Estrazione e analisi TLC di principi attivi da farmaci

Obiettivo: comprendere come le proprietà molecolari influenzino l'estrazione da una matrice solida e la separazione cromatografica, fino al confronto di un campione incognito con standard noti.

1. Dal farmaco al principio attivo

Una formulazione farmaceutica contiene uno o più principi attivi e diversi eccipienti, necessari per ottenere caratteristiche tecnologiche e di somministrazione appropriate. Il campione è quindi una matrice complessa: l'obiettivo non è dissolvere indistintamente tutti i suoi componenti, ma trasferire nel solvente una quantità sufficiente del composto di interesse per analizzarlo.

Nell'esperienza si considerano ketoprofene, paracetamolo e acido acetilsalicilico, oltre a un campione incognito. Il confronto tra gli estratti sarà effettuato con cromatografia su strato sottile (TLC).

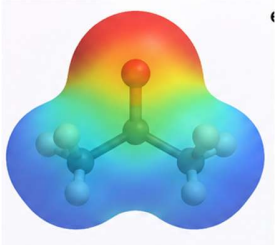
2. Estrazione solido–liquido: il ruolo della solubilità

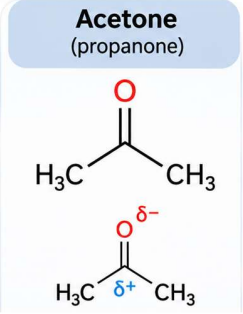
L'estrazione solido-liquido consiste nel trasferimento di molecole da una matrice solida a un solvente liquido. Il trasferimento dipende dalla solubilità del composto nel solvente, dall'accessibilità delle molecole all'interno della matrice e dalla velocità con cui esse diffondono verso la soluzione.

La **solubilità di un composto in un determinato solvente** dipende principalmente dalla sua struttura molecolare e dalla natura delle interazioni intermolecolari che può stabilire con il solvente stesso. In generale, sostanze con caratteristiche di polarità simili tendono a essere reciprocamente solubili, secondo il principio **«il simile scioglie il simile»**. In particolare, la presenza di gruppi funzionali polari, capaci ad esempio di formare legami a idrogeno, può favorire la solubilità nei solventi polari, mentre composti prevalentemente apolari tendono a sciogliersi meglio in solventi apolari. Anche la possibilità che un composto si trovi in forma ionizzata può influenzarne significativamente la solubilità.

Perché si usa l'acetone?

Il protocollo prevede una macerazione con 2 mL di acetone per campione. L'acetone è un solvente organico polare aprotico: il gruppo carbonilico può accettare legami a idrogeno, mentre i gruppi metilici contribuiscono alla compatibilità con porzioni meno polari. Può quindi solubilizzare numerose molecole organiche contenenti sia gruppi polari sia regioni idrofobiche. La selettività non è assoluta: anche alcuni eccipienti possono essere estratti.





Perché polverizzare e agitare?

L'efficienza di un'estrazione dipende non soltanto dalla scelta del solvente, ma anche dalle condizioni in cui il solvente viene messo a contatto con il materiale da estrarre.

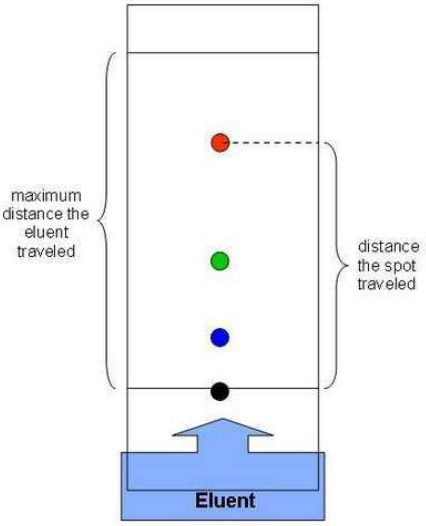
Un primo fattore importante è rappresentato dalle **dimensioni delle particelle**. La polverizzazione del materiale mediante mortaio e pestello permette di ottenere particelle più piccole, aumentando la superficie di contatto con il solvente e facilitando il passaggio dei composti di interesse dalla matrice solida alla soluzione. Anche l'**agitazione** favorisce il processo estrattivo, migliorando il contatto tra il solvente e il materiale solido e facilitando la diffusione delle sostanze disciolte nel liquido. Nell'esperienza di laboratorio, l'agitazione viene effettuata mediante un vortex.

Un altro fattore che può influenzare l'estrazione è la **temperatura**. Un aumento della temperatura può favorire la dissoluzione e accelerare il processo estrattivo, ma non è sempre opportuno, soprattutto quando si lavora con sostanze sensibili al calore. A seconda delle condizioni operative, si distinguono diverse tecniche di estrazione. Nella **macerazione**, il materiale viene lasciato a contatto con il solvente a temperatura ambiente; nell'**infusione** si utilizza un solvente caldo, mentre nella **decozione** il materiale viene fatto bollire insieme al solvente.

Nell'esercitazione sarà utilizzata un'**estrazione per macerazione con acetone**, preceduta, quando necessario, dalla polverizzazione del farmaco e favorita dall'agitazione mediante vortex.

3. La TLC

La cromatografia su strato sottile separa sostanze in base alla loro diversa distribuzione tra una fase stazionaria e una fase mobile. Qui la fase stazionaria è gel di silice depositato su una lastrina; la fase mobile è una miscela di solventi che risale per capillarità.



La **silice**, utilizzata come fase stazionaria nella TLC, è un materiale polare la cui superficie presenta numerosi **gruppi silanolici (Si–OH)**. Questi gruppi possono stabilire interazioni intermolecolari con i composti da separare, in particolare **legami a idrogeno e interazioni dipolo-dipolo**. Durante l'eluizione cromatografica, i componenti della miscela vengono trasportati dall'eluente lungo la lastrina, ma contemporaneamente tendono a interagire con la superficie della silice. I composti che interagiscono più intensamente con la silice vengono trattenuti maggiormente e percorrono distanze minori. Al contrario, i composti che interagiscono più debolmente con la silice e vengono trasportati più facilmente dalla fase mobile migrano più rapidamente, percorrendo distanze maggiori lungo la lastrina.

In una TLC su silice, **a parità di condizioni cromatografiche, i composti più polari tendono generalmente a essere trattenuti maggiormente**, mentre quelli meno polari tendono a migrare più lontano.

4. La scelta della fase mobile

Il protocollo impiega ligroina : acetato di etile : acido acetico nel rapporto volumetrico 5,5 : 3,5 : 1.

La ligroina è una miscela di idrocarburi poco polari; l'acetato di etile è più polare e compete con gli analiti per le interazioni con la silice, aumentando in genere la capacità eluente della miscela. L'acido acetico modifica l'ambiente cromatografico e può ridurre interazioni indesiderate e fenomeni di strisciamento per alcuni composti acidi. Il risultato dipende dalla miscela nel suo insieme. La camera va chiusa e lasciata equilibrare con i vapori dell'eluente per favorire uno sviluppo più regolare.

5. Deposizione, eluizione e visualizzazione

Si traccia a matita una linea di partenza circa 1 cm sopra il bordo inferiore della lastrina e si depositano piccoli punti degli estratti, con l'incognito al centro. Macchie iniziali troppo grandi o troppo concentrate possono allargarsi e sovrapporsi, rendendo difficile il confronto. Quando il fronte del solvente è vicino alla parte superiore, la lastrina viene rimossa e il fronte segnato immediatamente a matita, prima che evapori il solvente*. Dopo asciugatura si osserva sotto luce UV, utilizzando la modalità e la lastrina indicate in laboratorio. Molti composti organici, infatti, sono incolori e, pertanto, non possono essere osservati direttamente sulla lastrina cromatografica. Per renderli visibili, si possono utilizzare **lastre TLC contenenti un indicatore fluorescente**, generalmente indicate con la sigla **F254**.

Queste lastre contengono una sostanza fluorescente che, quando viene irradiata con **luce ultravioletta (UV) a 254 nm**, assorbe questa radiazione ed emette luce visibile. Di conseguenza, la superficie della lastrina appare luminosa, generalmente di colore verde.

Alcuni composti organici, in virtù delle caratteristiche della loro struttura molecolare, sono in grado di assorbire la radiazione UV utilizzata per illuminare la lastrina. In corrispondenza dei punti in cui si trovano questi composti, la fluorescenza dell'indicatore viene ridotta o impedita.Si osservano così **macchie scure su uno sfondo luminoso**, che permettono di individuare la posizione dei diversi composti separati e di calcolarne il **fattore di ritenzione (Rf)**. È importante sottolineare che **non sono i composti a produrre lo sfondo luminoso**: questo è dovuto all'indicatore fluorescente presente sulla lastrina. I composti vengono individuati perché provocano una diminuzione della fluorescenza nelle zone in cui sono presenti.

*in alternativa, si segna prima il limite superiore e si fa attenzione ad estrarre la lastra quando il sistema eluente lo raggiunge

6. Il fattore di ritenzione (Rf)

Il fattore di ritenzione si calcola come:

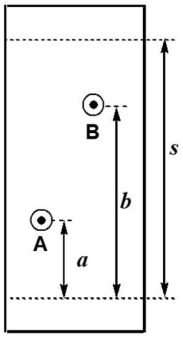
Rf = distanza percorsa dall'analita*/ distanza percorsa dal fronte del solvente

*Si deve prendere il centro della macchia

Le due distanze si misurano dalla linea di deposizione, lungo la direzione di sviluppo. Per esempio, se una macchia percorre 3,0 cm e il fronte 6,0 cm, Rf = 0,50. Il valore è adimensionale e, in condizioni ordinarie, compreso tra 0 e 1.

Fattore di ritenzione Rf

Il rapporto tra la distanza percorsa dal componente e la distanza percorsa dal fronte del solvente è una costante.



$$Rf(\mathbf{A}) = \frac{\text{distanza percorsa dal composto } \mathbf{A}\ (a)}{\text{distanza percorsa dal fronte delsolvente (s)}}$$

$$Rf(\mathbf{B}) = \frac{\text{distanza percorsa dal composto } \mathbf{B}\ (b)}{\text{distanza percorsa dal fronte delsolvente (s)}}$$

Utilizzo del fattore di ritenzione (Rf) per identificare un composto incognito

Il **fattore di ritenzione (Rf)** può essere utilizzato per confrontare il comportamento cromatografico di composti diversi e contribuire all'identificazione di una sostanza incognita. Ogni composto, in determinate condizioni cromatografiche, presenta un valore di Rf che dipende dalle sue interazioni con la fase stazionaria e con la fase mobile. **Il valore di Rf non è quindi una proprietà assoluta del composto**, ma dipende anche dalle condizioni in cui viene effettuata l'analisi, in particolare dalla natura della fase stazionaria e dalla composizione dell'eluente.

Per identificare un composto incognito, è possibile **confrontare il suo Rf con quello di sostanze note**, utilizzate come riferimenti (*standard*). Affinché il confronto sia attendibile, tutti i campioni devono essere analizzati nelle stesse condizioni cromatografiche.

Nell'esercitazione di laboratorio, sulla stessa lastrina TLC saranno depositati gli estratti di **tre farmaci noti e di un farmaco incognito**. Durante l'eluizione cromatografica, tutti i campioni saranno sottoposti alle stesse condizioni, poiché utilizzeranno la medesima fase stazionaria e lo stesso eluente. Dopo aver visualizzato le macchie sotto luce UV, si procederà nel seguente modo:

1. Si individueranno le macchie corrispondenti ai principi attivi dei tre farmaci noti e del campione incognito.

2. Si misurerà, per ciascuna macchia, la distanza percorsa rispetto alla linea di deposizione e si calcolerà il relativo **Rf**.
3. Si confronterà il valore di Rf del composto incognito con quelli dei tre principi attivi noti.
4. Se il valore di Rf dell'incognito risulta uguale, o molto vicino, a quello di uno dei composti noti, si potrà **ipotizzare che si tratti dello stesso principio attivo**.

Ad esempio, se i tre principi attivi noti presentano valori di Rf pari a 0,25, 0,48 e 0,72 e il composto incognito presenta un Rf di 0,49, quest'ultimo potrebbe corrispondere al secondo principio attivo.

È importante ricordare, tuttavia, che **due composti differenti possono presentare valori di Rf molto simili**, anche nelle stesse condizioni cromatografiche. Pertanto, la coincidenza dei valori di Rf permette di formulare un'ipotesi sull'identità del composto, ma non rappresenta una prova definitiva.

Nella nostra esercitazione, poiché il farmaco incognito deve essere individuato tra un numero limitato di farmaci noti, **il confronto dei valori di Rf costituisce un criterio utile per riconoscere il principio attivo presente nel campione incognito**.