

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

65075

Patent dodatkowy
do patentu _____

Kl. 12 p, 4/01

Zgłoszono: 05.XII.1967 (P 123 926)

MKP C 07 d 99/24

Pierwszeństwo: 05.XII.1966 Szwajcaria

Opublikowano: 25.V.1972

UKD

Właściciel patentu: Ciba Société Anonyme, Bazylea (Szwajcaria)

Sposób wyodrębniania pochodnej cefalosporyny C

1

Przedmiotem wynalazku jest nowy sposób wyodrębniania pochodnej cefalosporyny C z roztworów zawierających cefalosporynę C.

Sposób według wynalazku jest szczególnie dogodny do wyodrębniania pochodnej cefalosporyny C, zwłaszcza z roztworu zawierającego cefalosporynę C w mieszaninie z innymi rozpuszczonymi substancjami, a przede wszystkim wyodrębniania cefalosporyny C z cieczy kulturowej.

Wyodrębnianie cefalosporyny C z rozcieńczonych wodnych roztworów zawierających rozpuszczalne w wodzie substancje, w szczególności z cieczy kulturowej jest kłopotliwe, zwłaszcza przy prowadzeniu procesu na skalę techniczną, ze względu na dużą wrażliwość cefalosporyny C na działanie czynników chemicznych jak i konieczność wyodrębniania jej z mieszaniny, zawierającej substancje bardzo do niej podobne pod względem własności chemicznych i fizycznych.

Znany jest sposób wyodrębniania cefalosporyny C z roztworu fermentacyjnego, np. drogą adsorpcji cefalosporyny C na węglu aktywnym, następnie eluowanie, adsorbowanie eluatu na tlenku glinowym, ponowne eluowanie i adsorbowanie na żywicy anionowej i po ponownym eluowaniu surowej cefalosporyny C wodnym roztworem buforowym o wartości pH = 2,5—3,0, np. octanem pirydyny, poddaniu surowej cefalosporyny C ekstrakcji rozpuszczalnikami (porównaj niemiecki opis patentowy nr 1 014 711).

2

Według innego sposobu można otrzymywać cefalosporynę C przez frakcjonowanie rozpuszczalnikami zwłaszcza wodą i fenolem lub alkilofenolami. Inna możliwość przewiduje, aby eluaty odebrane z kolumny wypełnionej węglem aktywnym lub tlenkiem glinowym albo jonitem, poddać takim warunkom temperatury i kwasowości, aby cefalosporynę N zawartą w przesączu kulturowym przekształcić w kwas penicylinowy, nie wpływając jednak na cefalosporynę C, albo rozłożyć cefalosporynę N pod wpływem penicylinazy, a cefalosporynę C wyodrębnić za pomocą frakcjonowanej ekstrakcji rozpuszczalnikami lub za pomocą chromatografii na wymienniku jonowym.

Znane są również próby bezpośredniej adsorpcji cefalosporyny C ze środowiska kwaśnego za pomocą wymiennika jonowego. Jednak taki sposób adsorpcji jest niedogodny, ponieważ inne jony zawarte w roztworze obok cefalosporyny C wymagają stosowania dużych ilości anionitu, a eluowanie z cefalosporyną jony chlorków powodują duże trudności w dalszych fazach oczyszczania produktu. Znany jest również sposób, według którego sklarowane środowisko fermentacyjne zakwasza się do wartości pH 2,8—4,0 za pomocą kationitu zawierającego silnie kwaśne grupy w postaci H^+ , po czym kationit wyodrębnia się.

Następnie z zakwaszonego środowiska usuwa się wszystkie jony chlorkowe jak i inne nieorganiczne aniony za pomocą silnego anionitu użytego w po-

stacji soli lotnego, jednozasadowego słabego kwasu organicznego i cefalosporinę C wydziela się z perkolatu np. za pomocą adsorpcji na anionicie użytym w postaci octanu, po czym cefalosporinę C eluuje się buforem stanowiącym octan pirydyny (patrz niemiecki opis patentowy nr 1 126 564). Sposoby, według których cefalosporinę C adsorbują się na wymiennikach jonowych wykazują jednak tę niedogodność, że duża część cefalosporiny C ulega przy tym rozkładowi.

Stwierdzono, że cefalosporinę C można wyodrębnić z roztworu wodnego, zwłaszcza z rozcieńczonego roztworu wodnego zawierającego cefalosporinę C w mieszaninie z innymi rozpuszczonymi substancjami a przede wszystkim z cieczy kulturowej, jeśli cefalosporinę wyodrębnia się w postaci pochodnej takiej jak N-trójnitrofenylocefalosporyna C, która jest szczególnie odpowiednia do przetworzenia w związki o wysokiej aktywności antybakteryjnej, stanowiące pochodne kwasu 7-aminocefalosporanowego, np. 7-fenyloacetyloaminocefalosporanowego lub 7-tienyloacetyloaminocefalosporanowego.

W sposobie według wynalazku wyodrębnienie pochodnej cefalosporiny C z roztworów zawierających cefalosporinę C polega na tym, że cefalosporinę C zawartą w wodnym roztworze poddaje się reakcji z kwasem trójnitrobenzenosulfonowym i wytworzoną N-trójnitrofenylocefalosporinę C wyodrębnia się z roztworu.

Sposób ten jest dogodny do oczyszczania surowej cefalosporiny C lub jej pochodnych, zwłaszcza zawierających wolną grupę aminową w łańcuchu bocznym, np. estrów cefalosporiny C. Związki te rozpuszczają się wówczas w wodzie lub innym rozpuszczalniku, a następnie traktuje kwasem trójnitrobenzenosulfonowym jak wyżej podano.

Jeżeli sposób według wynalazku stosuje się do wyodrębniania cefalosporiny C z płynów fermentacyjnych, wówczas reakcję można prowadzić bezpośrednio w cieczy kulturowej albo w przesączu tej cieczy.

W sposobie według wynalazku reakcję z kwasem trójnitrobenzenosulfonowym prowadzi się zwłaszcza w temperaturze pokojowej korzystnie w roztworze o wartości pH 7—10, zwłaszcza 8,5—9,0. Kwas trójnitrobenzenosulfonowy wprowadza się do roztworu w postaci stałej lub w postaci roztworu, przy czym mieszając utrzymuje się odczyn roztworu w wyżej określonej wartości pH w ciągu całego okresu prowadzenia reakcji, tj. około 1—2 godzin.

Roztwór kwasu trójnitrobenzenosulfonowego korzystnie otrzymuje się, jeśli chlorek pikrylu poddaje się reakcji z siarczynem, np. z siarczynem sodu, potasu lub amonu. Roztwór ten można stosować bezpośrednio bez dalszej obróbki. Kwas trójnitrobenzenosulfonowy można również wytworzyć bezpośrednio w roztworze zawierającym cefalosporinę C, np. przez wprowadzenie do tego roztworu chlorku pikrylu i siarczyny sodu.

Po zakończeniu reakcji doprowadza się roztwór do odczynu o wartości pH 1—3, korzystnie 1,8—2,0 i wyodrębnia trójnitrofenylocefalosporinę C korzystnie za pomocą ekstrakcji rozpuszczalnikami nie mieszającymi się z wodą lub mieszaniną rozpuszczalników np. alkoholem nie mieszającym się z wodą,

zwłaszcza niższym alkoholem o 4—6 atomach węgla jak n-butanol, alkohol amyłowy, np. n-amyłowy, n-heksyłowy, 2-etylo-n-butanol lub: alkohol benzyłowy, ester, zwłaszcza niższy ester alkilowy niższego kwasu alkanowego jak kwas octowy, propionowy, masłowy np. octan etylu, butylu lub ketonami nie mieszającymi się z wodą, zwłaszcza niższym dwualkiloketonem np. ketonem dwuetylowym, metyloizobutyłowym lub węglowodorami podstawionymi lub niepodstawionymi, zwłaszcza węglowodorami chlorowanymi, np. chlorowanym alkanem jak chlorek metylu, chloroform, chlorek etylenu, lub mieszaninę tych rozpuszczalników. Ekstrakcję można również prowadzić za pomocą ciekłego zasadowego wymiennicza jonowego np. jak Amberlit La-2 w octanie n-butylu lub 2-etylo-n-butanolu.

Zamiast wyodrębniania drogą ekstrakcji trójnitrofenylocefalosporinę, można wytrącić z roztworu przez doprowadzenie odczynu do wartości pH 1—3 korzystnie 1,8—2,0. W celu przeprowadzenia trójnitrofenylocefalosporiny C w kwas 7-aminocefalosporinowy, można trójnitrofenylocefalosporinę poddać estryfikacji i np. przeprowadzić w pochodną 7 — ACA według angielskiego opisu patentowego nr 1 041 985.

Wynalazek wyjaśniają niżej podane przykłady, w których temperatury podane są w stopniach Celsjusza.

Przykład I. 370 litrów cieczy kulturowej zawierającej cefalosporinę C zadaje się roztworem 2,72 kg kwasu szczawowego w 10 l wody i 0,9 litrami mieszaniny złożonej z równych objętości wody i stężonego kwasu siarkowego, uzyskując roztwór o wartości pH = 3. Następnie dodaje się 8 kg „Celatom” (ziemi okrzemkowej) jako pomocniczego środka filtrującego i sączy na prasie filtracyjnej. Użykuje się 320 litrów klarownego przesączu zawierającego 1,57 g cefalosporiny w 1 litrze roztworu.

Wilgotną pozostałość pofiltracyjną (62 kg) jako bezużyteczną usuwa się a następnie dodaje się przesącz do roztworu o wartości pH = 7,5 zawierającego 920 g 2,4,6-trójnitrobenzeno-sulfonianu sodowego, otrzymanego przez rozpuszczenie 796 g bezwodnego siarczyny sodowego w 3,35 litra dejonizowanej wody, dodanie 1 kg lodu i następne wprowadzenie roztworu 1,425 kg chlorku pikrylu w 435 l acetonu prowadzone w ciągu 15 minut przy stałym mieszanin. Następnie mieszaninę roztworów doprowadza się do wartości pH = 9 za pomocą stężonego wodorotlenku sodowego i przez 4 godziny utrzymuje w temperaturze 26° przy wartości pH 8,5—8,7.

Klarowny czerwony roztwór poreakcyjny, zawierający 2,4,6-trójnitrofenylocefalosporinę C zakwasza się do uzyskania wartości pH = 1,5—2,0, za pomocą 5 N roztworu kwasu siarkowego, po czym poddaje ekstrakcji przeciwpądowej za pomocą metyloizobutyloketonu. Otrzymuje się 190 litrów ekstraktu metyloizobutyloketonowego. Ekstrakt ten poddaje się ekstrakcji przeciwpądowej w aparacie ekstrakcyjnym za pomocą 0,2 M buforu fosforanowego o wartości pH = 8. Otrzymuje się 95 litrów uwodnionego ekstraktu o wartości pH = 6, z którego ponownie ekstrahuje się 2,4,6-trójnitrofenylocefalosporinę C za pomocą ketonu metyloizobutyłowego przy wartości pH = 2.

Otrzymuje się organiczny roztwór w ilości 50 litrów, który poddaje się trzykrotnie ekstrakcji stosując każdorazowo po 4 litry wody przy utrzymaniu odczynu o wartości pH = 6. W ten sposób otrzymuje się 12 litrów uwodnionego ekstraktu, który chłodzi się do temperatury 0°—4°, a następnie doprowadza do wartości pH = 6 za pomocą kwasu solnego, osad odsacza i przemywa lodową wodą. Po wysuszeniu otrzymuje się 751 g surowej 2,4,6-trójnitrofenylocefalosporyny C, przy czym z przesączu otrzymuje się dalsze 269 g produktu.

W chromatogramie cienkowarstwowym na żelu krzemionkowym w układzie n-butanol-lodowaty kwas octowy — woda (75 : 7,5 : 21) dla 2,4,6-trójnitrofenylocefalosporyny C w odniesieniu do kwasu pikrynowego jako substancji wzorcowej uzyskuje się wartość R_f = 0,51. Poza tym na chromatogramie są jeszcze widoczne plamy związków 2,4,6-trójnitrofenylowych bardziej i mniej polarnych. Przeprowadzenie pochodnej w kwas 7-amino-cefalosporynowy (7 — ACA) można wykonać następująco:

a) 200 g surowej 2,4,6-trójnitrofenylocefalosporyny C zawiesza się w dwóch litrach ketonu metyloizobutyloвого, po czym zadaje roztworem 200 g dwufenyldwuazometanu (otrzymanego przez utlenianie hydrazonu benzofenonu dwutlenkiem manganu) w 600 ml metyloizobutyloketonu. Po upływie 1,5 godziny czerwono-fioletowy roztwór wlewa się do 10 litrów eteru naftowego, przy czym surowy ester dwubenzhydrolowy 2,4,6-trójnitrofenylocefalosporyny C wytrąca się w postaci jasno-żółtego proszku. Wytrącony osad odsacza się, przemywa eterem naftowym i suszy pod obniżonym ciśnieniem w temperaturze 40°. Otrzymany produkt w chromatogramie cienkowarstwowym na żelu krzemionkowym w układzie toluen — aceton (8 : 2) wykazuje wartość R_f = 0,53.

Wydałość: 280 g dwuestru o 44% czystości co odpowiada wydałości 62% w odniesieniu do znajdujacej się w filtracji kulturowym cefalosporyny C.

b) 9,6 g estru dwubenzhydrolowego, wytworzonego według sposobu podanego wyżej w punkcie a), rozpuszcza się w 260 ml bezwodnego chlorku metylu i po ochłodzeniu roztworu do temperatury —18° dodaje się 5 ml bezwodnej pirydyny, a następnie mieszając, wkrapla się w ciągu 10 minut roztwór 7,8 g pięciochlorku fosforu w 100 ml bezwodnego chlorku metylowego i miesza w ciągu dalszych 45 minut w temperaturze —12° do —10°, po czym w przeciągu 5 minut dodaje się 64 ml metanolu ochłodzonego do temperatury —10°. Następnie roztwór miesza się w ciągu 40 minut w temperaturze —10°, po czym w ciągu jednej godziny w temperaturze —10° i ciągle mieszając dodaje się 110 ml 2 N roztworu kwasu solnego. Po oddzieleniu faz, fazę uwodnioną ekstrahuje się 100 ml chlorku metylowego i połączone fazy chlorku metylu odparowuje się ostrożnie pod obniżonym ciśnieniem. Po wysuszeniu w wysokiej próżni otrzymuje się pozostałość o konsystencji żywicy brązowej, stanowiącą zanieczyszczony ester benzhydrolowy kwasu 7-aminocefalosporynowego.

c) Rozpuszcza się ester 7 — ACA — benzhydrolowy w 5 ml anizolu, dodaje 14 ml kwasu trójfluorooctowego i pozostawia na okres 30 minut w tempe-

raturze 20—30° dla przereagowania, po czym dodaje mieszaninę 25 ml trójetyloaminy i 180 ml metanolu, ochłodzoną do temperatury —10°. Otrzymuje się 10% uwodnioną zawiesinę o wartości pH 2,3. Następnie dodaje się 6 ml trójetyloaminy podwyższając pH zawiesiny do wartości 3,5 po czym całość ochładza się do temperatury 18°C i pozostawia do krystalizacji. Wykryształizowany osad oddziela się na nuczcy, przemywa metanolem, chlorkiem metylenu i eterem etylowym, po czym suszy w wysokiej próżni. Otrzymuje się kwas 7-amino-cefalosporynowy o czystości 83,3%.

Otrzymuje się 1,62 g produktu co odpowiada wydajności 63,5% w odniesieniu do użytego estru dwubenzhydrolowego 2,4,6-trójnitrofenylocefalosporyny C.

Przykład II. Do 10 litrów przesączu kultury o zawartości 1340 mg cefalosporyny C w 1 litrze roztworu i 190 mg azotu w postaci I-rzęd-grupy aminowej w 1 litrze roztworu, otrzymanego w wyniku filtracji roztworu fermentacyjnego prowadzonej przy dodaniu 2% „Celatomu” jako pomocniczego środka filtracyjnego, dodaje się 60 g kwasu 2,4,6-trójnitrobenzenosulfonowego, roztwór doprowadza się do wartości pH = 8,7 i utrzymuje przy tej wartości pH w ciągu 2 godzin. Następnie do mieszaniny dodaje się 250 g „Hyflo supercel” i mieszając doprowadza roztwór do odczynu o wartości pH = 4,3 za pomocą stężonego kwasu solnego i wytworzony żółty osad odsacza się na nuczcy łącznie z „Hyflo supercel”. Klarowny przesącz zadaje się 3 litrami octanu etylu i doprowadza odczyn do pH wartości 2,0 za pomocą kwasu solnego. Po rozdzieleniu faz, fazę octową zdolną do łatwego tworzenia emulsji poddaje się klarowaniu za pomocą filtracji przez 50 g „Hyflo supercel”, przy czym wodne fazy poddaje się ponownej trzykrotnej ekstrakcji za pomocą 1 litra octanu etylu.

Połączone ekstrakty octanowe zadaje się 1 litrem octanu etylu, doprowadza do pH wartości 6,5 za pomocą wodorotlenku sodu, rozdziela fazy i połączone fazy octanu etylowego ekstrahuje się trzykrotnie za pomocą 0,5 litra wody, przy wartości pH = 6,0. Połączone roztwory wodne zadaje się 1 litrem estru kwasu octowego i odczyn roztworu doprowadza się do wartości pH = 2,0 za pomocą kwasu solnego. Fazy rozdziela się i wodną fazę ekstrahuje się ponownie trzykrotnie estrem kwasu octowego zużywając po 0,5 litra estru.

Połączone ekstrakty octanu przemywa się dwukrotnie po 0,3 litra nasyconym wodnym roztworem chlorku sodowego, suszy siarczanem sodu i zagęszcza do objętości 0,5 litra. Ten zagęszczony roztwór 2,4,6-trójnitrofenylocefalosporyny C, przy lekkim chłodzeniu zadaje się 0,2 litrami 47,5% roztworu dwufenyldwuazometanu w eterze naftowym i po utrzymaniu mieszaniny w ciągu 105 minut w temperaturze pokojowej, mieszaninę wlewa się do 3,5 litrów eteru naftowego, wytrącając dwubenzhydrolowy ester 2,4,6-trójnitrocefalosporyny C. Wytrącony osad odsacza się na nuczcy i suszy pod obniżonym ciśnieniem w temperaturze 40°C.

Otrzymuje się 51,2 g produktu o czystości 40,4% co odpowiada wydałości teoretycznej 76,2% w prze-

liczeniu na cefalosporinę C zawartą w roztworze pofermentacyjnym.

Przykład III. Do 11,76 g chlorku pikrylu zawieszono w 36 ml butanolu, mieszając dodaje się roztwór 6,6 g bezwodnego siarczynu sodowego rozpuszczonego w 72 ml wody i po 30 minutach mieszanina uzyskuje się roztwór o wartości pH = 6,5. Czerwoną mieszaninę zawierającą 15 g soli sodowej kwasu 2,4,6-trójnitrobenzenosulfonowego dodaje się do 6 litrów wodnego roztworu wzbogaconego w cefalosporinę C (zawartość soli sodowej cefalosporiny C z obliczenia wynosi 12,3 g, zawartość azotu w postaci pierwszorzędowych grup aminowych 1,9%). Następnie mieszaninę reakcyjną doprowadza się do wartości pH = 9,0 za pomocą ługu sodowego i utrzymuje w ciągu 1 godziny w granicach wartości pH 8,5—8,7, po czym dodaje się roztwór kwasu solnego do uzyskania pH 2,0. Po 10 minutach fazy oddzieła się. Fazę uwodnioną ekstrahuje się jeszcze dwukrotnie, każdorazowo po 500 ml mieszaniny octanu n-butyloвого i n-butanolu. Łączy się otrzymane organiczne ekstrakty i dodaje ługu sodowego do uzyskania odczynu kwaśnego o wartości pH 5,5, po czym ekstrahuje się 300 ml wody, a następnie 200 ml i 100 ml wody.

Wszystkie wodne roztwory ekstrahuje się ponownie mieszaniną octanu n-butylowego i n-butanolu raz wodą przy wartości pH = 2,0 (100 ml i dwa razy 50 ml). Następnie ponownie ekstrahuje się wyciągi organiczne wodą przy wartości pH 5,5 uzyskując raz 100 ml i dwukrotnie po 50 ml wody, po czym 200 ml wodnego roztworu zadaje się 10 g „Hyflo supercel”, chłodzi do temperatury od 0° do 4° i ustala wartość pH = 1,8—2,0 za pomocą roztworu kwasu solnego 1,8 do 2,0. Przy tym wytrąca się 2,4,6-trójnitrofenylocefalosporyna C.

Osad odsąca się razem z pomocniczym materiałem filtracyjnym, przemywa bardzo zimną odjonizowaną wodą i suszy w ciągu 15 godzin w temperaturze 40°. Wyciąg zawiera 18,07 g 2,4,6-trójnitrofenylocefalosporiny C na 10 g „Hyflo supercel”. W chromatogramie cienkowarstwowym na żelu krzemionkowym w układzie jak podano w przykładzie I, otrzymany produkt wykazuje wartość R_{fp} = 0,5, przy czym na chromatogramie widoczne są jeszcze plamy innych bardziej i mniej polarnych związków trójnitrofenylowych.

Produkt może być w następujący sposób przeprowadzony w ester dwubenzhydrylowy: wytrąconą mieszaninę zawiesza się w 180 ml octanu n-butyloвого i zadaje 36 g dwufenyldwumetanu w 180 ml n-butanolu. Zawiesinę miesza się w ciągu 3 godzin, odsąca „Hyflo supercel” i do przesączu w ciągu 20 minut dodaje się 1800 ml eteru naftowego (frakcja o temperaturze wrzenia 50—70°). Odsąca się jasnożółty osad surowego estru 2,4,6-trójnitrofenylocefalosporiny C — dwubenzhydrylowego, przemywa eterem naftowym i suszy pod obniżonym ciśnieniem w temperaturze 40°. Wydajność wynosi 24,7 g co odpowiada wydajności 65,3% w odniesie-

niu do wyjściowego roztworu zawierającego cefalosporinę C.

Przykład IV. W 25 ml octanu n-butyloвого rozpuszcza się 17,3 g chlorku pikrylu, po czym dodaje roztwór 9,8 g bezwodnego siarczynu sodowego i miesza w ciągu 15 minut. Faza octanowa jest przy tym bezbarwna, a faza wodna, która zawiera 22 g soli sodowej kwasu 2,4,6-trójnitrobenzenosulfonowego intensywnie czerwona. Czerwony roztwór wlewa się do 6 litrów wodnego roztworu zawierającego surową cefalosporinę C w ilości 12 g przy 1,3% wagowych pierwszorzędowych grup aminowych, po czym odczyn roztworu doprowadza się do wartości pH = 9 dodając ług sodowy i miesza przez 2 godziny przy wartości pH = 8,5—8,7.

Dalszą obróbkę prowadzi się według sposobu opisanego w przykładzie III. Otrzymuje się 21,8 g zanieczyszczonej 2,4,6-trójnitrofenylocefalosporiny C na 40 g „Hyflo supercel”. Przez estryfikowanie 43,6 dwufenyldwumazanu, analogicznie jak w przykładzie III, otrzymuje się 28,65 g estru dwubenzhydrylowego 2,4,6-trójnitrofenylocefalosporiny C o czystości 55%, co odpowiada teoretycznej wydajności 64,6%.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wyodrębniania pochodnej cefalosporiny C z roztworów zawierających cefalosporinę C, **znamienny tym**, że cefalosporinę C zawartą w wodnym roztworze poddaje się reakcji z kwasem trójnitrobenzenosulfonowym i wytworzoną N-trójnitrofenylocefalosporinę C wyodrębnia z roztworu.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako materiał wyjściowy, stosuje się ciecz kulturową zawierającą cefalosporinę C.

3. Sposób według zastrz. 1 lub 2, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej.

4. Sposób według zastrz. 1—3, **znamienny tym**, że reakcję prowadzi się przy wartości pH = 7—10, korzystnie 8,5—9,0.

5. Sposób według zastrz. 1—4, **znamienny tym**, że jako związek wyjściowy stosuje się kwas trójnitrobenzenosulfonowy w postaci roztworu, otrzymanego w reakcji chlorku pikrylu z siarczynem.

6. Sposób według zastrz. 1—5, **znamienny tym**, że N-trójnitrofenylocefalosporinę C wyodrębnia się z roztworu przez ekstrakcję.

7. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że ekstrakcję N-trójnitrofenylocefalosporiny C prowadzi się przy wartości pH 1—3, zwłaszcza 2.

8. Sposób według zastrz. 6 lub 7, **znamienny tym**, że trójnitrofenylocefalosporinę C ekstrahuje się za pomocą nie mieszającego się z wodą rozpuszczalnika lub mieszaniny rozpuszczalników.

9. Sposób według zastrz. 6 lub 7, **znamienny tym**, że N-trójnitrofenylocefalosporinę C ekstrahuje się za pomocą płynnego jonitu.