

# Pianificazione dell'isolamento di un composto naturale

# Determinazione della natura (polarità) del composto

Prima di iniziare una estrazione è necessario conoscere qualcosa circa la natura del composto da isolare, allo scopo di selezionare un metodo di separazione.

Le caratteristiche generali di una molecola che sono utili conoscere a questo stadio includono: **solubilità**, **proprietà acido/base**, **carica**, **stabilità**, **dimensioni**.

Queste informazioni preventive sono assolutamente necessarie se il nostro scopo è quello di isolare una molecola **completamente sconosciuta**.

In altri casi, in base alle finalità della estrazione, alcune informazioni possono essere già note.

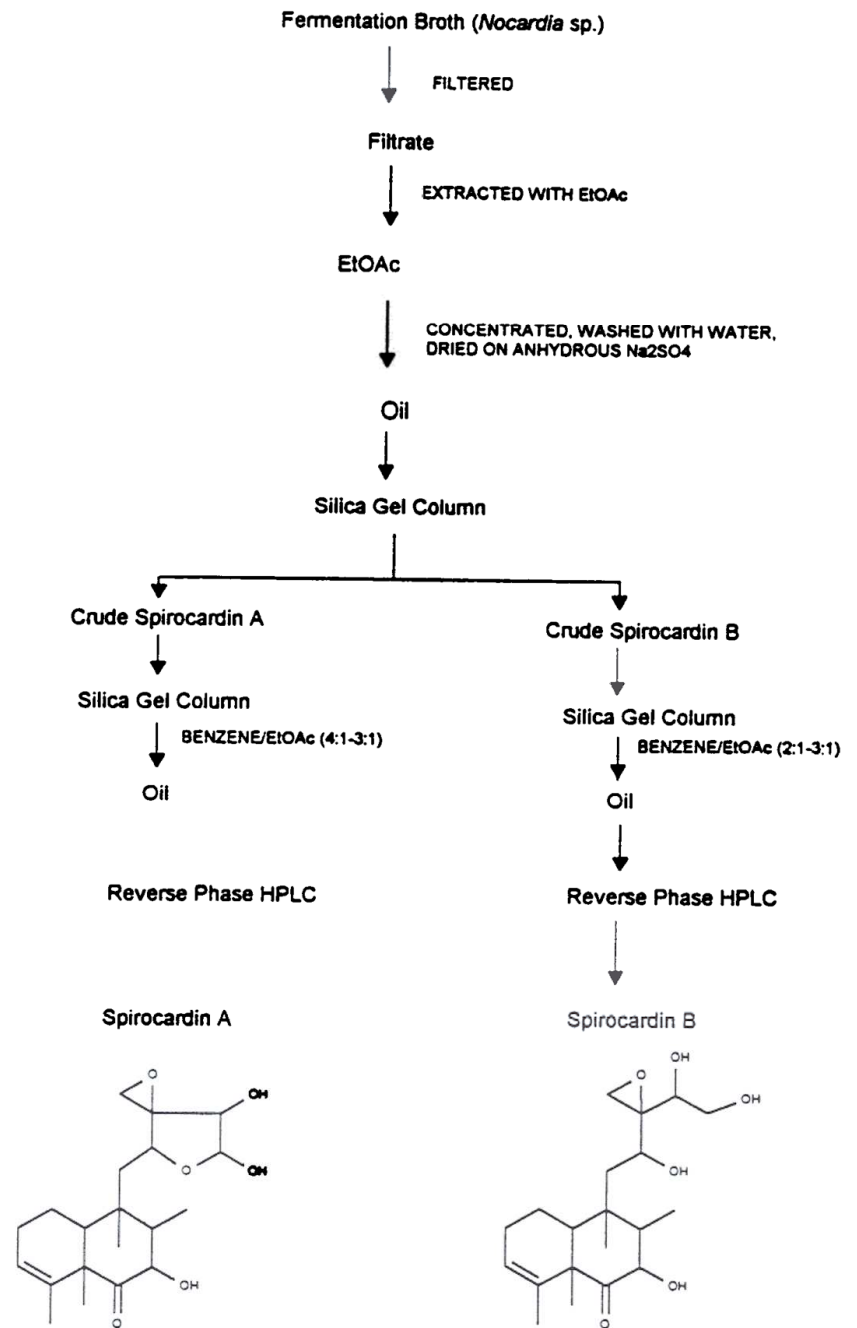
# Fonti di informazione

1. Se lo scopo è quello di **isolare tutti i metaboliti** secondari di un organismo, senza focalizzarsi su una specifica molecola, si può già avere una idea di quali siano le caratteristiche generali dei composti che si intendono isolare; infatti i metaboliti secondari tendono ad avere una distribuzione tassonomicamente ristretta; quindi, solitamente, si conosce la classe di appartenenza di tali metaboliti (steroidi, flavonoidi, terpenoidi, alcaloidi etc.) e quindi si può già avere una idea sulle caratteristiche generali delle sostanze da isolare. Bisogna tuttavia precisare che, anche appartenendo alla stessa classe, i vari metaboliti possono contenere una varietà di funzionalità chimiche ( $\text{OH}$ ,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{OAc}$ ,  $\text{OSO}_3^-$ ,  $\text{NH}_2$ ...) ciascuna delle quali ha la capacità di modificare anche radicalmente le **caratteristiche chimico-fisiche** dei composti e quindi il metodo di purificazione.
2. Se si intende **isolare un composto noto**, gran parte delle informazioni saranno già disponibili o saranno deducibili dalla struttura chimica.
3. Se **il composto che si vuole isolare non è noto**, molto probabilmente si avranno a disposizione pochissime informazioni.

In molti casi la classe chimica del composto presente nell'organismo può essere dedotta sulla base della classificazione tassonomica, anche se questo non sempre consente di definire un semplice metodo di purificazione. (Schema 1). In questo caso (spirocardine), la conoscenza della tassonomia è stata d'aiuto nell'assegnazione della struttura, ma non nel definire il metodo di purificazione

31/05/2011

ESTRATTIVA



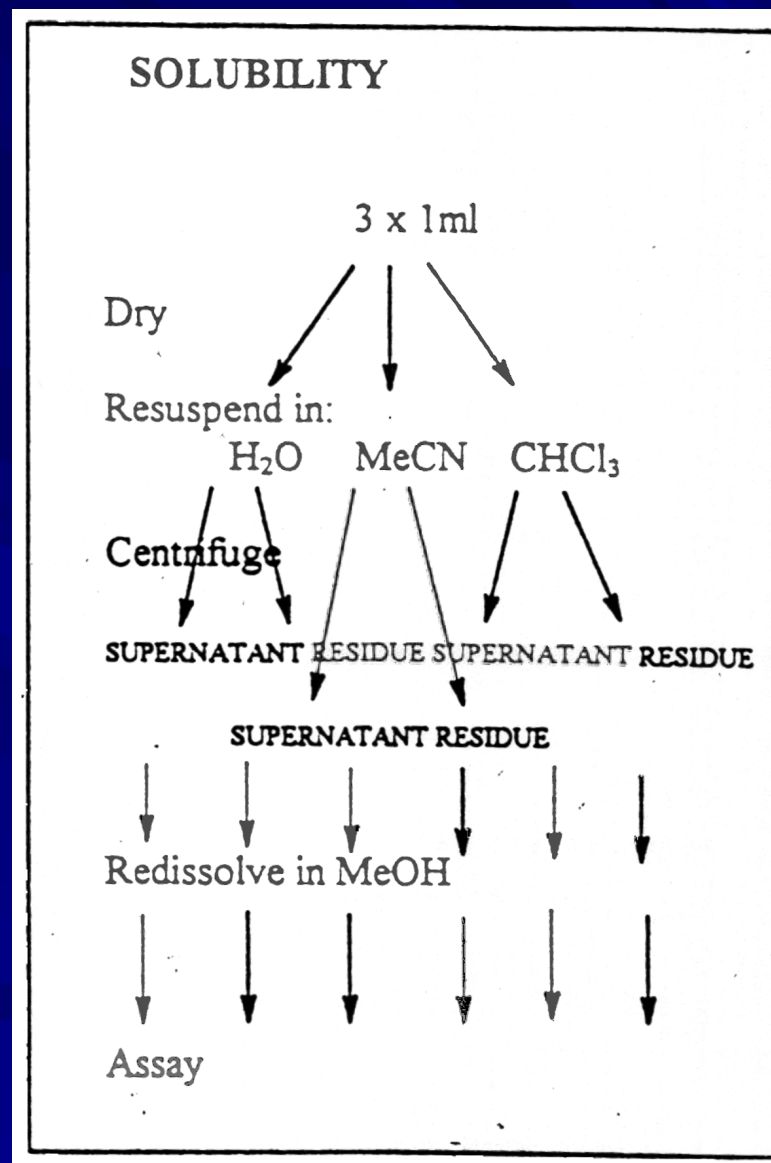
Scheme 1. Isolation of Spirocardins A and B

# *Idrofilicità/liposolubilità (1)*

Una indicazione della polarità del composto in questione può essere determinata essiccando una porzione della miscela e cercando di risolubilizzarla in pochi, forse tre o quattro, solventi coprenti tutto il *range* di polarità. Tali solventi includono: acqua, metanolo, acetonitrile, etile acetato, diclorometano, cloroformio etere di petrolio, esano.

La stessa informazione può essere ottenuta anche conducendo esperimenti di ripartizione liquido/liquido, tipicamente acqua/etile acetato - cloroformio - esano.

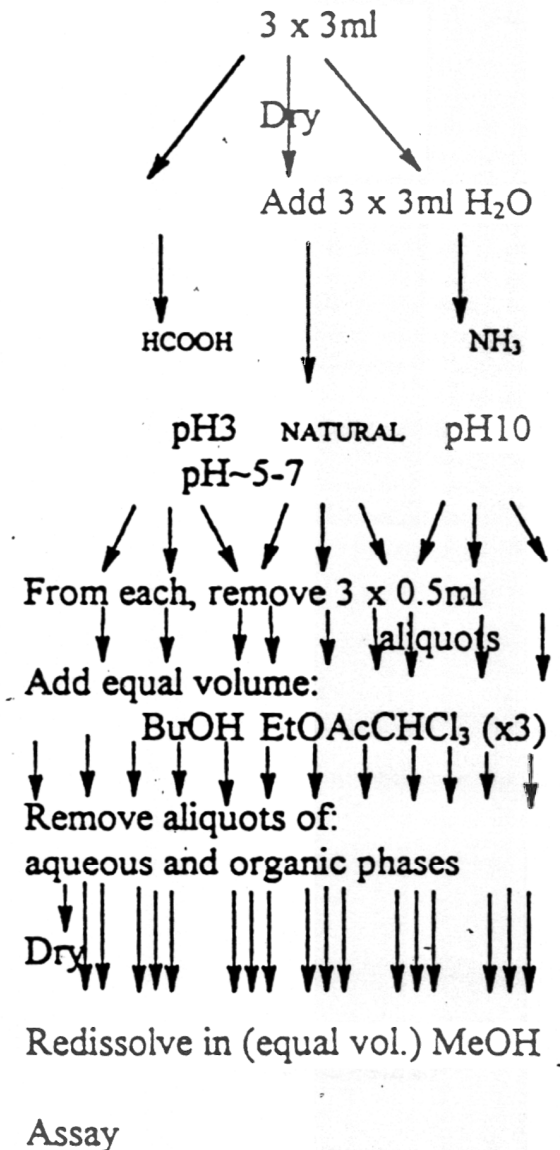
# Idrofilicità/liposolubilità (2)



# pKa (proprietà acido/base)

Ulteriori informazioni possono essere tratte conducendo gli esperimenti di ripartizione suddetti a particolari valori di pH (tipicamente 3, 7, 10)

## SOLVENT PARTITIONS AT DIFFERENT pH VALUES





# Carica

Informazioni circa la carica possono essere ottenute eseguendo dei saggi mediante resine a scambio ionico.

Ad aliquote di miscele acquose (le resine agiscono in acqua) vengono aggiunte porzioni di differenti resine. Una quantità approssimata può essere di 100 mg di resina/ml di brodo di coltura. Dopo l'aggiunta viene saggiato il liquido soprannatante. Tali saggi possono anche condotti a diversi valori di pH (es. 3,0-7,0-10,0), deducendo in tal modo le caratteristiche acido o basiche del composto.



# Stabilità al calore

Se un prodotto naturale biologicamente attivo non è stabile al calore, esso è probabilmente una proteina (o peptide). In tal caso, l'attività biologica può essere dovuta all'attività di un enzima o più semplicemente a legami non-specifici a componenti del saggio biologico, che danno luogo ad interferenze o 'falsa' attività. In genere tuttavia c'è un maggiore interesse per sostanze attive non-proteiche, di basso PM, e **le proteine vengono considerate indesiderate**.

Un tipico test di stabilità al calore consiste nell'incubare il campione a 80/90°C per 10' in un bagno ad acqua (tenendo conto della perdita di volume e di ogni altro cambiamento fisico), e quindi effettuare un saggio biologico. I saggi fisici sono meno appropriati per determinare la stabilità al calore.

Bisogna tuttavia ricordare che anche molecole non-proteiche possono subire modificazioni con il calore. Per evitare l'estrazione delle proteine, il campione può essere estratto con metanolo completamente anidro (le proteine sono solubili in acqua).

# Dimensioni molecolari

Le dimensioni delle proteine possono essere determinate mediante l'ultrafiltrazione su membrane (e quindi anche eliminate). I filtri, che possono operare sotto-pressione, sotto-vuoto o mediante centrifugazione, hanno un *cut-off* ad un determinato peso molecolare e possono quindi essere utilizzate per separare proteine da piccole molecole. Non sono generalmente utili per separare molecole aventi un PM < 2000.

Allo stesso scopo può essere utilizzata la dialisi.

# Selezione delle condizioni generali d'estrazione (1)

**Letteratura.** È sempre opportuno verificare se in letteratura è riportato un metodo d'isolamento che possa essere in qualche modo adattabile al nostro caso, magari apportando delle variazioni al caso in questione (diversa fonte naturale o tipo di attrezzature disponibili) anche per una eventuale ottimizzazione dell'estrazione.

La ricerca bibliografica può basarsi sui seguenti punti:

1. **Attività biologica:** si ricercano composti che esibiscono un'attività biologica simile.
2. **Tassonomia:** si ricercano composti provenienti da fonti tassonomicamente analoghe
3. **Caratteristiche chimiche e fisiche quantificabili:** si ricercano composti aventi analogie strutturali (e quindi le stesse o analoghe proprietà chimiche e fisiche) e che probabilmente avranno metodi estrattivi simili.

Tali ricerche possono essere combinate; ad esempio ricercare composti d'analogia origine tassonomica aventi determinate proprietà biologiche. Non di rado la ricerca bibliografica porta alla conclusione che il principio attivo è già noto (**dereplication**).

# Selezione delle condizioni generali d'estrazione (2)

## ***Estrazione in fase solida (1)***

Consiste nell'estrazione di soluti da una fase liquida da parte di un solido adsorbente, che agisce con gli stessi meccanismi operanti dalle fasi stazionarie delle cromatografie. Questi adsorbenti si presentano spesso come cartucce (da poche centinaia di mg. a qualche grammo) attraverso cui il campione è forzato a passare o a pressione o sotto vuoto. Le fasi solide includono fasi inverse, fasi normali, scambiatori di ioni.

# Estrazione in fase solida

Solid-phase extraction (SPE) is an extraction method that uses a solid phase and a liquid phase to isolate one, or one type, of analyte from a solution. It is usually used to clean up a sample before using a chromatographic or other analytical method to quantitate the amount of analyte(s) in the sample.

The general procedure is to load a solution onto the SPE phase, wash away undesired components, and then wash off the desired analytes with another solvent into a collection tube.

## Instrumentation

Solid-phase extractions use the same type of stationary phases as are used in liquid chromatography columns. The stationary phase is contained in a glass or plastic column above a frit or glass wool. The column might have a frit on top of the stationary phase and might also have a stopcock to control the flow of solvent through the column. Commercial SPE cartridges have 1-10 mL capacities and are discarded after use. The picture below shows a 3 mL cartridge on a vacuum manifold, which increases the solvent flow rate through the cartridge. A collection tube is placed beneath the SPE cartridge (inside the vacuum manifold for the example in the picture) to collect the liquid that passes through the column



# Estrazione in fase solida

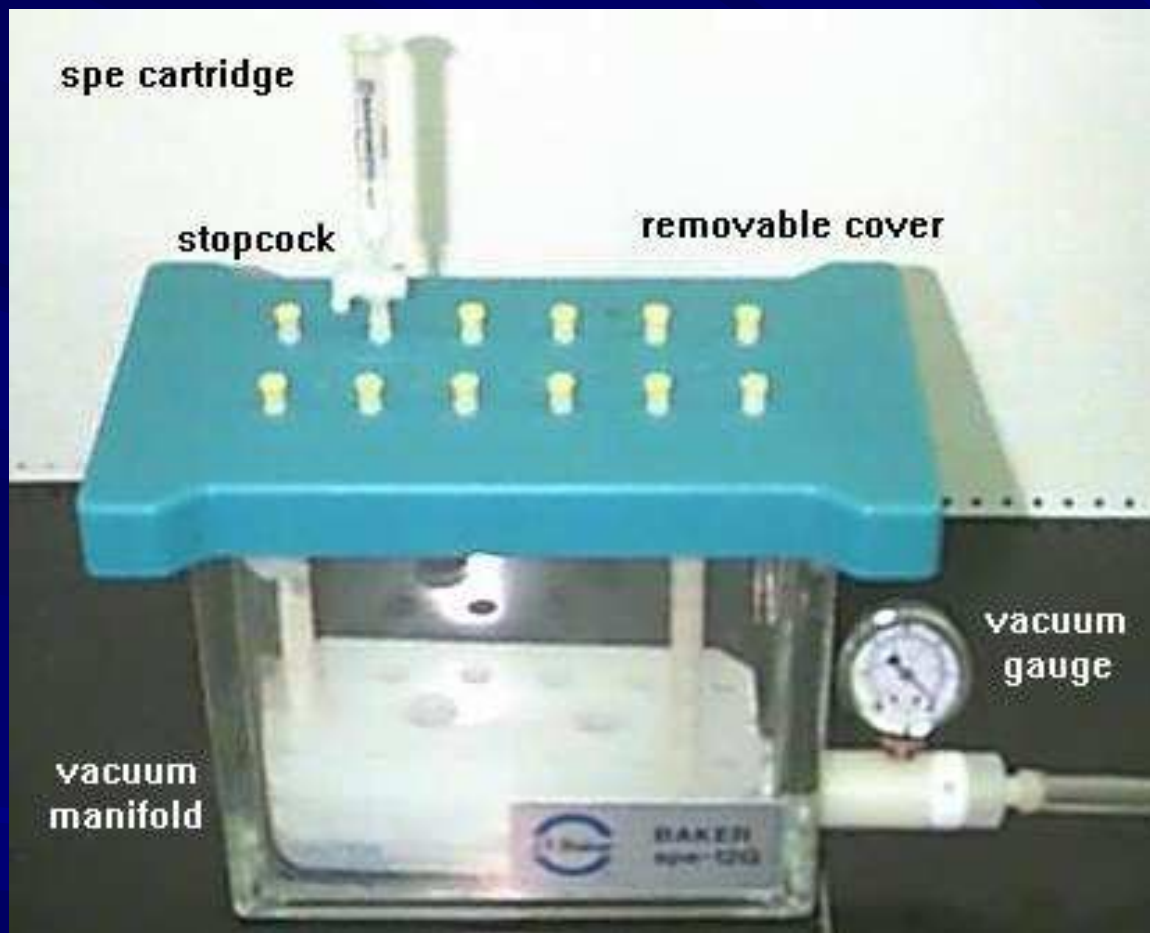


Illustration of a solid-phase extraction set-up



Cartucce SPE

# Selezione delle condizioni generali d'estrazione (3)

## ***Estrazione in fase solida (2)***

Gli usi dell'estrazione in fase solida sono:

1. ***Determinazione della natura di un composto incognito***: la determinazione delle resine che legano il composto fornisce informazioni circa la natura del composto stesso. Per es. se il composto è trattenuto da una fase inversa, esso deve possedere un certo grado d'idrofilicità.
2. ***Selezione delle condizioni di separazione***: per le stesse ragioni, è possibile ottenere qualche informazione circa un adatto metodo di purificazione. Eluendo il materiale legato usando una serie di solventi a diversa polarità, piuttosto che un unico stadio d'eluizione, è possibile dedurre le condizioni cromatografiche che legano selettivamente ed eluiscono un particolare composto.



# Selezione delle condizioni generali d'estrazione (4)

3. **Caratterizzazione**: le caratteristiche di legame del composto su un certo numero di resine può essere utilizzato per confrontare il nostro composto con altri composti noti (**dereplicazione**). Composti che si legano diversamente devono essere diversi, inoltre, se si sospetta che una serie d'estratti contenga lo stesso sconosciuto principio attivo, (ad es. tutti mostrano stessa attività biologica), il fatto che essi esibiscano lo stesso profilo di legame può portare alla decisione d'isolare il composto da un solo estratto e quindi di utilizzarlo come standard per gli altri.
4. **Purificazione a scopo preparativo**: può essere utilizzato come metodo di separazione di per sé; può essere considerato una ripartizione tra due fasi. Può essere utilizzata nei primi stadi di separazione, per separare il prodotto dal grosso dei contaminanti, o negli stadi finali, per ottenere il prodotto puro ed in forma concentrata.
5. **Concentrazione**: può essere utilizzata anche per ottenere la concentrazione del nostro composto.

## ESTRAZIONE IN FASE SOLIDA

**Estrazione in fase solida**  
***(solid phase extraction - SPE)***

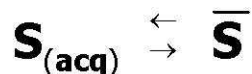


Si sfrutta la distribuzione dell'analita tra il campione liquido ed una fase solida insolubile nella soluzione con la quale è posta a contatto.

Dopo il contatto per un tempo opportuno, la soluzione è rimossa ed il soluto, che è rimasto ancorato alla fase solida, può essere recuperato utilizzando un'opportuna soluzione estraente.

## ESTRAZIONE IN FASE SOLIDA - SPE

Si sfrutta la distribuzione tra una **fase liquida**, generalmente una soluzione acquosa ed una **fase solida insolubile nella soluzione** con la quale è posta a contatto



Dopo il contatto per un tempo opportuno, la soluzione è rimossa ed il soluto, che è rimasto ancorato alla fase solida, può essere recuperato utilizzando un'opportuna soluzione estraente.

Se si utilizza un volume di soluzione estraente molto minore di quello della soluzione iniziale, l'analita viene anche preconcentrato.

Rispetto all'estrazione con solvente:

### Vantaggi

- 😊 migliori fattori di preconcentrazione
- 😊 minore nocività dei reagenti (sia per l'operatore che per lo smaltimento)
- 😊 possibilità di rigenerazione e quindi di riutilizzo della fase solida
- 😊 possibilità di automazione
- 😊 minore possibilità di contaminazione

### Svantaggio

- 😞 necessità di un passaggio in più: eluizione del soluto dalla fase solida

### Una fase solida si caratterizza per

- ❖ il *tipo di gruppo attivo*, che determina le caratteristiche delle sostanze che possono essere adsorbite,
- ❖ la *capacità* di siti attivi contenuti definita come mmol/g di secco,
- ❖ il *tipo di supporto*, che determina le proprietà fisico-meccaniche
- ❖ il *grado di cross-linking*, che determina la capacità di rigonfiarsi quando è a contatto con una soluzione (*swelling*)
- ❖ la *dimensione dei granuli*, definite in genere in *mesh* (n.ro di maglie per pollice quadrato)

## METODI DI ESTRAZIONE IN SPE

**Metodo in BATCH:** si sospende una quantità nota di fase solida in un volume noto di soluzione contenente l'analita e si mantiene sotto agitazione per un tempo sufficiente a raggiungere l'equilibrio. Quindi si separano le due fasi e si risospende la fase solida nella soluzione estraente opportuna per il recupero del soluto.

**Metodo in COLONNA:** un volume noto di soluzione viene fatto fluire per gravità o mediante l'ausilio di pompe, attraverso una colonna impaccata con la fase solida ad una velocità costante (in genere 1 – 2 mL/min). L'analita viene trattenuto dalla fase solida e successivamente eluito con l'opportuna soluzione estraente di volume solitamente inferiore rispetto al volume della soluzione iniziale se si vuole anche ottenere la preconcentrazione dell'analita.



Per **soluti inorganici**, si utilizzano in SPE resine a scambio ionico e complessanti. In generale le resine a scambio ionico e complessanti sono costituite da un reticolo irregolare tridimensionale di catene di natura organica unite tra loro da legami incrociati. Su questa matrice sono fissati dei raggruppamenti ionici (quali  $-\text{SO}_3^-$ ,  $-\text{COO}^-$ ,  $-\text{NR}_3^+$ ) in grado di interagire con uno ione metallico o per semplice scambio ionico o mediante formazione di legami di coordinazione (resine complessanti o chelanti).

Lo scambiatore si dice *cationico* quando contiene delle cariche negative e i cationi sono attratti da questi siti di carica opposta.

Lo scambiatore si dice *anionico* quando contiene dei gruppi carichi positivamente in grado cioè di legare degli ioni di carica negativa.

solitamente uno **scheletro polistirenico** ottenuto per copolimerizzazione dello stirene con il divinilbenzene.

Il contenuto di divinilbenzene può variare dall' 1 al 16% e determina il grado di reticolazione (cross-linking).

Gli anelli benzenici possono venire modificati per produrre una resina a scambio cationico contenente gruppi **solfonato** ( $-\text{SO}_3^-$ ) oppure una resina anionica contenente **gruppi ammonici** ( $-\text{NR}_3^+$ ).

Se al posto dello stirene si usa **acido metacrilico** si ottiene una resina con gruppi **attivi carbossilici** e scheletro acrilico divinilbenzenico ( $-\text{COO}^-$ ).

**La comune definizione delle resine ioniche è fatta sulla base della acidità del loro gruppo attivo:**

<b>Scambiatori cationici forti</b>	<b><math>\text{RSO}_3^-</math></b>
<b>Scambiatori cationici deboli</b>	<b><math>\text{RCOO}^-</math></b>
<b>Scambiatori anionici deboli</b>	<b><math>\text{RNR}'_2\text{H}^+</math></b>
<b>Scambiatori anionici forti</b>	<b><math>\text{RNR}'_3^+</math></b>

Il **grado di reticolazione** in questi scambiatori è variabile ed è scelto in funzione delle caratteristiche che deve presentare lo scambiatore.

Resine con **alto grado di reticolazione** sono **rigide** e **poco porose**, lente nel raggiungere l'equilibrio, anche se la selettività e la capacità sono maggiori, rispetto alle resine con **basso grado di reticolazione** (dette anche macroporose) sono più **veloci ad equilibrarsi** ma che **si rigonfiano d'acqua**.

L'**affinità** maggiore per la fase resina è per ioni:

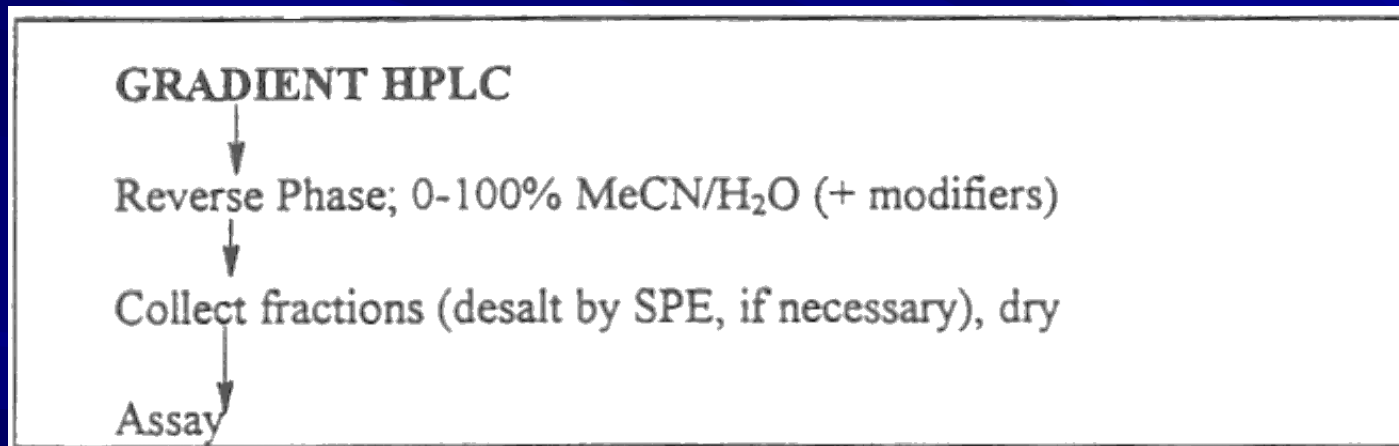
- a carica elevata,
- a piccolo raggio di idratazione,
- molto polarizzabili (polarizzabilità è capacità della nuvola elettronica di uno ione a venir deformata da cariche vicine e a formare un dipolo).

$\text{Pu}^{4+} > \text{La}^{3+} > \text{Ce}^{3+} > \text{Pr}^{3+} > \text{Eu}^{3+} > \text{Al}^{3+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{UO}_2^{2+} > \text{Ti}^+ > \text{Ag}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Li}^+$



# HPLC a gradiente

Sulla base dei tempi di ritenzione, dovrebbe essere possibile selezionare condizioni generali cromatografiche per le successive purificazioni preparative



# TLC

La TLC può essere utilizzata per la selezione delle condizioni cromatografiche. Condizioni che determinano separazione tra i vari componenti la miscela ed un  $R_f$  utile per il nostro prodotto, in altre parole  $>$  di 0 e  $<$  di 1 (tipicamente 0.3), possono essere approssimativamente trasferite a colonne cromatografiche. Mediante la TLC è anche possibile confermare l'identità del nostro prodotto con uno standard. Già abbiamo parlato dei saggi sovrapposti, che consentono di identificare i componenti biologicamente attivi.

# Strategia generale d'estrazione

1. Rilascio del principio attivo dal mezzo intracellulare o dalla massa cellulare e rimozione del grosso della matrice biologica
2. separazioni a bassa risoluzione
3. separazioni ad alta risoluzione

# Strategia generale d'estrazione (1° stadio)

Rilascio del principio attivo dal **mezzo intracellulare** o dalla **massa cellulare** e rimozione del *grosso* della matrice biologica. Gran parte della **biomassa** (piante o microrganismi) si presenta come un materiale inerte, insolubile, spesso di natura polimerica, come la cellulosa delle piante o funghi e le pareti cellulari dei microrganismi. Il *primo stadio dell'estrazione consiste nel rilascio e nella solubilizzazione delle piccole molecole o ioni, attraverso un'estrazione con solventi o con acqua, e nella loro separazione dalla matrice biologica*. Questa operazione può essere fatta o con un solvente unico, ad esempio il metanolo, che è in grado di disciogliere gran parte dei metaboliti secondari e contemporaneamente facilitarne il rilascio dalla matrice biologica (funzionando come permeabilizzante le membrane cellulari), o anche attraverso una serie d'estrazioni, mediante solventi di varia polarità, ciò che costituisce già un primo stadio di frazionamento. Il *grosso* della biomassa può essere rimosso attraverso filtrazione o centrifugazione.

## Strategia generale d'estrazione (2° stadio)

Una volta fatta questa prima separazione, generalmente si ottiene una miscela ancora abbastanza complessa. Gran parte di questo materiale, in parte di natura inorganica o comunque molto polare, grossolanamente differente dal nostro composto, è in genere relativamente poco polare. Lo scopo di questo secondo stadio è quello di eliminare gran parte di questo materiale mediante separazioni: a bassa risoluzione. Tale stadio coinvolge generalmente una serie di estrazioni liquido-liquido o colonne aperte di silice con lo scopo di ottenere una miscela, contenente il nostro prodotto, adatta agli stadi finali di purificazione.

# Strategia generale d'estrazione (3° stadio)

Il terzo stadio consiste in separazioni ad alta risoluzione dei componenti la miscela effettuata spesso mediante HPLC [HPLC 90-100.000 PT/m; TLC 300-500 PT/m].

-----

*Come si vede, durante tutto il processo d'estrazione il nostro composto subisce una progressiva concentrazione e purificazione; i processi di purificazione devono essere via via più sofisticati, in quanto le impurezze che accompagnano il nostro prodotto hanno caratteristiche sempre più simili alle sue. Questa descrizione è certamente una semplificazione. Molte separazioni non si dividono così precisamente in stadi definiti, e spesso si possono saltare alcuni stadi. A volte (di rado, purtroppo!), allo stadio d'estrazione può direttamente seguire una cristallizzazione del prodotto.*

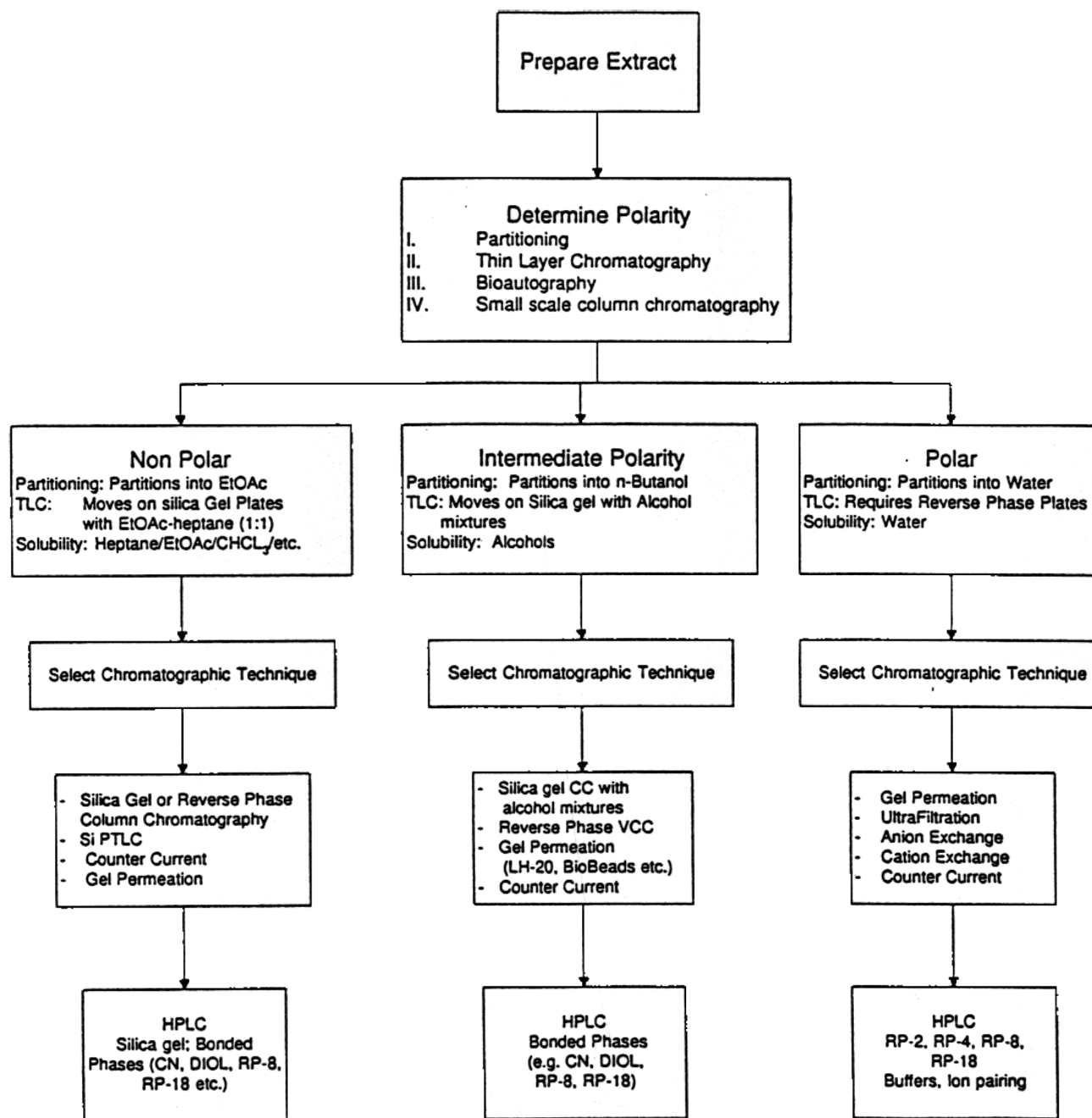


Fig. 1. General isolation approach