Denne forgiftning kan minskes ved å sette ethionin til gjæringsvæsken når denne er ca. 48 - 72 timer gammel. Tilsetningen kan utføres kontinuerlig, halvkontinuerlig eller ved andre metoder så lenge konsentrasjonen av ethionin i gjæringsvæsken ikke påvirker veksten av mikroorganismen så sterkt at fremstillingen av lincomycin lider under dette.

En rekke fremgangsmåter kan benyttes for isolering og rensning av lincomycin S, f.eks. ekstraksjon med oppløsningsmiddel, væske-væskedeling i et Craig-apparat, benyttelse av adsorpsjonsmidler og krystallisering fra oppløsningsmidler. Det foretrekkes å filtrere hele gjæringsvæsken ved hjelp av et filtreringshjelpemiddel, f.eks. diatoméjord. Filtratet reguleres så til en alkalisk

pH av ca. 10,0 og ekstraheres med et oppløsningsmiddel som ikke er blandbart med vann. Det foretrekkes å benytte metylenklorid. Oppløsningsmiddelekstrakten konsentreres til tørrhet og gir et tørt råpreparat inneholdende lincomycin, lincomycin B, lincomycin C og lincomycin S. Det siste kan separeres fra de andre lincomyciner ved kolonnekromatografi under anvendelse av et oppløsningsmiddelsystem i hvilket lincomycin S er oppløselig for å eluere lincomycin S fra kolonnen. Ved en foretrukken fremgangsmåte ledes et råpreparat inneholdende lincomycin S og andre lincomyciner over en kromatografikolonne med silicagel. Kolonnen elueres med et oppløsningsmiddelsystem bestående av methylethylketon : aceton : vann i forholdene 100 : 30 : 5. Lincomycin S elueres først fra en slik kolonne. Kolonnen kan sålede elueres og fraksjoner samles og analyseres ved tynnskiktskromatografi for påvisning av lincomycin S. Tynnskiktskromatografien utføres på "Silica gel G"-plater av 0,12 - 0,5 mm tykkelse under anvendelse av methylethylketon : aceton : vann (140 : 40 : 22 v/v) som elueringsvæske. De fraksjoner som bare inneholder lincomycin S, kan samles for viderebehandling. De fraksjoner som inneholder lincomycin S og andre lincomyciner, kan samles og påny ledes gjennom kolonnen. Dersom fraksjonene inneholder lincomycin S og andre lincomyciner, foretrekkes det å anrike disse fraksjoners innhold av lincomycin S ved å utsette disse for en motstrømsfordeling i et Craig-apparat under anvendelse av et oppløsningsmiddelsystem bestående av like volumer av 1-butanol og vann. De anrikede fraksjoner fra motstrømsfordelingen kan så ledes over en kromatografikolonne som beskrevet ovenfor.

Råpreparat av lincomycin S som inneholder andre lincomyciner, kan også behandles ved hjelp av motstrømsfordeling i et Craig-apparat som angitt ovenfor før den første passering over en kromatografikolonne. Denne fremgangsmåte kan med fordel benyttes dersom råpreparatet av lincomycin S inneholder en forholdsvis stor mengde andre lincomyciner.

Selv om det foretrekkes å benytte silicagelkromatografi for isolering av lincomycin S fra materialer inneholdende lincomycin S og andre lincomyciner, kan det også benyttes andre kromatografimetoder som f.eks. fordelingskromatografi og adsorpsjonskromatografi.

Krystallisering og rekrystallisering av lincomycin S-hydrogenklorid utføres ved å løse opp et antibiotisk preparat bestående av

lincomycin S-hydrogenklorid i vann, tilsetning av et med vann blandbart oppløsningsmiddel, f.eks. aceton, methanol, ethanol eller 2-propanol og så avkjøle det hele for å igangsette eller fullstendiggjøre krystallisering. Krystallene frafiltreres og vaskes med et vandig oppløsningsmiddel og eventuelt med et vannfritt oppløsningsmiddel og tørres så under vakuum.

Den nye forbindelse fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse kan også utvinnes fra det filtrerte brygg ved absorpsjon på kationvekslerharpikser. Harpikser både av carboxylsyre- og sulfonsyre-typen kan benyttes. Egnede carboxylsyreharpikser omfatter polyacrylsyreharpikser fremstilt ved sampolymerisering av acrylsyre og divinylbenzen ved den fremgangsmåte som er beskrevet på side 87 i Kunin, "Ion Exchange Resins", 2. utgave (1958), John Wiley and Sons, Inc. Harpikser av denne type markedsføres under betegnelsene "Amberlite IRC-50" og "Zeokarb 226". Egnede sulfonsyreharpikser omfatter med divinylbenzen tverbundne, kjernesulfonerte polystyrenharpikser fremstilt ved den fremgangsmåte som er beskrevet på side 84 i den ovennevnte bok av Kunin. Sulfonerte kationvekslerharpikser av denne type markedsføres under betegnelsene "Dowex-50", "Amberlite IR-120", "Nalcite HCR", "Chempro C-20", "Permutit Q" og "Zeokarb 225".

Antibiotikumet elueres fra harpiksen med en syre, fortrinnsvis ved en pH under pKa-verdien til den kationvekslerharpiks som benyttes. Tilfredsstillende resultat oppnåes ved en pH av ca. 1-6. Eluatets pH reguleres til 7,5 - 8,5 med en base, f.eks. natriumhydroxyd, eller med en sterkt basisk anionvekslerharpiks. Eluatene kan videre renses ved hjelp av kromatografi og motstrømsfordeling som beskrevet ovenfor. Egnede anionvekslerharpikser for dette formål fåes ved den fremgangsmåte som er beskrevet på sidene 88 og 97 i den ovennevnte bok av Kunin. Ifølge denne fremgangsmåte klor-metyleres polystyren som eventuelt kan være tverrbundet med divinylbenzen fremstilt ved den på side 84 i Kunin's bok angitte fremgangsmåte, og kvaternering med trimethylamin eller dimethylethanolamin ved den fremgangsmåte som er beskrevet på side 97 i den ovennevnte bok av Kunin. Anionvekslerharpikser av denne type markedsføres under betegnelsene "Dowex-2", "Dowex-20", "Amberlite IRA-400", "Duolite A-102" og "Permutit S-1".

Forskjellige syreaddisjonssalter av lincomycin S kan fremstil-

les ved å nøytralisere den frie base med den egnede syre til en pH av under ca. 7,0, fortrinnsvis ca. 2 - 6. Av egnede syrer kan nevnes saltsyre, svovelsyre, fosforsyre, eddiksyre, ravsyre, sitronsyre, melkesyre, maleinsyre, fumarsyre, pamoinsyre, cholin-syre, palmitinsyre, slimsyre, kamfersyre, glutarsyre, glycolsyre, fthalsyre, tartarsyre, laurinsyre, stearinsyre, salicylsyre, 3-fenylsalicylsyre, 5-fenylsalicylsyre, 3-metylglutarsyre, ortho-sulfonbenzoesyre, cyclohexansulfaminsyre, cyclopentanpropionsyre, 1,2-cyclohexandicarboxylsyre, 4-cyclohexencarboxylsyre, octadecenylravsyre, octenylravsyre, methansulfonsyre, benzensulfonsyre, helianthinsyre, Reinecke's syre, dimetyldithiocarbaminsyre, sorbinsyre, monokloreddiksyre, undecylensyre, 4'-hydroxyazobenzon-4-sulfonsyre, octadecylsvovelsyre, picrinsyre, benzoesyre, kanelisyre og lignende syrer.

Salter av lincomycin S kan anvendes for de samme biologiske formål som den frie base eller de kan anvendes for å anrike antibiotikumet ved suksessive overførsler av antibiotikumet fra protonert til ikke-protonerte former og vice versa, spesielt med andre mellomliggende behandlingsmåter som f.eks. oppløsningsmiddel-ekstraksjoner og vaskinger, kromatografi og fraksjonerte væske-væske-ekstraksjoner. Antibiotikumet kan f.eks. omdannes til et uoppløselig salt, f.eks. picratet, som så kan utsettes for rense-behandlinger og så anvendes for regenerering av antibiotikumet som fri base ved behandling med alkali. Antibiotikumet kan også omdannes til et vannoppløselig salt, som f.eks. hydrokloridet eller sulfatet, og den vandige oppløsning av saltet ekstraheres med forskjellige med vann ublandbare oppløsningsmidler for antibiotikumet regenereres som fri base ved behandling med alkali av den således ekstraherte sure oppløsning.

Lincomycin S kan anvendes for å kontrollere *S. aureus* på vaskede og stablede spisebestikk. Det kan også benyttes som desinfeksjonsmiddel på forskjellig tannlege- legeutstyr som er forurenset med *S. aureus*. Lincomycin S er aktivt overfor *Bacillus subtilis* og kan anvendes for behandling av utklekkingssteder for silkeormer for å unngå eller minske infeksjoner forårsaket av denne organisme. Det kan også benyttes for å minske eller hindre lukt forårsaket av denne organisme i fisk og fiskekasser.

Med mindre annet er angitt, er alle prosenter i de etterfølgende eksempler vektprosent, og alle oppløsningsmiddelblan-

122237

10

dingen er uttrykt i vol%.

Eksempel

Gjæring

En skråkultur av *Streptomyces lincolnensis* var. *lincolnensis*, NRRL 2936, anvendes for å innpode en rekke 500 ml's Erlenmeyer-kolber hver inneholdende 100 ml podemedium bestående av de følgende bestanddeler:

"Yeastolac" [*]	10 g
Glucosemonohydrat	10 g
"N-Z-Amine B" ^{**}	5 g
Ledningsvann q.s.	1 liter

* "Yeastolac" er et proteinhydrolysat av gjærceller

** "N-Z-Amine B" er Sheffield's enzymatiske omdannelsesprodukt av casein.

Podemediets pH etter sterilisering er ca. 7,3. Dyrkningen foretas i 2 dager ved 28°C på en Gump roterende rystemaskin med 250 omdreininger pr. minutt og 63,5 mm utslag.

Det ble foretatt en 5 % podning med den ovenfor beskrevne dyrkning (5 ml) av hver av en serie av 500 ml Erlenmeyerkolber hver inneholdende 100 ml av det følgende gjæringsmedium:

Glucosemonohydrat	30 g/liter
Natriumcitrat	3 g/liter
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,001g/liter
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,001g/liter
MgSO ₄	1 g/liter
K ₂ HPO ₄	2,5 g/liter
NaCl	0,5 g/liter
NH ₄ NO ₃	2,0 g/liter
Avionisert vann	1 liter

Glucosemonohydratet og natriumcitratet steriliseres adskilt fra saltene. Gjæringsmediets pH etter sterilisering er 7,3-7,8. De innpodede gjæringskolber anbringes på en Gump roterende rystemaskin med en omdreinings hastighet av 250 omdreininger pr. minutt og et 63,5 mm utslag. Rysteren er anbragt i et incubatorrom hvor det opprettholdes en temperatur av 28°C. Etter 72 timers gjæring settes 500 mg DL-ethionin pr. liter aseptisk til gjæringskolbene. Innholdet i gjæringskolbene avtrekkes etter 6 dager.

Gjæringer kan på samme måte utføres med L-ethionin istedenfor DL-ethionin.

Utvinning

Gjæringsvæsken fra den ovenfor beskrevne dyrkning filtreres ved den etter gjæringen foreliggende pH under anvendelse av et filtreringshjelpemiddel, f.eks. diatoméjord. Mycelkaken vaskes med vann, og kaken kastes. Det filtrerte brygg og vaskevannet bringes sammen, og blandingens pH reguleres til 10,0 med en 50 % oppløsning av natriumhydroxyd og ekstraheres så tre ganger hver gang med 1/4 volum metylenklorid. Metylenkloridekstraktene føres sammen og konsentreres til en olje.

Rensning ved hjelp av kromatografi

Et oljepreparat inneholdende lincomycin S, som angitt ovenfor, oppløses i methanolholdig hydrogenklorid ved en pH av ca. 2,0. Ved tilsetning av denne oppløsning til ether dannes et bunnfall. Dette bunnfall som består av lincomycin, lincomycin B, lincomycin C og lincomycin S isoleres ved filtrering. Preparatet settes så til en silicagelholdig kromatografikolonne fremstilt som følger:

Silicagel (Merck-Darmstadt No. 7734, 0,05 - 0,20 mm) helles i en glasskolonne (med en indre diameter av 6,5 cm) og får sige sammen ved atmosfæretrykk. Det ovenfor beskrevne preparat inneholdende lincomycin S oppløses i absolutt methanol. Denne oppløsning blandes med silicagelen under dannelselse av en oppslemning, og blandingen tørres under vakuum i løpet av ca. 20 timer. Materialet tilføres så på toppen av silicagelkolonnen. Silicagel anbringes så over dette lag, og kolonnen elueres med et oppløsningsmiddelssystem bestående av methylethylketon : aceton : vann (100 : 30 : 5).

Fraksjoner som bare inneholder lincomycin S, elueres fra kolonnen for de andre lincomyciner. Nærværet av lincomycin S fastslåes ved tynnskiktskromatografi, som angitt ovenfor. Disse fraksjoner som bare inneholder lincomycin S, samles og konsentreres til tørrhet. Resten oppløses i N methanolisk hydrogenklorid ved en pH av ca. 2,0. Denne oppløsning konsentreres igjen til tørrhet. Resten oppløses i absolutt methanol, og denne oppløsning blandes med ether. Etterhvert som blandingen konsentreres langsomt i en roterende fordampner, utkrystalliseres et farveløst materiale som ved hjelp av tynnskiktskromatografi viser seg å

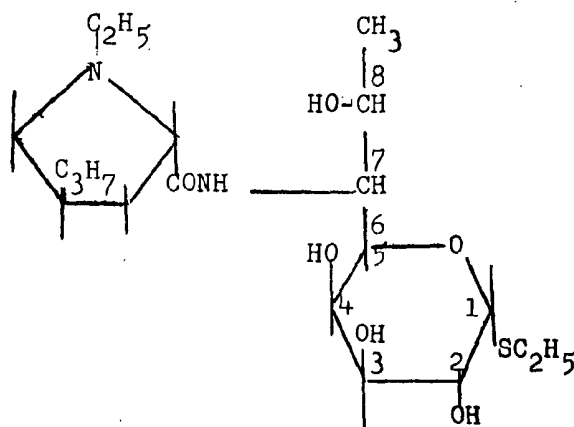
122237

12

være lincomycin S. Disse krystaller isoleres ved filtrering og tørres. Ytterligere krystallinsk lincomycin S gjenvinnes fra filtratet fra den ovennevnte krystallisering ved konsentrering av filtratet til tørrhet. Resten oppløses i absolutt methanol, og denne oppløsning blandes med ethylether. Blandingen omrøres i ca. 4 timer. De krystaller av lincomycin S som dannes, isoleres ved filtrering og tørres.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte ved fremstilling av antibiotikumet lincomycin S med formelen:



eller salter derav, k a r a k t e r i s e r t v e d at Streptomyces lincolnensis var. lincolnensis dyrkes i et vandig næringsmedium i nærvær av tilsatt ethionin under aerobe betingelser, hvorpå det derved dannede lincomycin S skilles fra samtidig dannede andre lincomyciner og, om ønskes, overføres til et salt.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at adskillelsen utføres ved kromatografi på en kromatografisk søyle av silicagel under anvendelse av et elueringsoppløsningsmiddel bestående av methylethylketon, aceton og vann i forholdet 100 : 30 : 5.

Anførte publikasjoner: -