

Purificazione di prodotti idrosolubili

Purificazione di prodotti idrosolubili

In linea con il principio secondo cui “il simile scioglie il simile” (*Similia similibus solvuntur*), si potrebbe pensare che il solvente più adatto per tale estrazione sia l'acqua. In realtà, la semplice macerazione del materiale biologico in acqua o con tamponi acquosi, spesso non è soddisfacente poiché i p.a. sono immagazzinati in forma protetta. Il meccanismo di tale protezione è vario: **legame con le membrane, compartimentalizzazione, protezione con materiale lipidico** e così via. Questo problema in genere non si presenta con l'estrazione di composti lipofili, poiché i solventi organici rompono le strutture compartimentali. Per tali ragioni, vengono utilizzati solventi organici polari come il metanolo e l'etanolo, anche se non sono i solventi migliori per sciogliere le molecole desiderate. Tra l'altro, tali solventi sono più facilmente evaporabili rispetto all'acqua.

Purificazione di prodotti idrosolubili

Altri metodi per distruggere la compartimentalizzazione sono la **sonicazione**, il **congelamento-scongelamento**, il **riscaldamento** e la **digestione enzimatica**. Tali metodi possono essere usati da soli o in combinazione.

L'uso di solventi organici previene inoltre la crescita microbiologica, uno dei problemi più seri associati con i prodotti idrosolubili. E' imperativo anche che tutto il lavoro di isolamento venga effettuato a freddo. L'utilizzazione di sostanze antimicrobiche (ad es. sodio azide) può portare alla formazione di artefatti (triazolo derivati).

Purificazione di prodotti idrosolubili

Un altro problema associato con sistemi acquosi è l'attivazione di enzimi come le **peptidasi**, **glicosidasi**, **solfatasi**, **ossidasi**. Un esempio ben noto è quello dei glicosidi digitalici.

La **deattivazione** o **denaturazione** degli enzimi può essere effettuata mediante un riscaldamento veloce, trattamento con alcoli, anche se esso non sempre è efficace. Il metodo migliore è **l'ultrafiltrazione** o la **gel-filtrazione**.

Desalatura e scelta dei tamponi

La desalatura è probabilmente lo stadio più importante nel maneggiare composti idrosolubili. Si tratta di separare i sali inorganici da quantità spesso infinitesime di principio attivo. In questo caso non è evidentemente possibile utilizzare la ripartizione tra solventi, come è usuale nel caso di prodotti liposolubili.

Se il p.a. ha una certa liposolubilità, il metodo standard di desalatura prevede l'uso di una colonna in fase inversa come la silice C18 o vari altri polimeri come la XAD-2, -4 e -7. Usualmente, la soluzione acquosa è passata attraverso la colonna ed i sali sono lavati via con acqua. Successivamente si eluisce con una miscela solvente contenente solventi organici. **Tale metodo tuttavia non può essere utilizzato con composti fortemente polari o ionizzati**, come amminoacidi o zuccheri.

Desalatura e scelta dei tamponi

Un altro metodo molto usato prevede l'uso di colonne ad esclusione come la Sephadex G-10 e Bio-Gel-P-2. I sali inorganici, presuntivamente più piccoli, saranno eluiti successivamente. Questo tuttavia non è sempre vero, poiché ci possono essere delle interazioni impreviste tra i composti e la fase solida, così che si può avere una inversione del previsto ordine d'eluizione.

Desalatura e scelta dei tamponi

In molti casi, l'estrazione ed il frazionamento di composti idrosolubili richiede l'uso di soluzioni tampone. Da ciò che si è detto, il punto chiave dell'isolamento di composti idrosolubili è trovare un adatto pH ed una concentrazione ionica adatta a mantenere le molecole come entità singole e separabili su una certa matrice. Tuttavia, la separazione dei sali dei tamponi non è una cosa semplice. Per evitare tale problema, sono stati suggeriti vari **tamponi volatili** (tab. 1). Essi sono principalmente combinazioni di acidi e basi deboli, legati solo da deboli interazioni ioniche e che sono volatili sotto vuoto o liofilizzabili.

Table 1
Examples of Volatile Buffers

Buffer	pH
Ammonim biocarbonate	5.0–7.0
Ammonium acetate	7.0–8.0
Pyridine-acetic acid 16.1:278.5	3.1
Pyridine-acetic acid 161.2:143.2	5.0
Pyridine-acetic acid- α -picoline 11.8:0.1:28.2	8.0
Pyridine-acetic acid-2,4,5-collidine 10:0.4:10	8.3
Pyridine-acetic acid- <i>N</i> -ethylmorpholine 7.5:0.1–0.5:12.5	9.3

Desalatura e scelta dei tamponi

Tuttavia, in realtà, questi tamponi non sono così facilmente maneggiabili. Alcuni di essi sono dotati di un odore sgradevole (piridina ed altre basi aromatiche), hanno una natura lipofila, possono interagire con i soluti. L'ammonio acetato o carbonato sono rimovibili per evaporazione o liofilizzazione, ma, in pratica, non sono facili da eliminare; durante tale processo ci si deve attendere una variazione del pH

Selezione del supporto cromatografico

Anche con i composti idrosolubili è necessario ricorrere a qualche metodo cromatografico. Esistono una varietà di adsorbenti i cui meccanismi di interazione possono essere deboli, moderati o forti. Qui una particolare attenzione deve essere riservata al possibile adsorbimento irreversibile di alcune sostanze con il materiale di supporto. E' noto infatti che il recupero del materiale da una cromatografia raramente è il 100%; **parte del prodotto tende a scomparire nella colonna**, e nel caso di composti idrosolubili questa tendenza è ancora maggiore, specialmente con i supporti a base di silice (vedi amminoacidi).

Selezione del supporto cromatografico

Non sono noti i meccanismi di questa ritenzione irreversibile, ma un grosso contributo può essere fornito dal legame idrogeno che si realizza all'interno dei pori. In altri casi si sospetta la formazione di legami covalenti attraverso addizioni di Michael o la formazione di derivati emichetali. L'uso di materiale con pori più grandi può essere di utilità, anche se questo diminuisce l'area superficiale e di conseguenza il numero di piatti teorici.

Silice modificata attraverso la copertura dei gruppi ossidrilici ("end-capped" silica), può prevenire queste interazioni indesiderate.

Selezione del supporto cromatografico

In generale è meglio evitare l'uso di silice, ed utilizzare fasi con supporto polimerico come il **polistirene-divinilbenzene** od il **copolimero tra idrossietil metilacrilato/dimetilacrilato** con vari gruppi funzionali. Tali supporti sono inoltre di maggiore durata rispetto ai supporti silicei, e sopportano meglio valori estremi di pH ed alte concentrazioni di soluzioni tampone.

Schema generale di frazionamento

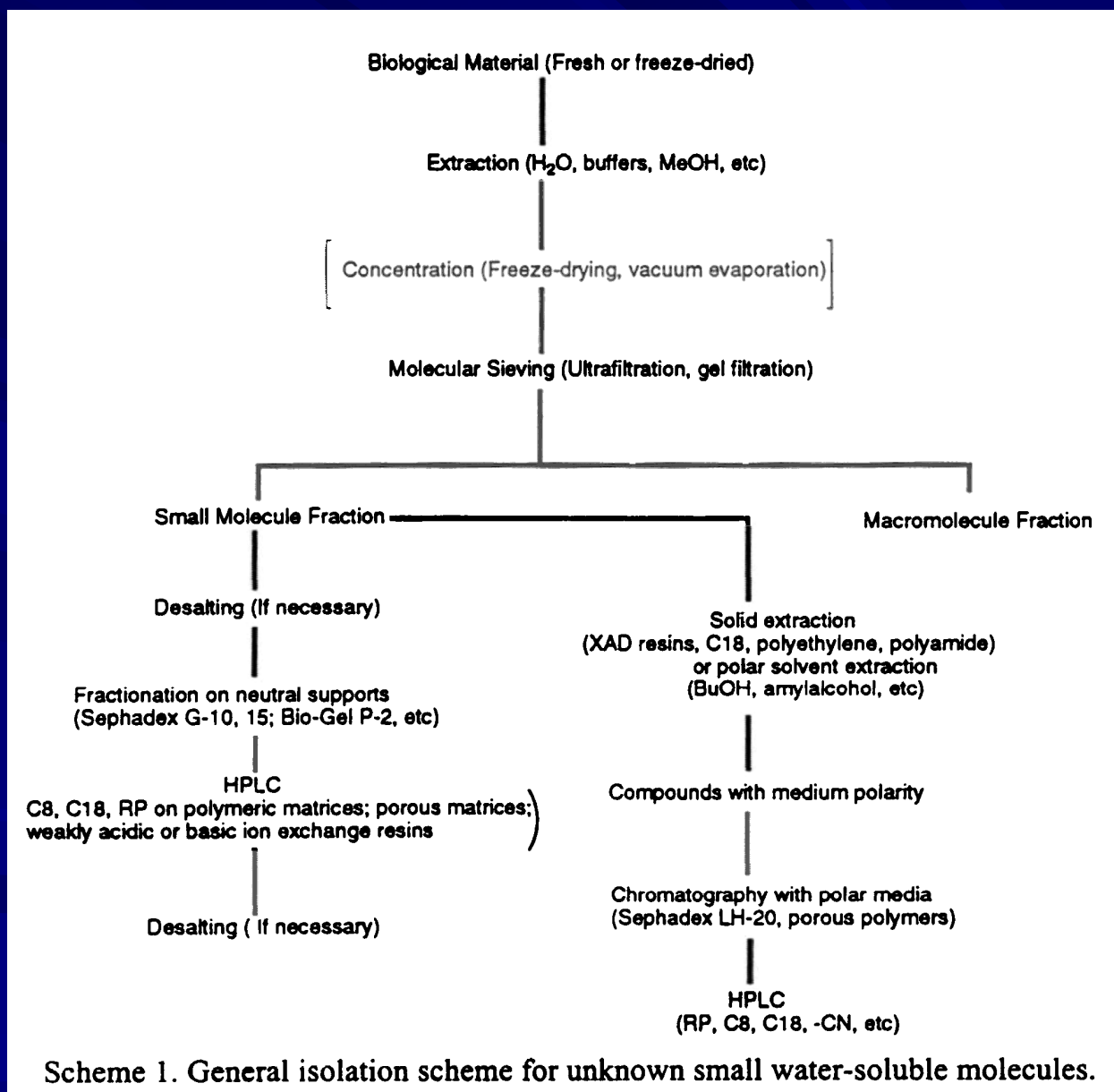
Prima del 1950 l'isolamento di prodotti naturali idrosolubili era limitato principalmente a quei composti stabili a condizioni di pH estreme. Nel caso di composti anfoteri, come gli amminoacidi, venivano usate combinazioni di resine a scambio ionico fortemente acide e basiche. Tali procedure non sono compatibili con funzionalità labili all'ambiente acido o basico (vedi gli esteri), o con la presenza di centri asimmetrici epimerizzabili. Perciò, nel caso di un composto sconosciuto, sono da evitare condizioni estreme. A questo scopo possono essere utilizzate resine debolmente acide e/o basiche. In particolare, molto efficace è la combinazione di resine deboli e cromatografie a fase inversa e/o gel filtrazione. Nella tab. 2 sono riportati i più comuni adsorbenti utilizzati in questo tipo di separazioni.

Chromatographic Supports Often Used in the Author's Laboratory for Separation of Water-Soluble Components

Type of compounds	Column packing
Mono- and oligosaccharides	Sephadex G-10, G-15, polymer-based gels, e.g., Bio-Gel P-2, Ca-loaded gels (e.g., Supelcogel Ca), strong cation exchange ($-\text{SO}_3\text{H}$) resins, weakly basic anion exchange resins
Polysaccharides	Sephadex G-50, G-100, G-200, Bio-Gel P-6 ~P-100, styrene divinyl-benzene-based size-exclusion resins (e.g., Bio-Gel SEC), and their DEAE-bonded material
Oligopeptides	Sephadex G-10, G-15, Bio-Gel P-2 ~P-6 and other polymer-based size-exclusion gels and reverse phase gels
Proteins and glycoproteins	Sephadex G-15 ~G-200, Bio-Gel P-6 ~P-100, other polymer-based size-exclusion material and their DEAE-bonded forms, C18 on large-pore (300Å) support and C18 on polymer-based material (e.g., HEMA and Hamilton PRP)
Amine, guanidine, and amino acid derivatives	Strongly acidic cation exchange resins ($-\text{SO}_3^-$), weakly acidic ($-\text{COOH}$) cation-exchange resins, especially, polymer supports (e.g., HEMA CM and Bio-Rex 70), RP (C18, C8, and Hamilton PRP), Bio-Gel P-2
Polar carboxylic acids	Anion-exchange resins, RP (C18 and Hamilton PRP)
Glycosides	RP (C18, C8, and polymer-based), Sephadex G-10, LH-20
Desalting	Bio-Gel P-2, Sephadex G-10, RP (C18, PRP)

Sephadex, Pharmacia Fine Chemicals; Bio-Gel, Bio-Rad; HEMA, Altech; and Supelcogel, Supelco.

Schema generale di frazionamento



Contaminazione da metalli pesanti

In generale, i composti isolati vengono esaminati mediante tecniche NMR. E' necessario sottolineare in questo ambito un problema caratteristico dei composti solubili in acqua e raramente incontrato con composti lipofili: la possibile contaminazione del campione con metalli pesanti paramagnetici, che possono derivare o dall'originale estratto, o dal materiale e/o attrezzature usate durante l'estrazione. Infatti molte apparecchiature che utilizzano parti in acciaio possono rilasciare, quando si usano i tamponi, tracce di ioni Ni o Fe. La quantità di materiale rilasciato può essere piccola, ma sufficiente per creare problemi durante le misure NMR. Tali problemi aumentano se la quantità del materiale da esaminare è dell'ordine dei microgrammi.