



Patent dodatkowy
do patentu

Kl. 30 h, 6

Zgłoszono: 15.VI.1967 (P 121 168)

Pierwszeństwo: 17.VI.1966 Stany
Zjednoczone
Ameryki

MKP C 12 d, 9/14

Opublikowano: 5.VIII.1970

UKD

Właściciel patentu: The Upjohn Company, Kalamazoo (Stany Zjednoczone Ameryki)

Sposób otrzymywania linkomycyny S

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania N-demetylo-N-etylolinkomycyny C, nazywanej również linkomycyną S.

Linkomycyna S jest związkiem organicznym, wytwarzanym według wynalazku przez hodowlę drobnoustrojów (actinomyceta) produkujących linkomycynę, na wodnej pożywce w obecności dodatku etioniny, w warunkach tlenowych. Linkomycynie S odpowiada wzór ogólny 1, w którym R i R' oznaczają rodniki etylowe, a R'' oznacza rodnik n-propylowy, ściślej wzór 2.

Linkomycyna S jest związkiem zasadowym, mającym właściwości przeciwdziałania wzrostowi bakterii gramo-ujemnych i gramo-dodatnich, na przykład *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus hemolyticus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Salmonella schottmuelleri*. Zgodnie z tym, linkomycyna S może być używana sama lub w połączeniu z innymi środkami antybiotycznymi dla zapobiegania wzrostowi, lub dla zmniejszenia liczby bakterii, w różnych środowiskach. Można ją stosować na przykład jako środek dezynfekcyjny do różnych instrumentów dentystycznych i lekarskich, zanieczyszczonych przez *Staphylococcus aureus*. Jest ona użyteczna także w roztworach służących do celów sanitarnych, jak mycie rąk, czyszczenie instrumentów, mycie podłóg lub mebli w zakażonych pomieszczeniach lub laboratoriach, jest także użyteczna jako środek ochrony w dziedzinie

2

przemysłowej, na przykład jako kąpiel bakterio-
statyczna dla pranej odzieży, czy do nasycania
papieru i tkanin; jest ona także użyteczna do
powstrzymywania wzrostu, wrażliwych organiz-
mów w próbach płytkowych i innych środowis-
kach mikrobiologicznych.

Jako actinomycetes do wytwarzania linkomycy-
ny S w sposobie według wynalazku stosuje się
Streptomyces lincolnensis var, *Lincolnensis*. Szczep
ten posiada nr NRRL 2936 i jest zdeponowany w
Northern Regional Research Laboratories, U. S.,
Department of Agriculture, Peoria, Illinois,
U.S.A.

Linkomycyna S jest strukturalnie pokrewna
antybiotycznym linkomycynom, linkomycynie B
(U-21,699) i linkomycynie C (U-11,921). Biorąc za
podstawę wzór 1, budowa tych linkomycyn jest
następująca:

	R	R'	R''
Linkomycyna	CH ₃	CH ₃	C ₃ H ₇
Linkomycyna B	CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₅
Linkomycyna C	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₃ H ₇
Linkomycyna S	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	C ₃ H ₇

Linkomycyna S, chociaż strukturalnie pokrewna
linkomycynie, linkomycynie B i linkomycynie C,
jest wyraźnie innym antybiotykiem, mającym nie-
oczekiwane właściwości przeciwbakteryjne. Lin-

komycyna, linkomycyna B i linkomycyna C mają działanie przeciwbakteryjne w stosunku do drobnoustrojów gramo-dodatnich, podczas gdy linkomycyna S jest czynna nie tylko w stosunku do drobnoustrojów gramo-dodatnich, ale także w stosunku do gramo-ujemnych drobnoustrojów. Niżej podana tabela 1 przedstawia porównanie działania linkomycyny i linkomycyny S wobec gramo-dodatnich i gramo-ujemnych organizmów.

Tabela 1

Badane organizmy	Minimalne stężenie inhibicyjne w µg/ml	
	Linkomycyna	Linkomycyna
<i>S. aureus</i>	0,8	0,4
<i>Streptococcus hemolyticus</i>	0,4	0,4
<i>Streptococcus faecalis</i>	0,4	0,4
<i>E. coli</i>	ponad 200	50
<i>K. pneumoniae</i>	50	12,5
<i>S. Schottmuelleri</i>	ponad 200	50

Stwierdzono, że jeżeli prowadzi się fermentację za pomocą mikroorganizmów w *Streptomyces lincolnensis* var. *lincolnensis* w obecności dodatku etioniny (o wzorze $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$) wówczas oprócz linkomycyny C i niewielkich ilości linkomycyny i linkomycyny B tworzy się linkomycyna S. Linkomycyna S jest nowym antybiotykiem. W znanych metodach otrzymywano linkomycynę, linkomycynę B i linkomycynę C i po wyodrębnieniu tych związków z brzezki pofermentacyjnej pozostałość odrzućano. O ile więc nawet linkomycyna S tworzyła się, to jednak w tych warunkach fermentacyjnych albo ulegała rozkładowi albo warunki te uniemożliwiały jej wydzielanie, bo dotychczas nie była ani rozpoznana, ani uzyskiwana w stopniu umożliwiającym jej zidentyfikowanie. Dopiero prowadzenie fermentacji sposobem według wynalazku w obecności etioniny powoduje tworzenie się linkomycyny S i umożliwia jej wyosobnienie i oddzielenie od powstających równocześnie linkomycyny, linkomycyny B, linkomycyny C i podobnych związków towarzyszących.

Opis patentowy Stan. Zjedn. Ameryki nr 3.086.912 omawia sposób otrzymywania wyłącznie linkomycyny, przez fermentację prowadzoną za pomocą *Streptomyces lincolnensis* var. *lincolnensis*, NRRL 2936 w środowisku wodnym, w warunkach aerobowych.

Chociaż linkomycynę S można wytwarzać prowadząc fermentację w takim samym środowisku jak opisane w wyżej cytowanym opisie patentowym St. Zjedn. Ameryki (przykład I) z tym jednak warunkiem, że dodaje się etioninę, jednakże wydajność linkomycyny S w tych warunkach, nie jest zadowalająca. Korzystnie linkomycynę S wytwarza się stosując syntetyczne środowisko fermentacyjne, z dodatkiem etioniny. Źródłem wę-

gla w takim środowisku jest jednowodnian glukozy, a źródłem azotu — azotan amonowy. Do środowiska tego dodaje się śladowe ilości metali, takich jak cynk, żelazo i magnez. Chociaż to środowisko bardzo korzystne dostarcza największej ilości uzyskiwalnej linkomycyny S oczywistym jest dla fachowców w tej dziedzinie, że można stosować inne środowiska, przez użycie innych źródeł węgla i azotu. Takimi innymi źródłami węgla mogą być: brunatny cukier, sacharoza, glicerol, skrobia, skrobia zbożowa, kukurydziana, galaktoza, dekstryna, melasa i podobne. Innymi źródłami azotu mogą być: namok kukurydziany, drożdże, autolizowane drożdże browarnicze wolne od części stałych, mączka sojowa, mączka z nasion bawełny, mąka kukurydziana, stałe substancje mleka, pankreatynowy wyciąg kazelny, filtraty brzezki gorzelniczej, mączka rybną, zwierzęce płyny peptonowe, skwarki (pozostałość po wytopieniu tłuszczu z mięsa) i mączka kostna i tym podobne.

Linkomycynę można wytwarzać w temperaturze, sprzyjającej zadowalającemu wzrostowi mikroorganizmów, na przykład w temperaturze 18 — 40°C, korzystnie około 25 — 30°C. Zwykle optimum produkcji związku uzyskuje się w ciągu około 2 — 10 dni. Środowisko normalnie pozostaje prawie obojętne lub zasadowe podczas fermentacji. Końcowa wartość pH zależy częściowo od obecności substancji buforowych, jeżeli jakieś zostały użyte, a częściowo od początkowej wartości pH, którą korzystnie jest przed sterylizacją doprowadzić do około 6 — 8.

Jeżeli wzrost jest prowadzony w dużych naczyniach i zbiornikach, korzystniej jest użyć wegetatywnych niż przetrwałnikowych form mikroorganizmów do szczepienia, aby uniknąć dużego opóźnienia w otrzymywaniu nowego związku i związanego z tym nieefektywnego wykorzystania wyposażenia. Zgodnie z tym korzystnie jest przygotować wegetatywny materiał do szczepienia na bulionowej pożywce, drogą szczepienia bulionu.

Otrzymany w ten sposób młody, czynny wegetatywny materiał do szczepienia następnie przenosi się z zachowaniem warunków aseptycznych, do dużych kadzi lub zbiorników. Medium używane do produkcji materiału do szczepienia może być to samo, lub inne niż medium używane do produkcji nowego związku, jeżeli jest ono takie, że daje dobry wzrost mikroorganizmów.

Korzystny dla linkomycyny S sposób fermentacji polega na dodaniu do fermentacji w przybliżeniu 500 mg/litr etioniny po 72 godzinach. Można stosować większą lub mniejszą ilość etioniny, efektywną dla produkcji linkomycyny S, od około 0,5 mg/ml do około 4 mg/ml. Produkty fermentacji zbiera się po 6 dniach. Można stosować zarówno DL-etioninę jak i L-etioninę, ale dodatek L-etioniny daje bardziej wydajną produkcję linkomycyny S. Jakakolwiek etioninę zastosuje się, może ona podzielać nieco toksycznie na wzrost mikroorganizmów, co może zmniejszyć ostateczny uzysk linkomycyny S w fermentacji. To toksyczne działanie można sprowadzić do minimum przez dodanie etioniny między 48 a 72 godziną fermentacji.

tacji. Zasilanie może odbywać się metodą ciągłą, pociągłą lub innymi sposobami, byle tylko stężenie etioniny nie wpływało na wzrost mikroorganizmów w stopniu szkodliwym dla produkcji linkomycyny.

Do wyodrębniania i oczyszczania linkomycyny S można stosować różne metody, na przykład ekstrakcję rozpuszczalnikową, ekstrakcję cieczy cieczą w aparacie Craig'a, stosowanie adsorbentów i krystalizację z rozpuszczalników. Najdogodniejsza jest metoda, według której całą brzeczkę po fermentacji linkomycynowej S filtruje się z zastosowaniem pomocniczego materiału filtracyjnego na przykład ziemi okrzemkowej, jeżeli jest to potrzebne. Następnie przesącz alkaliczuje się do wartości pH około 10 i ekstrahuje rozpuszczalnikiem, nie mieszającym się z wodą. Najdogodniejszym rozpuszczalnikiem jest chlorek metylenowy. Ekstrakt rozpuszczalnikowy zateża się do sucha otrzymując surowy suchy preparat, zawierający linkomycynę S, linkomycynę, linkomycynę B i linkomycynę C. Linkomycyna S oddziela się od pozostałych linkomycyn drogą chromatografii kolumnowej przy zastosowaniu układu rozpuszczalników, w których linkomycyna S jest rozpuszczalna, w celu wyeluowania jej z kolumny. Korzystnie surowy preparat, zawierający linkomycynę S i inne linkomycyny przeprowadza się przez kolumnę chromatograficzną z żelom krzemionkowym. Kolumnę eluuje się mieszaniną rozpuszczalników, składającą się z ketonu metyloowoetylowego, acetonu i wody w stosunku objętościowym 100:30:5. Linkomycyna S jest eluowana pierwsza z kolumny. Tak więc kolumnę eluuje się, i frakcje zbiera i analizuje metodą chromatografii cienkowarstwowej, w celu wykrycia obecności linkomycyny S. Chromatografię prowadzi się na płytkach z żelu krzemionkowego G (E, Merck A. C., Darmstadt) o grubości od 0,12 do 0,5 mm stosując mieszaninę ketonu metyloowoetylowego, acetonu i wody, w stosunku objętościowym 140:40:22, jako środek eluujący. Frakcje, zawierające tylko linkomycynę S, zbiera się do dalszej obróbki. Frakcje zawierające linkomycynę S i inne linkomycyny, zbiera się i ponownie przeprowadza przez kolumnę. Frakcje zawierające linkomycynę S i inne linkomycyny, korzystnie „wzbogaca się” w linkomycynę S przez poddanie ich ekstrakcji przeciwwądowej w aparacie Craig'a, używając mieszaniny rozpuszczalników, składające się z równych objętości 1-butanolu i wody. Te wzbogacone frakcje z ekstrakcji przeciwwądowej następnie przeprowadza się przez kolumnę chromatograficzną w sposób wyżej opisany.

Alternatywnie, surowe preparaty linkomycyny S, zawierające inne linkomycyny, poddaje się przeciwwądowej ekstrakcji w aparacie Craig'a, jak opisano wyżej, przed pierwszym przejściem przez kolumnę chromatograficzną. Ten sposób stosuje się korzystnie, gdy nieoczyszczony preparat linkomycyny S zawiera stosunkowo dużą ilość innych linkomycyn.

Jakkolwiek chromatografia z użyciem żelu krzemionkowego jest korzystną metodą wydzielania

linkomycyny S z materiałów, zawierających linkomycynę S i inne linkomycyny, w zakres wynalazku wchodzi stosowanie również innych chromatografii, takich jak chromatografia podziałowa i adsorbcyjna.

Krystalizację, tak jak i rekrytalizację chlorowodoru linkomycyny S prowadzi się przez rozpuszczenie produktu antybiotycznego zawierającego chlorowodorek linkomycyny S w wodzie, dodanie mieszającego się z wodą rozpuszczalnika, na przykład acetonu, metanolu, etanolu lub 2-propanolu, a następnie ochłodzenie dla zapoczątkowania lub zakończenia krystalizacji. Kryształy odsącza się i przemywa wodnym rozpuszczalnikiem, oraz, jeżeli jest to pożądane, bezwodnym rozpuszczalnikiem, i suszy w próżni.

Nowy związek otrzymany sposobem według wynalazku, można odzyskiwać z przefiltrowanej brzeczkii przez adsorbcję na żywicach kationitowych. W tym celu można stosować żywice typu karboksylowego i sulfonowego. Korzystnie jako żywice karboksylowe stosuje się żywice poliakrylowe, otrzymywane przez kopolimeryzację kwasu akrylowego i dwuwinylobenzenu sposobem, opisanym przez Kunin'a „Jon Exchange Resins”, str. 87, wyd. 2, 1958, John Wiley and Sons, Inc. Karboksylowe żywice kationitowe tego typu znane są pod nazwą Amberlite IRC-50 i Zeckarb 226. Jako żywice sulfonowe stosuje się korzystnie sulfonowane pierścieniowe żywice polistyrenowe, połączone wiązaniem poprzecznym z dwuwinylobenzenem, otrzymywane sposobem podanym na str. 84 u Kunina, op. cit. Sulfonowe żywice kationitowe tego typu dostępne są pod nazwami handlowymi Dowex 50, Amberlite IR-120, Nalcite HCR, Chempro G-20, Permutit Q i Zeckarb 225.

Antybiotyk eluuje się z żywicy kwasem, korzystnie przy pH niższym, niż pKa użytej żywicy kationitowej. Zadowalające wyniki osiąga się pKa wartości pH około 1 — 6. Eluat alkaliczuje się do wartości pH = 7,5 — 8,5 na przykład wodorotlenkiem sodu lub silnie zasadową żywicą anionitową. Eluat następnie oczyszcza się na kolumnie chromatograficznej i przez ekstrakcję przeciwwądową, w sposób wyżej opisany. Odpowiednimi do tego celu żywicami anionitowymi są żywice otrzymane przez chlorometylowanie (sposobem opisanym na str. 88 i 97 cytowanej książki Kunina) polistyrenu, jeżeli jest to pożądane, to połączonego poprzecznym wiązaniem z dwuwinylobenzenem, otrzymanym sposobem podanym na str. 84 cytowanej książki Kunina, i czwartorzędowanie trójmetyloaminą lub dwumetyloaminą sposobem podanym na str. 97 cytowanej książki Kunina. Żywice anionitowe tego typu znane są pod nazwą Dowex-2, Dowex 20, Amberlite IRA-400, Duolite A-102 i Permutit S-1.

Różne sole addycyjne linkomycyny S można otrzymywać przez zobojętnienie wolnej zasady odpowiednim kwasem do wartości pH poniżej około 7,0, a korzystnie do pH około 2 — 6. Odpowiednimi do tego celu kwasami są: solny, siarkowy, fosforowy, octowy, bursztynowy, cytrynowy, mlekowy, maleinowy, fumarowy, cholowy, palmi-

tynowy, śluzowy, kamforowy, glutarowy, glikolowy, ftalowy, winowy, laurynowy, stearynowy, salicylowy, 3-fenylosalicylowy, 5-fenylosalicylowy, 3-metyloglutarowy, ortosulfobenzoesowy, cykloheksano-aminosulfonowy, cyklopentanopropionowy 1,2-cykloheksanodwukarboksylowy, 4-cykloheksanokarboksylowy, oktadecenylbursztynowy, oktenylbursztynowy, metanosulfonowy, benzenosulfonowy, heliantynowy, kwas Reinecke'a, dwumetylodwutiokarbamidowy, sorbinowy, jednochlorooctowy, undecylenowy, 4'-hydroksyazobenzeno-4-sulfonowy, oktadecylosiarkowy, pikrynowy, benzoesowy, cynamonowy i tym podobne.

Sole linkomycyny S można stosować do takich samych biologicznych celów jak wolną zasadę, lub też mogą być stosowane do wzbogacania antybiotyku przez kolejne przejścia od protonowej do nieprotonowej postaci i odwrotnie, szczególnie przy równoczesnym zastosowaniu innych sposobów obróbki, na przykład ekstrakcji rozpuszczalnikowej i przemywania, chromatografii i frakcyjnej ekstrakcji cieczy cieczą. Na przykład, antybiotyk można przeprowadzać w nierozpuszczalną sól taką jak pikrynian, którą można poddać oczyszczaniu, a następnie użyć do regeneracji antybiotyku w czystej postaci przez potraktowanie zasadą. Można też przeprowadzać antybiotyk w rozpuszczalną w wodzie sól, taką jak chlorowodorek lub siarczan, a następnie ekstrahować sól różnymi rozpuszczalnikami mieszającymi się z wodą, po czym regenerować antybiotyk w czystej postaci przez potraktowanie zasadą wyekstrahowanego roztworu soli.

Linkomycynę S można stosować do zwalczania bakterii *S. aureus* na mytych utensyliach związanych z żywieniem. Można ją również stosować jako środek dezynfekcyjny do różnych instrumentów lekarskich i dentystycznych zakażonych *S. aureus*. Linkomycyna S jest aktywna wobec *Bacillus subtilis* i może być stosowana w hodowli jedwabników w celu zapobiegania lub sprowadzenia do minimum zakażenia, spowodowanego przez te organizmy. Można ją także stosować do likwidowania lub sprowadzenia do minimum zapachu ryb i skrzynek na ryby, powodowanego przez ten organizm.

Następujące przykłady wyjaśniają bliżej wynalazek nie stanowiąc przy tym ograniczenia wynalazku. Wszystkie wielkości procentowe podane są wagowo, a mieszaniny rozpuszczalników w jednostkach objętości, o ile nie podano inaczej.

Przykład I. Linkomycyna S. Fermentacja. *Streptomyces lincolnensis* var. *Lincolnensis*, NRRL 2936 stosuje się do szczepienia szeregu 500 ml kolb Erlenmeyera, z których każda zawiera 100 ml. szczepionego medium, składającego się z następujących składników:

Yeastolac *)	10 g
Jednowodzian glikozy	10 g

*) Yeastolac stanowi hydrolizat proteinowy komórek drożdżowych

N-Z-Amína B**)
letnia woda q.s.

5 g
1 litr

5 Szczepione medium po sterylizacji ma wartość pH około 7,3. Posiew wzrasta przez 2 dni w temperaturze 28°C na obrotowej wstrząsarce Gump'a poruszającej się z prędkością 250 obr./min. i skoku 63,30 mm.

10 5% materiału szczepionego z opisanego wyżej posiewu (5 ml) dodaje się do każdej z 500 ml kolb Erlenmeyera, z których każda zawiera po 100 ml następującego medium fermentacyjnego:

15	Jednowodzian glikowy	30 g/litr
	Cytrynian sodu	3 g/litr
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,001 g/litr
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,001 g/litr
	MgSO ₄	1 g/litr
20	K ₂ HPO ₄	2,5 g/litr
	NaCl	0,5 g/litr
	NH ₄ NO ₃	2,0 g/litr
	Zdejonizowana woda do (q.s.)	1 litr

25 Jednowodzian glikozy i cytrynian sodu sterylizuje się oddzielnie od soli. Po sterylizacji wartość pH medium fermentacyjnego waha się w granicach 7,3 — 7,8. Zaszczepione kolby fermentacyjne umieszcza się w obrotowej wstrząsarce Gump'a, o 250 obr./min. i skoku 63,30 mm. Wstrząsarka znajduje się w pomieszczeniu termostatowym, gdzie utrzymuje się temperaturę 28°C. Po 72 godzinach trwania fermentacji dodaje się do kolb w warunkach aseptycznych 500 mg/l DL-etioniny. Rezultaty fermentacji zbiera się po 6 dniach.

35 Fermentację prowadzi się w taki sam sposób, jeżeli DL-etioninę zastąpi się L-etioniną.

40 Odzyskiwanie. Po fermentacji linkomycynowej S, przy wartości pH takim, jak w momencie zakończenia fermentacji, filtruje się brzeczkę z użyciem pomocniczych środków filtracyjnych, na przykład ziemi okrzemkowej, jeżeli jest to potrzebne. Placzkę grzybniozą przemywa się wodą, a następnie usuwa. Mieszaninę wody i filtrowanej brzeczki doprowadza się do wartości pH 10 za pomocą 50% roztworu wodorotlenku sodu, a następnie trzykrotnie ekstrahuje, za każdym razem jedną czwartą objętości chlorku metylenu. Wyciągi uzyskane chlorkiem metylenu miesza się i zateża do konsystencji oleistej.

50 Oczyszczanie chromatograficzne. Oleisty produkt zawierający linkomycynę S, rozpuszcza się w metanolowym roztworze chlorowodoru o wartości pH około 2,0. Po dodaniu tego roztworu do eteru wytrąca się osad. Osad ten, zawierający linkomycynę, linkomycynę B, linkomycynę C i linkomycynę S, oddziela się przez odfiltrowanie i wprowadza do kolumny chromatograficznej, zawierającą żel krzemionkowy, przygotowanej w następujący sposób:

65 **) N-Z-Amína B jest enzymatycznym wyciągiem kazeinowym Sheffield'a.

Zel krzemionkowy (Merck-Darmstadt Nr 7734, 0,05 — 0,20 mm) wysypuje się do szklanej kolumny (6,5 cm ID) i pozostawia, by osiadł pod ciśnieniem atmosferycznym. Surowy produkt zawierający linkomycynę S rozpuszcza się w absolutnym metanolu. Otrzymany roztwór miesza się z żelem krzemionkowym, przy czym tworzy się zawiesina i mieszaninę tę suszy się przez 20 godzin w próżni. Materiał ten wprowadza się na szczyt kolumny z żelu krzemionkowego. Na tę warstwę nakłada się następnie warstwę żelu krzemionkowego i kolumnę eluuje się rozpuszczalnikami, złożonym z ketonu metylo-*o*-etylowego, acetonu i wody w stosunku 100:30:5.

Fracje zawierające tylko linkomycynę S elują się z kolumny przed innymi linkomycynami. Obecność linkomycyny S stwierdza się metodą chromatografii cienkowarstwowej, w sposób opisany wyżej. Fracje, zawierające tylko linkomycynę S zbiera się i zateża do sucha. Pozostałość rozpuszcza się w 1N metanolem roztworze chlorowodoru o wartości pH około 2. Roztwór ten znów zateża się do sucha. Pozostałość rozpuszcza się w absolutnym metanolu i mieszaninę tę miesza z eterem. Podczas powolnego zateżenia mieszaniny na wyparce obrotowej krystalizuje bezbarwna substancja, którą drogą chromatografii cienkowarstwowej identyfikuje się jako linkomycynę S. Dalsze ilości kryształów linkomycyny S uzyskuje się przez zateżenie przesącza do sucha. Pozostałość rozpuszcza się w absolutnym metanolu i roztwór ten miesza z eterem etylowym. Mieszaninę tę miesza się w ciągu około 4 godzin. Powstałe podczas mieszania kryształy linkomycyny S oddziela się przez odfiltrowanie i suszy.

Krystaliczny chlorowodorek linkomycyny S ma następujące chemiczne i fizyczne właściwości:

obliczono dla $C_{20}H_{38}N_2O_6S \cdot HCl \cdot H_2O$: C, 40,12;
H, 8,47; O, 22, 95; N, 5, 74; S, 6, 57;
Cl, 7, 27.

ciężar cząsteczkowy: 488,5 (obliczony)

skręcenie płaszczyzny polaryzacji: $[\alpha]_D^{25} = +144,5^\circ$
(c, 0,38, woda).

Widmo podczerwone: chlorowodorek linkomycyny S wykazuje wartości maksymalne przy następujących długościach fal, wyrażonych w odwrotnościach centymetrów (reciprocal centimeters), badanie prowadzone z zastosowaniem KBr):

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)	

Chlorowodorek linkomycyny S wykazuje wartości maksymalne przy następujących długościach fal, wyrażonych w odwrotnościach centymetrów,

badanie prowadzone w zawieszinie w oleju mineralnym:

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

Nateżenia pasm w widmach podczerwonych są odpowiednio oznaczone symbolami S, M i W, i są w przybliżeniu określane w stosunku do sąsiednich pasm. Pasma S jest tego samego rzędu nateżenia, co najsilniejsze pasmo w widmie; pasma M są w 1/3 do 2/3 tak intensywne, jak najsilniejsze pasmo, a pasma W są mniej niż w 1/3 tak intensywne, jak najsilniejsze pasmo.

Chlorowodorek linkomycyny S jest rozpuszczalny w wodzie i metanolu. Jest umiarkowanie rozpuszczalny w 95% etanolu lub w etanolu absolutnym i stosunkowo nierozpuszczalny w acetonie, octanie etylu oraz w chlorowanych i nasyconych rozpuszczalnikach węglowodorowych.

Spektrum aktywności przeciwbakteryjnej podane w tablicy 1 zostało określone metodą kolejnych rozcieńczeń w próbkach, przy użyciu pożywki pochodzącej z BHI (Brain Heart Infusion Broth, Difco, Detroit, Michigan). Probówki (18 × 150 mm) były przygotowywane powszechnie stosowanym sposobem, jak podano u Snell's, E. E., Vitamin Methods, tom 1, Academic Press, Inc., Nowy Jork, 1950, str. 327. Do szczepienia pożywki użyto organizmów kontrolnych, wyhodowanych przez 18 godzin w 37°C. Próby odczytano po 20 godzinach.

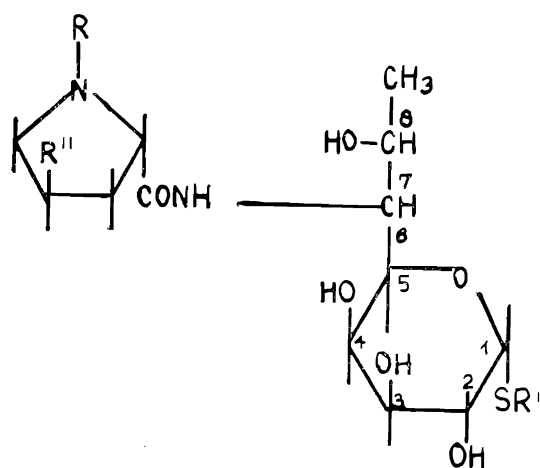
Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania linkomycyny S o wzorze 2, **znamienny tym**, że prowadzi się hodowlę *Streptomyces lincolnensis* var. *lincolnensis* nr NRRL 2936 w wodnej pożywce, w obecności dodatku etioniny w warunkach aerobowych i utworzoną linkomycynę S wyosabia się w postaci wolnej od innych linkomycyn metodą chromatografii.

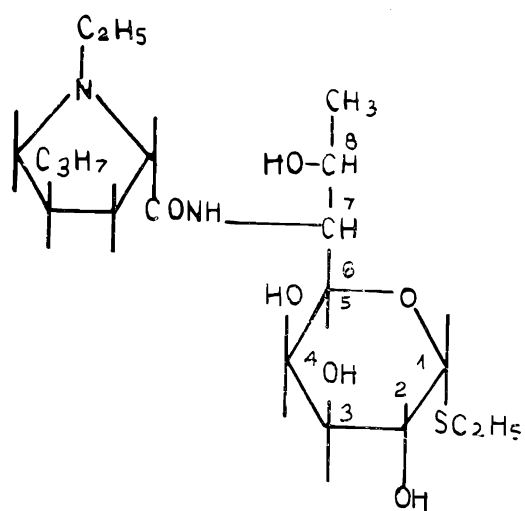
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że ciecz pofermentacyjną zawierającą linkomycynę S i inne linkomycyny przepuszcza się przez kolumnę chromatograficzną; eluuje kolumnę chromatograficzną rozpuszczalnikami dla linkomycyny S oraz wydziela linkomycynę S zasadniczo w czystej postaci, wolnej od innych linkomycyn, z eluatu.

3. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że stosuje się kolumnę chromatograficzną z żelem krzemionkowym.

4. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że jako roztwór eluujący stosuje się keton metylo-*o*-etylowy, aceton i wodę w stosunku objętościowym 100:30:5.



wzór 1



wzór 2