

Estrazioni di brodi di coltura microbiologici

Estrazioni di brodi di coltura microbiologici

Un brodo di fermentazione è una *complessa miscela di componenti che spesso contiene solo tracce del prodotto ricercato*. I microrganismi producono il prodotto desiderato a concentrazioni generalmente $<3\%$ p/v ($<30\text{g/l}$), ed anzi, nei primi stadi di ricerca e sviluppo, quando le condizioni dei metodi di produzione per via fermentativa non sono state ancora ottimizzate, il nostro prodotto può essere presente in concentrazioni di pochi ppm ($\sim 20\text{ mg/l}$, ad es. 1-12 ppm per la tienamicina), così da rendere il suo isolamento un vero problema.

Estrazioni di brodi di coltura microbiologici

I successivi stadi dell'estrazione possono essere così schematizzati:

- 1) separazione del prodotto dalla biomassa
- 2) concentrazione del prodotto
- 3) purificazione da contaminanti molto diversi
- 4) purificazione da contaminanti simili.

In molti casi sono le fasi iniziali a richiedere maggior sforzo

Estrazioni di brodi di coltura microbiologici

Questo capitolo comprende quattro sezioni, tutte incentrate su metodi in scala di laboratorio, che si rivolgono ai primi stadi di estrazione e che sono:

- 1) rimozione del solido (filtrazione e centrifugazione)
- 2) estrazioni con solventi (con solventi sia miscibili che immiscibili con acqua)
- 3) estrazione su fase solida
- 4) adsorbimento su fase espansa (che può essere utilizzata direttamente su brodi di coltura non chiarificati).

Separazione solido-liquido

Un problema caratteristico nell'isolamento dei metaboliti secondari ottenuti mediante fermentazione, è la loro separazione da cellule o omogenati; **questo stadio iniziale di separazione solido/liquido è detto chiarificazione del brodo.**

La **chiarificazione** dei brodi può essere fatta mediante centrifugazione o filtrazione. La scelta dipende dalle proprietà fisiche del brodo e quindi dalla morfologia del solido.

I solidi sono spesso compressibili e gelatinosi (proprietà che influenzano la filtrazione) con piccole differenze di densità (proprietà che influenza la centrifugazione) rispetto alla fase liquida. Le proprietà fisiche dei brodi di fermentazione dipendono dalle differenti morfologie dei solidi (principalmente dalle dimensioni).

Lo stadio di **chiarificazione spesso viene effettuato dopo lo stadio di estrazione.** Per esempio, la centrifugazione di un brodo di fermentazione contenente un particolato solido di piccole dimensioni e di bassa densità, può trarre beneficio da un aumento della differenza di densità tra il solido e la fase liquida costituita da un solvente acquoso.

Separazione solido-liquido

I fattori principali che guidano la scelta tra centrifugazione o filtrazione sono la differenza di densità e le dimensioni delle particelle. La centrifugazione è maggiormente influenzata dalle dimensioni delle particelle, mentre la filtrazione è solo leggermente influenzata da questo fattore entro un certo limite. Al diminuire delle dimensioni delle particelle, la difficoltà di separazione mediante centrifugazione aumenta maggiormente che nella filtrazione. Le dimensioni al di sotto delle quali la filtrazione è da preferire alla centrifugazione è dell'ordine di 1–2 μm , più o meno le dimensioni dell'*Escherichia coli*.

Separazione solido-liquido

La differenza di densità è un fattore importante per la centrifugazione, mentre ha un effetto trascurabile per la filtrazione.

Gli svantaggi della filtrazione sono che piccole particelle determinano una bassa velocità di permeazione, con i pori delle membrane che spesso si ostruiscono diminuendo ulteriormente la velocità di filtrazione.

Estrazioni di brodi di coltura microbiologici

- 1) rimozione del solido (filtrazione e **centrifugazione**)
- 2) estrazioni con solventi (con solventi sia miscibili che immiscibili con acqua)
- 3) estrazione su fase solida
- 4) adsorbimento su fase espansa (che può essere utilizzata direttamente su brodi di coltura non chiarificati).

Centrifugazione

La centrifugazione è stata applicata da almeno 100 anni nel recupero di lieviti da brodi di fermentazione. Poiché i lieviti sono circa un ordine di grandezza più grandi dei batteri, la capacità di centrifugazione per i lieviti è circa 100 volte maggiore che per i batteri. La viscosità tipica dei brodi di fermentazione dei batteri è circa 1-2 cP (centiPoise). Poiché i batteri sono costituiti per il 70-80% di acqua, la differenza di densità tra loro ed il mezzo acquoso è generalmente piccola (0.1 g/L o meno). Sebbene la differenza di densità sia bassa, il fattore dominante che determina il tempo e la forza g necessaria per separare le cellule dal medio è la grandezza delle particelle.

Centrifugazione

La tabella seguente fornisce alcune caratteristiche di microrganismi rappresentativi.

Sizes and Specific Gravities of Representative Solids (8)

Solids type	Particle size, μm	Solid–liquid density difference, $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
Cell debris	0.2×0.2	0–120 ^a
Bacterial cells	1×2	70
Yeast cells	7×10	90
Mammalian cells	40×40	70
Plant cells	100×100	50
Fungal Hyphae	$\times 10$ (matted)	10
Floccules	100×100	

^aCell debris densities vary depending on composition e.g., lipid content.

Centrifugazione

Per particelle sferiche e fluidi Newtoniani, la velocità di sedimentazione sotto l'influsso di una forza centrifuga applicata, è stata descritta da Hsu:

$$V = d^2 (\delta\rho) \omega r / 18\mu$$

V è la velocità di sedimentazione

d è il diametro delle particelle

ω è la velocità angolare

r è la posizione radiale della particella

μ è la viscosità del liquido

$\delta\rho$ è la differenza di densità tra particella e liquido

Anche se ci sono spesso deviazioni dal caso ideale, l'equazione fornisce un'utile guida per la manipolazione delle caratteristiche fisiche del brodo per migliorare la separazione.

Centrifugazione

Per esempio, se la densità della particelle è 1.05 g/L e la densità del liquido è 1.02, una piccola diminuzione della densità del liquido a 0.96. Ad es. per aggiunta di metanolo dovrebbe triplicare la velocità di sedimentazione. Se il metanolo diminuisce anche la viscosità, la velocità dovrebbe aumentare ulteriormente. Poiché la velocità è proporzionale al quadrato del diametro della particella, la semplice riduzione delle dimensioni alla metà, quadruplica il tempo richiesto. Ammesso che il p.a. non sia termolabile, l'aumento della temperatura, abbassando la viscosità, migliora la velocità. La velocità angolare e la posizione radiale della particella sono determinate dalle caratteristiche della centrifuga. Una tipica centrifuga da laboratorio con 4 bottiglie di 1 L di capacità opera a 3500-6000 rpm e applica una forza centrifuga di 3000-5000g.

Estrazioni di brodi di coltura microbiologici

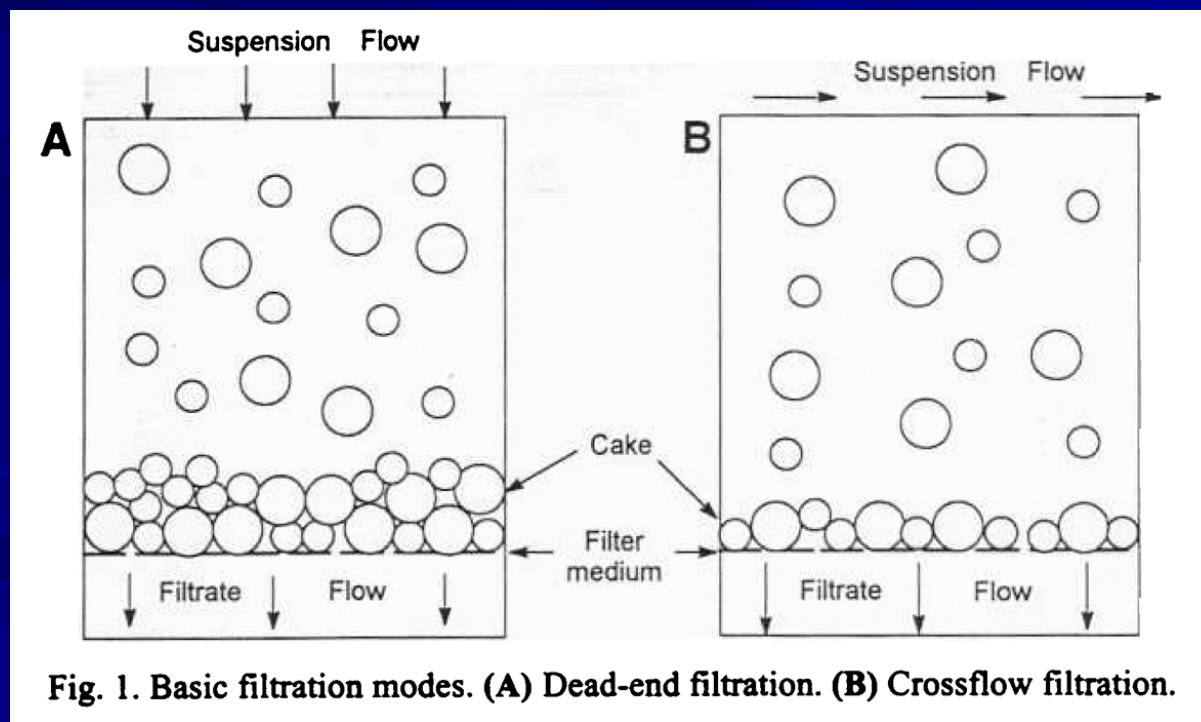
- 1) rimozione del solido (**filtrazione** e centrifugazione)
- 2) estrazioni con solventi (con solventi sia miscibili che immiscibili con acqua)
- 3) estrazione su fase solida
- 4) adsorbimento su fase espansa (che può essere utilizzata direttamente su brodi di coltura non chiarificati).

Filtrazione

Alla base della filtrazione troviamo la differenza di pressione tra le superficie della membrana, e questa può essere controllata sia applicando una pressione sopra la membrana, sia facendo del vuoto sotto la membrana. La pressione dà numerosi vantaggi: minimizza la denaturazione delle proteine ed altre molecole biologiche riducendo la formazione di schiume sotto la membrana; riduce l'evaporazione del solvente dal filtrato. La pressione che può essere applicata è spesso limitata dalla compressibilità del solido.

Filtrazione

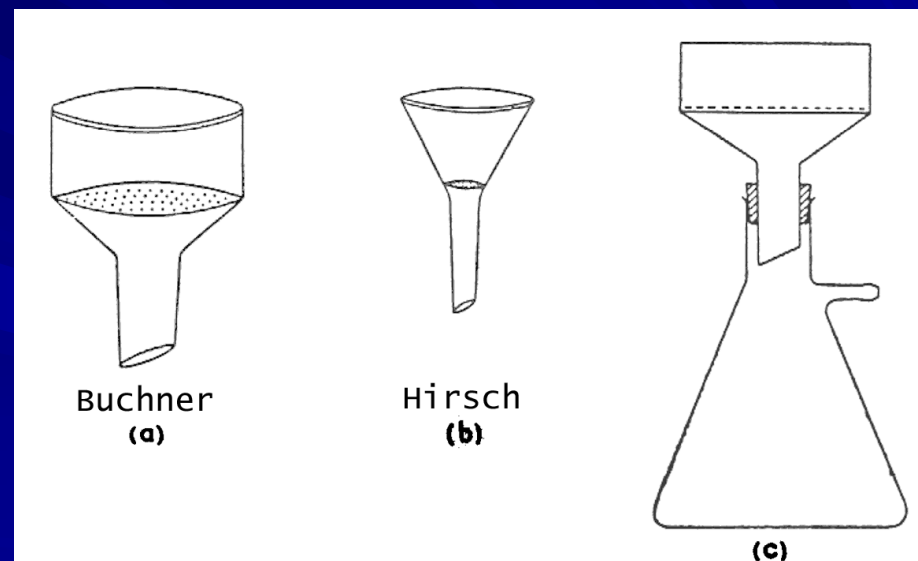
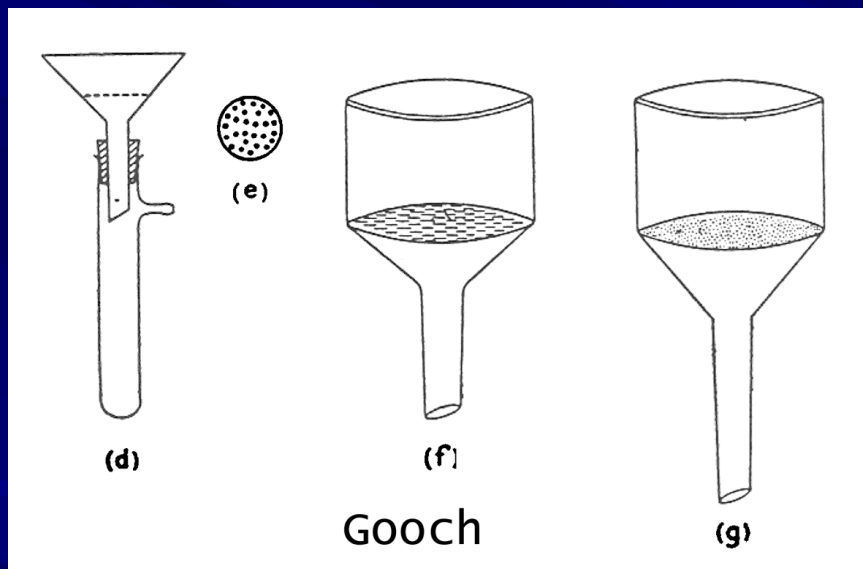
Ci sono due configurazioni base per la filtrazione: la filtrazione a **vicolo-cieco** e la centrifugazione a **flusso laminare (crossflow)**. Nel primo caso la sospensione fluisce perpendicolarmente alla superficie della membrana, ed il solido si accumula sulla superficie della membrana. Nel secondo caso il liquido si muove parallelamente alla superficie della membrana.



Filtrazione a flusso perpendicolare (vicolo cieco)

Tale tipo di filtrazione dei brodi di fermentazione è complicato dal problema della bassa porosità e compressibilità dei solidi accumulati, che determinano una graduale diminuzione della permeabilità durante la filtrazione. Con solidi compressibili, un aumento della differenza di pressione tra la membrana può addirittura portare ad una riduzione della velocità di permeazione. Questo problema può essere ridotto utilizzando additivi che, aggiunti al brodo o posti direttamente sul filtro, facilitano la filtrazione. L'additivo più usato è la **diatomite** (roccia sedimentaria formatasi per accumulo dei gusci silicei d'organismi acquatici, principalmente diatomee) e la **perlite** (simile alla pomice, SiO_2 65-70% - Al_2O_3 10-20% - H_2O 2-5%), derivante da rocce vulcaniche. La quantità di additivo da aggiungere dipende dalle caratteristiche del brodo, ma un punto di partenza può essere 50 g/L.

Filtrazione a flusso perpendicolare (vicolo cieco)
gli apparecchi per la filtrazione sono abbastanza
semplici e noti (buchner, gooch etc).



Filtrazione a flusso laminare (crossflow filtration)

La tecnica più comune per realizzare il movimento di un liquido parallelo alla superficie della membrana è di utilizzare pompe. Un tipico sistema di base da laboratorio è illustrato in fig.2; esso consiste di una pompa (per gli usi più comuni con deboli o moderate sovrappressioni, si usa una pompa peristaltica. Altrimenti è necessario utilizzare pompe a lobi rotanti), un recipiente per la raccolta del filtrato ed uno per il recupero del brodo concentrato, manometri, valvole e modulo filtrante. Le dimensioni dei pori più comuni nelle separazioni solido-liquido in biotecnologie sono compresi tra 0.1 e 0.65 μm dei microfiltri, e le dimensioni ancora minori degli ultrafiltri, che sono classificati in base al peso molecolare minimo che sono in grado di trattenere (NMWC: nominal molecular-weight cutoff) Gli ultrafiltri più comuni hanno un intervallo compreso tra i 10.000 ed i 500.000 NMWC.

Filtrazione a flusso laminare (crossflow filtration)

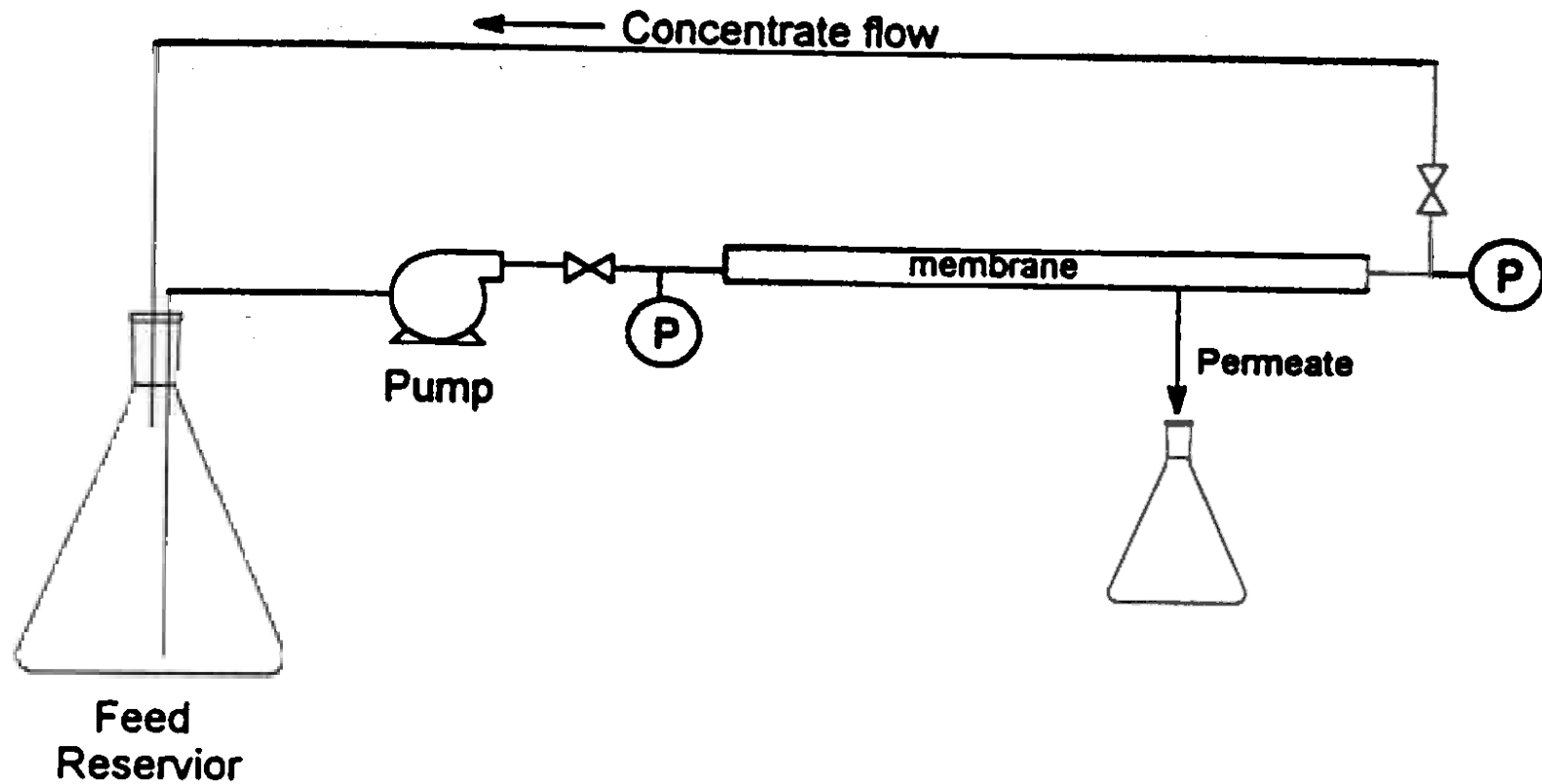


Fig. 2. Crossflow lab setup.

Filtrazione a flusso laminare (crossflow filtration)

Un problema con questo tipo di filtrazione è costituito dalla limitata capacità di trattare liquidi con concentrazioni di particolato relativamente alte ($> 10\%$ vol), o particolato grosso. Questo non perché tali condizioni determinino un'occlusione del filtro, ma esse sono spesso incompatibili con gli altri elementi del sistema, come i tubi, la pompa, le valvole etc: in alcuni casi, allo scopo di eliminare particolato di dimensioni $>$ di $100\ \mu\text{m}$, sono effettuate delle prefiltrazioni grossolane.

Estrazioni di brodi di coltura microbiologici

- 1) rimozione del solido (filtrazione e centrifugazione)
- 2) **estrazioni con solventi** (con solventi sia miscibili che immiscibili con acqua)
- 3) estrazione su fase solida
- 4) adsorbimento su fase espansa (che può essere utilizzata direttamente su brodi di coltura non chiarificati).

Estrazione con solventi

L'estrazione con solventi è ampiamente utilizzata nei primi stadi di purificazione di un prodotto naturale, prima degli stadi finali quali la cromatografia, la cristallizzazione o la precipitazione. Infatti i principali obiettivi dell'estrazione con solventi sono (1) la concentrazione del p.a. e (2) una parziale purificazione del p.a.

Estrazione con solventi

Per l'estrazione possono essere utilizzati liquidi sia miscibili sia immiscibili con acqua. Molto spesso, come vedremo, può essere utilizzato un multiapproccio con la combinazione di diversi solventi.

Lo scopo di questo paragrafo è di dare indicazioni pratiche per la realizzazione, in scala di laboratorio, di un'estrazione con solventi.

Estrazione con solventi

Dovendo sviluppare un procedimento d'estrazione è necessario decidere se:

- 1) procedere prima alla separazione dei solidi od estrarre direttamente l'intero brodo di fermentazione
- 2) quale solvente usare ed in particolare se usarne uno miscibile o immiscibile con acqua

Estrazione con solventi

Per quanto riguarda il primo punto (*separazione dei solidi od estrazione diretta*), esso dipende principalmente dalla localizzazione del principio attivo: se esso in altre parole è nel liquido, associato alla parte solida (cellule) o se è ripartito tra queste due fasi. In quest'ultimo caso, probabilmente l'estrazione diretta del brodo è la decisione migliore. Se il p.a. è completamente nel mezzo liquido, è preferibile prima separare le cellule mediante filtrazione o centrifugazione e quindi procedere al recupero del prodotto mediante estrazione o adsorbimento. Quando il p.a. è completamente associato alle cellule, esistono due approcci generali: il primo consiste nell'estrarre direttamente il brodo e nel procedere quindi alla separazione delle fasi solido/liquido mediante centrifugazione; il secondo consiste nel separare le cellule, che saranno successivamente sottoposte ad estrazione con un solvente miscibile con acqua ed infine separate per filtrazione o centrifugazione

Estrazione con solventi

Per quanto riguarda la seconda decisione (scelta del solvente), l'uso di solventi miscibili con l'acqua determina la diluizione della soluzione, mentre l'uso di solventi immiscibili, se consente un'immediata concentrazione della soluzione del p.a., d'altra parte spesso conduce ad emulsioni.

Coefficienti di ripartizione

L'estrazione liquido-liquido si basa su una diversa distribuzione di un soluto tra due fasi immiscibili ed è solitamente espressa in termini di coefficiente di distribuzione o di ripartizione

$$K = C_a/C_b$$

dove C_a/C_b sono le concentrazioni all'equilibrio rispettivamente nella fase a e b.

Usualmente le fasi iniziali dell'estrazione sono il mezzo di coltura ed un solvente immiscibile, ma nelle successive estrazioni le fasi possono essere due solventi immiscibili (es. metanolo/esano, tetraidrofurano/soluzione acquosa satura di NaCl).

Coefficienti di ripartizione

I coefficienti di ripartizione sono influenzati dalle proprietà della soluzione acquosa (pH, forza ionica) e del solvente (idrofobicità, polarità). I coefficienti di ripartizione sono abbastanza insensibili alla temperatura e, entro certi limiti, alla concentrazione dei soluti. Tra le proprietà della fase acquosa, il pH riveste una particolare importanza, particolarmente per acidi o basi deboli. Molti metaboliti secondari, come la penicillina, sono acidi o basi deboli, ed il pH può essere utilizzato per controllare ed eventualmente invertire il coefficiente di ripartizione. La tabella seguente, mostra una lista di prodotti farmaceutici che sono acidi o basi deboli e che sono estratti con i solventi indicati. Poiché alcuni composti possono essere instabili a valori estremi di pH, è necessario controllarne preventivamente la stabilità.

Solvent Extraction of Antibiotics (20)

Product	Medium	Solvent	pH
Actinomycin	Medium-free cells	1 methanol + 2 methylene chloride	2.5
Adrianimycin	Medium-free cells	Acetone	Acidic
Bacitracin	Cell-free medium	<i>n</i> -Butyl alcohol	7.0
Chloramphenicol	Cell-free medium	Ethyl acetate	Neutral-alkaline
Clavulanic acid	Cell-free medium	<i>n</i> -Butyl alcohol	2.0
Cycloheximide	Cell-free medium	Acetone/chloroform	Acidic
Ethromycin	Cell-free medium	Amyl acetate	Alkaline
Fusidic acid	Cell-free medium	Methyl-isobutyl ketone	6.8
Griseofulvin	Medium-free cells	Butyl acetate	Neutral
Macrolides	Cell-free medium	Methyl-isobutyl ketone, ethyl acetate	Alkaline
Nisin	Cell-free medium	Methylene chloride + secondary octyl Alcohol	
Nisin	Whole broth	Methylene chloride	
Oxytetracycline	Cell-free medium	Butyl alcohol	
Penicillin G	Cell-free medium	Butyl acetate, amyl acetate	2.0
Salomycin	Medium-free cells	Butyl acetate	
Tetracycline	Cell-free medium	Butyl alcohol	
Tylosin	Cell-free medium	Amyl acetate, ethyl acetate	
Virginiamycin	Cell-free medium	Methyl-isobutyl ketone	Acidic

Solventi

La tabella seguente elenca una serie di solventi che possono essere utilizzati nelle estrazioni. I criteri di scelta sono principalmente la selettività e solubilità. Per estrazioni su scala di laboratorio la scelta è più ampia, poiché limitazioni di carattere economico, tossicologico e di sicurezza sono meno vincolanti che non per operazioni estrattive su scala industriale; se tuttavia c'è la possibilità che la procedura sia poi trasferita in scala più grande, altri fattori (costi, tossicità, possibilità di recupero...) devono essere considerati.

Properties of Common Solvents Used in Fermentation Broth Extraction^a

Solvent	Polarity index	Refractive index @20°C	UV (nm) cutoff @ 1 AU	Boiling point, °C	Viscosity (cPoise)	Solubility in water, % w/w
Acetic Acid	6.2	1.372	230	118	1.26	100
Acetone	5.1	1.359	330	56	0.32	100
Acetonitrile	5.8	1.344	190	82	0.37	100
Benzene	2.7	1.501	280	80	0.65	0.18
Butyl acetate	4.0	1.394	254	125	0.73	0.43
<i>n</i> -Butanol	3.9	1.399	215	118	2.98	7.81
Carbon tetrachloride	1.6	1.466	263	77	0.97	0.08
Chloroform	4.1	1.446	245	61	0.57	0.815
Cyclohexane	0.2	1.426	200	81	1.00	0.01
1,2-Dichloroethane	3.5	1.444	225	84	0.79	0.81
Dichloromethane	3.1	1.424	235	41	0.44	1.6
Dimethylformamide	6.4	1.431	368	155	0.92	100
Dimethyl sulfoxide	7.2	1.478	268	189	2.00	100
Dioxane	4.8	1.422	215	101	1.54	100
Ethanol	5.2	1.360	210	78	1.20	100
Ethyl acetate	4.4	1.372	260	77	0.45	8.7
di-Ethyl ether	2.8	1.353	220	35	0.32	6.89
Heptane	0.0	1.387	200	98	0.39	0.0003
Hexane	0.0	1.375	200	69	0.33	0.001
Methanol	5.1	1.329	205	65	0.60	100
Methyl- <i>t</i> -butyl-ether	2.5	1.369	210	55	0.27	4.8
Methyl ethyl ketone	4.7	1.379	329	80	0.45	24
Pentane	0.0	1.358	200	36	0.23	0.004
<i>n</i> -Propanol	4.0	1.384	210	92	2.27	100
iso-Propanol	3.9	1.377	210	82	2.30	100
di-iso-Propyl ether	2.2	1.358	220	68	0.37	
Tetrahydrofuran	4.0	1.407	215	65	0.55	100
Toluene	2.4	1.496	285	111	0.59	0.51
Trichloroethylene	1.0	1.477	273	87	0.57	0.11
Water	9.0	1.333	200	100	1.00	100
Xylene	2.5	1.500	290	139	0.61	0.018

^aData are from Phenomenex® analytical HPLC brochure.

Solventi

Criteri di scelta:

- costo
- caratteristiche tossicologiche
- reperibilità
- selettività verso determinati soluti
- facilità di recupero
- proprietà fisiche (solubilità in H₂O, densità, viscosità, P.E.)
- pericolosità (volatilità, infiammabilità)

Solventi

Solventi immiscibili con H₂O: alcoli (isobutanolo, n-butanolo)

Poco costosi,
facilmente reperibili,
buone proprietà
fisiche (bassa
viscosità e differente
densità rispetto
all'H₂O)

chetoni (metil isobutil chetone)

acetati (butil, etil, isopropil)

idrocarburi (toluene, esano, benzene, etere di
petrolio)

alogenati (cloroformio, cloruro di metilene, di
cloroetano).

Solventi miscibili con H₂O: alcoli (principalmente metanolo).

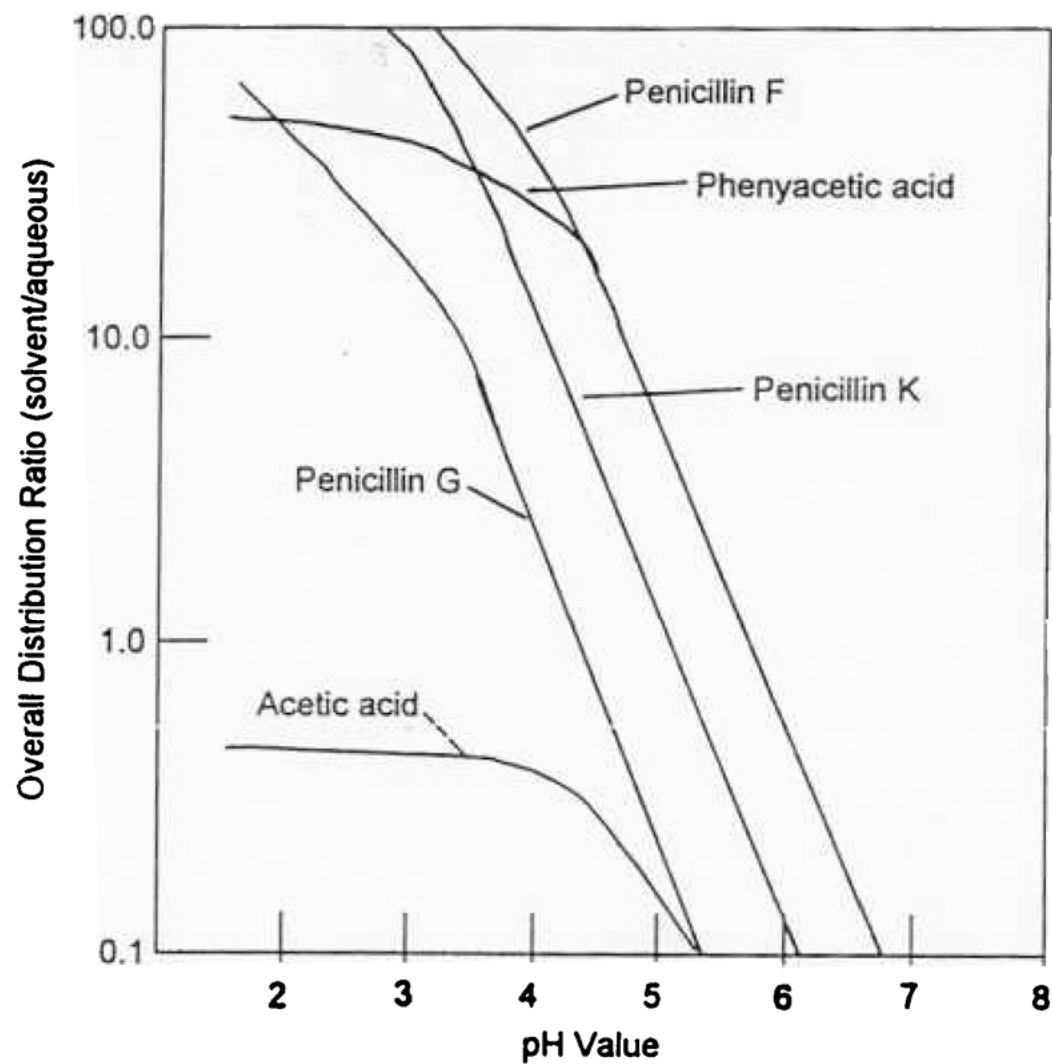


Fig. 3. pH effect on penicillin distribution coefficient between aqueous and solvent (22).

Table 6
Partition Coefficients of Alcohols Between Water
and Organic Solvents at 25°C (21)

Solvent	Methanol	Ethanol	<i>n</i> -Propanol	<i>n</i> -Butanol
<i>n</i> -Hexane	0.0024	0.0083	0.03	0.25
<i>n</i> -Octane	0.0024	0.0068	0.03	0.25
Cyclohexane	0.0016	0.0079	0.028	0.13
Benzene	0.013	0.031	0.23	0.66
Toluene	0.007	0.03	0.15	0.50
Chlorobenzene	0.011	0.021	0.18	0.50
Chloroform	0.055	0.14	0.40	2.2
Carbon tetrachloride	0.008	0.018	0.12	0.51
Diethyl ether	0.14	0.32	0.40	4.1
<i>n</i> -Octanol	0.18	0.50	1.8	7.6
tri- <i>n</i> -butyl phosphate	0.20	0.54	2.7	14.5

Metodi ed esempi

Questi procedimenti possono essere utilizzati per l'estrazione iniziale con il solvente di soluti lipofili e per una purificazione liquido-liquido del solvente estratto.

Se il coefficiente di ripartizione è sufficientemente elevato, basterà una sola estrazione, altrimenti è necessario più di un'estrazione per ottenere rese soddisfacenti.

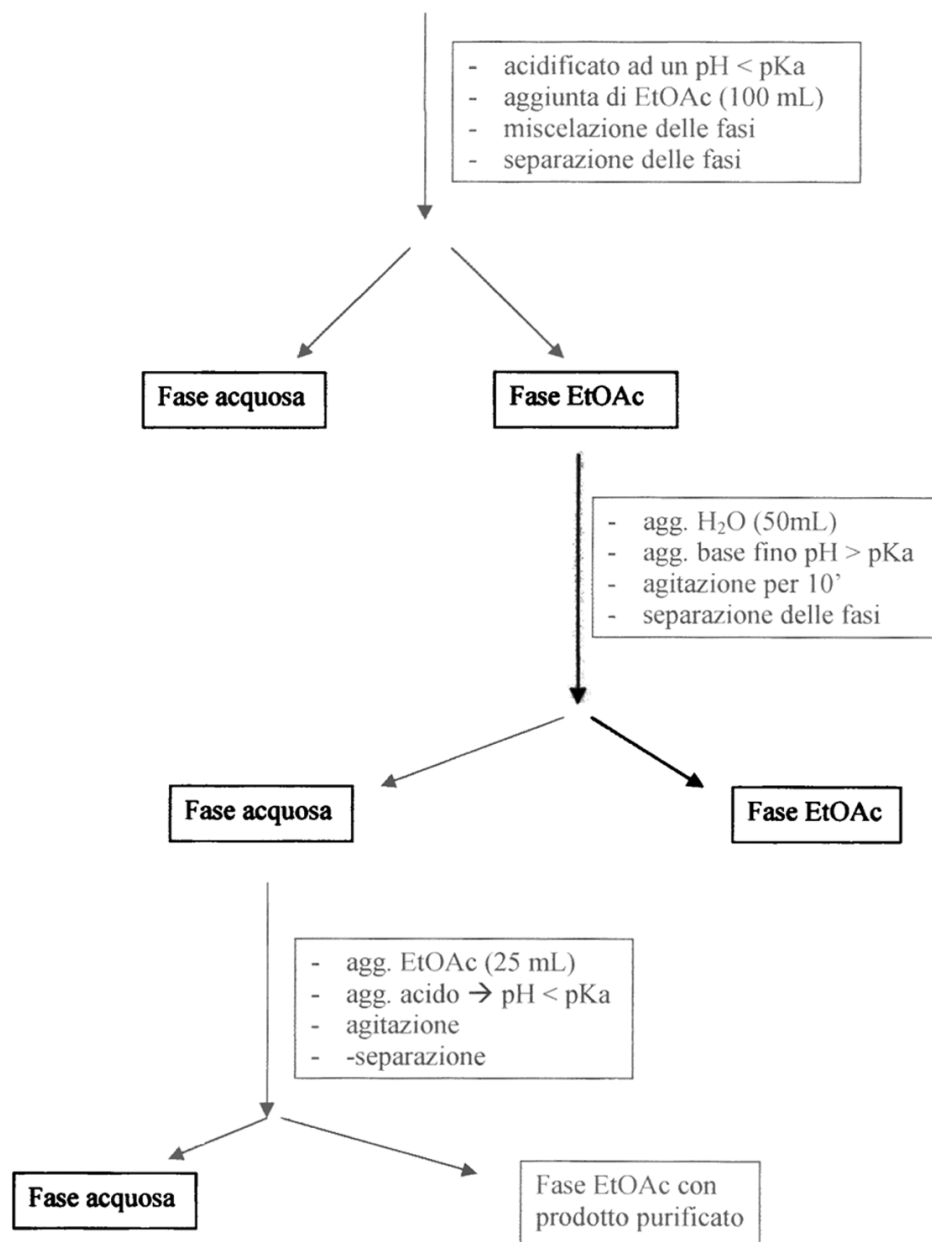
Lo scopo di ciascun esempio è di ottenere un estratto che possa essere facilmente concentrato sotto vuoto ed usato per i successivi stadi finali di purificazione (cromatografia, cristallizzazione, precipitazione).

Example 1: Initial Acetonitrile Extraction Followed by Acetonitrile/Aqueous NaCl Purification

To the fermentation broth held in an Erlenmeyer flask containing a magnetic stir bar, add the minimum amount of acetonitrile needed to solubilize solute. Agitate vigorously until equilibrium has been established. After reaching steady state, transfer the whole broth-acetonitrile mixture to centrifuge bottles and centrifuge to separate solids from the supernatant. If maximum yield is desired, the wet solids should be extracted again with more aqueous acetonitrile (the same composition as the initial whole broth-acetonitrile). Combine the supernatants in an Erlenmeyer flask containing a magnetic stir bar, and while mixing, gradually add sodium chloride until the supernatant forms two liquid phases, an acetonitrile-rich phase and an aqueous-rich phase. Transfer the contents to a graduated separating funnel, and allow the phases to separate by gravity. Note the volume of each and remove a sample of each using a pipet or syringe. Measure the solute concentration in each phase, determine the partition coefficient, and calculate the total amount of solute contained in the upper and lower phases. If solute recovery in the acetonitrile phase is acceptable, discard the lower aqueous phase. If recovery is unacceptable, there are two options to increase recovery. One is simply to back-extract the aqueous phase with more acetonitrile. The other is to simultaneously increase the acetonitrile volume and decrease the aqueous volume. This is done by returning the contents to the Erlenmeyer flask and adding more sodium chloride, mixing well, and then separating the phases.

Estrazione di un Acido Debole con EtOAc

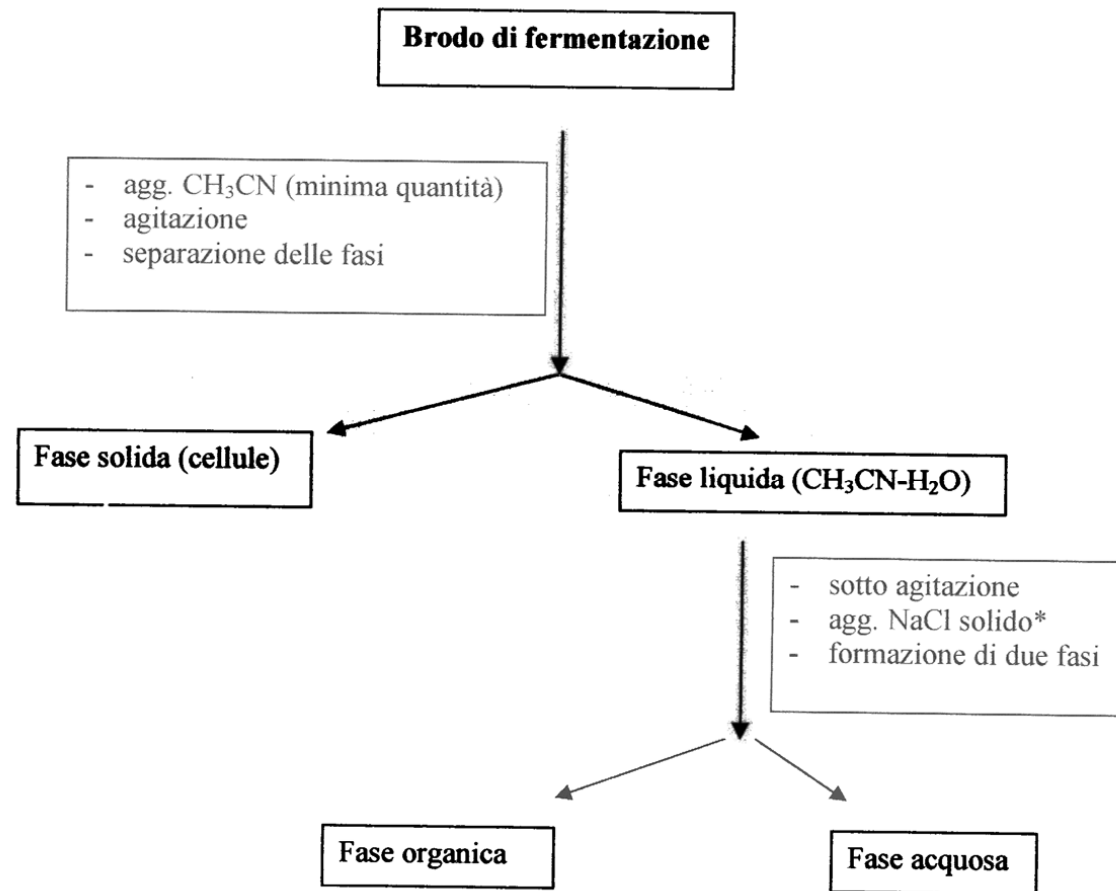
Brodo di fermentazione (200 mL)



Example 2: Initial Acetonitrile Extraction Followed by Aqueous Acetonitrile-Toluene Purification

To the fermentation broth held in an Erlenmeyer flask containing a magnetic stir bar, add the minimum amount of acetonitrile needed to solubilize solute (Note 1). Agitate vigorously until equilibrium has been established. After reaching steady state, transfer the whole broth-acetonitrile mixture to centrifuge bottles and centrifuge to separate solids from the supernatant. If maximum yield is desired, the wet solids should be extracted again with more aqueous acetonitrile (the same composition as the initial whole broth-acetonitrile). Combine the supernatants into a Erlenmeyer flask containing a magnetic stir bar, and while mixing, gradually add toluene until the supernatant forms two liquid phases, a toluene-acetonitrile upper phase and an aqueous acetonitrile lower phase (Note 4). Transfer the contents to a graduated separating funnel, and allow the phases to separate by gravity. Note the volume of each phase and remove a sample of each using a pipet or syringe. Measure the solute concentration in each phase, determine the partition coefficient, and calculate the total amount of solute contained in the upper and lower phases. If solute recovery in the acetonitrile-toluene phase is acceptable, discard the lower aqueous phase. If recovery is unacceptable, back-extract the aqueous phase with more acetonitrile-toluene.

Estrazione con Solventi Miscibili con Acqua



* E' possibile ottenere una separazione delle fasi anche aggiungendo toluene al posto del NaCl; in questo caso la fase organica sarà costituita da toluene-CH₃CN

Example 3: Ethyl Acetate Extraction Followed by pH Swing Purification

Acidify the whole broth to a pH value below the solute's pK_a value. Add 100 mL ethyl acetate to 200 mL acidified whole broth in a 500-mL centrifuge bottle. Place bottle on shaker and agitate vigorously until equilibrium has been established. After reaching steady state, centrifuge in a small laboratory table-top centrifuge equipped with a swinging-bucket rotor in order to separate the liquid phases. Siphon to remove the upper ethyl acetate phase. If the partition coefficient does not strongly favor the ethyl acetate and maximum yield is desired, the aqueous phase should be extracted again with more ethyl acetate. Combine the ethyl acetate extracts in a Erlenmeyer flask containing a magnetic stir bar and add 50 mL water. Adjust the pH to a value above that of the solute's pK_a value using base. Mix the solutions for approx 10 min and then transfer to bottles and centrifuge to separate the liquid phases (Note 6). Using a pipet, remove the lower aqueous phase containing the solute and transfer to an Erlenmeyer flask. If the partition coefficient does not strongly favor the aqueous phase, or if recovery of aqueous phase is low due to emulsion formation, the ethyl acetate should be extracted again with more water. Transfer the aqueous buffer to an Erlenmeyer flask containing a magnetic stir bar and add 25 mL ethyl acetate. Acidify the mixture to the desired pH using acid. Transfer the contents to a graduated separating funnel and allow phases to separate by gravity (Note 7). Note the volume of each phase and remove a sample of each using a pipet or syringe. Measure the solute concentration in each phase, determine the partition coefficient, and calculate the total amount of solute contained in the upper and lower phases. If solute recovery in the ethyl acetate phase is acceptable, discard the lower aqueous phase. If recovery is unacceptable, back-extract the aqueous phase with more ethyl acetate.

Estrazione con Metanolo di Cellule Separate

