Marini-Bettòlo, G.B. & Juan A. Coch Frugoni (1956)
Gazzeta Chimica Italiana 86: 1324-1331.

131. G. B. MARINI-BETTÒLO e Juan A. COCH FRUGONI. — Influenza del pH nella separazione elettroforetica su carta degli alcaloidi. (*)

Riassunto. — E' stato effettuato uno studio sistematico sul comportamento all'elettroforesi su carta di circa 70 alcaloidi impiegando come elettroliti soluzioni tampone a pH compresi tra 2 e 12.

E' stato così osservato, confermando alcuni precedenti risultati che in tal modo è possibile separare numerosi alcaloidi già usando un solo pH, ed inoltre che nella maggior parte dei casi è possibile giungere alle separazioni di miscele complesse variando opportunamente il pH.

I risultati ottenuti nella separazione di alcaloidi del gruppo delle *Strychnos* mediante le tecniche elettroforetiche su carta ci hanno indotto a studiare, applicando il principio che la mobilità degli ioni è funzione del pH, la possibilità di separare miscele complesse di alcaloidi mediante la elettroforesi su carta a diversi pH ([1, 2]).

Le ricerche sulla separazione elettroforetica degli alcaloidi oltre ai lavori già menzionati sono fino ad oggi limitate. Burma ([3]) ha studiato vari gruppi di alcaloidi concludendo che era possibile con questo metodo dividere gli alcaloidi in gruppi, ma non già separare i componenti dei gruppi stessi. Lo stesso Autore non riferisce dati quantitativi nè le modalità delle separazioni effettuate.

Karyone, Hashimoto e coll. ([4]) hanno effettuato esperienze su una ventina di alcaloidi naturali e riferiscono una serie di dati quantitativi sulla migrazione dei vari ioni in acido acetico 5 N a 750 volts, 0,5 mA/cm in due ore.

Ci è sembrato interessante studiare pertanto sistematicamente l'effetto del pH sulla migrazione di un certo numero di alcaloidi in modo da avere una base sulla quale potere prevedere le condizioni optimum per la separazione di queste sostanze.

A questo scopo abbiamo esaminato circa una settantina di alcaloidi della costituzione più diversa, compresi alcuni alcaloidi dei curari e delle

(*) Lavoro presentato al XV Congresso di Chimica Pura e Applicata - Lisbona 8-16 settembre 1956.

([1]) G. B. Marini-Bettolo e M. Lederer, Nature, *174*, 133 (1954).

([2]) J. A. Coch Frugoni, Anal. Fac. Quim. y Farm. (Montevideo), 5 (1956) in corso di stampa.

([3]) J. Burma, Naturwiss., *41*, 19 (1954).

([4]) T. Karyone, Y. Hashimoto, I. Mori e M. Kimura, J Pharm. Soc. (Japan), *73*, 805 (1953).

Strychnos, effettuando le esperienze a sei pH diversi e precisamente a pH 2,3; 4,3; 6,4; 8,2; 10,5 e 11,4. usando a questo scopo il tampone universale di Britton-Robinson.

Dato che è molto difficile eliminare totalmente i fattori elettrosmotici e capillari, abbiamo seguito un procedimento identico in ogni caso in modo da ottenere risultati riproducibili.

A partire da pH 6,4 abbiamo diluito il tampone di Britton perchè data l'elevata forza ionica si manifestava una eccessiva evaporazione del solvente che poteva essere eliminata solo con l'uso di apparecchi speciali.

Comunque i dati sono confrontabili direttamente nello stesso campo di pH.

I risultati di queste esperienze sono riportati nella tab. I. Gli alcaloidi sono stati messi in evidenza negli elettroferogrammi mediante l'osservazione diretta alla luce U.V. filtrata (filtro Corning Dow N. 9863), lo sviluppo con vapori di iodio, oppure spruzzando il foglio con il reattivo iodoplatinico in ambiente acido o con iodobismutato di potassio in ambiente alcalino.

Dall'esame della tabella si può dedurre che a pH acidi gli alcaloidi tutti si comportino come cationi, mentre a pH neutri o alcalini gli alcaloidi che posseggono altre funzioni (ossidrili, gruppi lattonici, idrogeni acidi, ecc.) si possono comportare come anioni.

In pratica l'elettroforesi su carta a diversi pH consente la separazione di alcaloidi quando questi abbiano diversi valori di pK oppure anche quando avendo valori prossimi di pK presentano velocità massime differenti.

I valori che sono stati ottenuti sono riproducibili, ma, come altre misure elettroforetiche su carta, non possono essere assunti come assoluti, in quanto la mobilità di un alcaloide non dipende solo dal pH e dal campo elettrico, ma anche dal flusso elettrosmotico, dalla forza ionica e dalla corrente di liquido dall'estremità verso il centro, conseguenza dell'evaporazione dovuta all'effetto Joule.

I risultati ottenuti danno un'idea approssimata del comportamento elettroforetico degli alcaloidi impiegati ai diversi pH e permettono di avere una base di orientamento nella soluzione di problemi analitici, quali la separazione di alcaloidi e il loro riconoscimento in estratti naturali, oppure in miscele artificiali (preparati farmaceutici, riconoscimenti tossicologici).

Queste differenze di comportamento nella migrazione consentono di separare e riconoscere alcaloidi vicini tra loro e anche appartenenti allo stesso gruppo; ad es. la tubocurarina dalla dimetiltubocurarina.

Ambedue questi alcaloidi sono basi ammoniche quaternarie con la differenza che la prima possiede due ossidrili liberi che nella seconda sono eterificati da gruppi metilici.

TABELLA I.

N.	Alcaloidi	Spostamento in mm verso il catodo nel tempo di 3h					
		pH 2,3	pH 4,3	pH 6,4	pH 8,2	pH 10,5	pH 11,4
1	Galegina	91	130	118	120	108	68
2	Efedrina	80	100	100	119	106	22
3	Mezcalina	74	70,5	102	93	82	12
4	Piperina	0	0	4	0	0	0
5	Coniina	89	89	130	120	100	21
6	Arecolina	88	97,5	136	90	28	—
7	Nicotina	180	92	123	87	45	16
8	Tropina	75	66	145	58,5	0	0
9	L-Iosciammina	66	66	103	88	69	18
10	Atropina	63	66	107	84	80	15
11	Omatropina	63	84	104	105	100	16
12	Tropacocaina	67	86	102	106	88	20
13	Scopolammina	67	66,5	104	60	33	13
14	Cocaina	61	68	110	85	53	15
15	Lupinina	80	83	121	105	104	13
16	Lupanina	58	73,5	106	93	87	18
17	Sparteina	115	100	108	101	99	47
18	Sparteina iodometilato	120	119	131	102	90	63
19	Idrastina	50,5	54	61	0	0	0
20	Idrastinina	95	99	132	125	113	45
21	Narcotina	50	53	54	0	0	0
22	Cotarnina	84	85	125	113	108	45
23	Narceina	40	13	26	17	16,5	-15 (-5)
24	Bicucullina	51	50	62	0	0	0
25	Corlumina	49,5	49,5	59	0	0	—
26	Papaverina	47	50	30	0	0	0
27	Morfina	58	62,5	100	65	28,5	-13
28	Apomorfina	42	—	—	0	-11	—
29	Eroina	53	60	95	52	28,5	0
30	Sanguinarina	15	13,8	11	0	0	0
31	Chelidonina	49,5	45,5	58	0	0	0
32	Protopina	46	50	77	58,5	39	0

Segue: TABELLA I.

N.	Alcaloidi	Spostamento in mm verso il catalogo nel tempo di 3h					
		pH 2,3	pH 4,3	pH 6,4	pH 8,5	pH 10,5	pH 11,4
33	Coridina	46	46	71	27	14	0
34	Berberina	15	27	20	13	10,5	9
35	Tetraidropalmatina	45	42	41	0	0	0
36	Glaucina	28	27	38	12	3	0
37	Boldina	22	25	30	13	0	-38
38	Dicentrina	15	0	0	0	0	0
39	Bulbocapnina	37	35	33	17	6	-13
40	Dimetilbeberina	66	79	104	94,5	78	53
41	Tubocurarina	70	67	84	58	47	-7
42	Dimetiltubocurarina	68	69,5	99	80	87	49
43	Emetina	75	66	85	58	—	0
44	Cinconina	102	68	80	51	30	0
45	Cinconidina	104	68	93	57	32	0
46	Chinina	102	68	76	46	25	0
47	Armina	41	31	26	0	0	0
48	Ioimbina	45	47	68	—	10	0
49	Aspidospermina	52,4	57	87	0	0	0
50	Sempervirina	8	7	5	0	0	0
51	Ergometrina	35	36	38	15	13	16
52	Stricnina	56	58,5	85	52	0	—
53	Brucina	45	46	69	42	21	—
54	Curarina	106	98	110	108	—	64
55	Mavacurina	31	—	24	30	24	19
56	Fluorocurina	77	—	80	90	80	42
56	C-alcaloide D	65	—	90	90	100	52
58	Calebassina	65	—	80	90	78	50
59	Eserina	61,5	65	105	62	—	9
60	Jervina	41	39	53	0	0	0
61	Protoveratrina	35	35	65	48	—	0
62	Veratrina	40	37	62	38	14	0
63	Solanina	26 5	29	40	40	0	0
64	Caffeina	3	12	23,5	20	23	8
65	Teobromina	4,5	8	21	18	18	-20
66	Teofillina	2,5	10	21	9	-11,5	-55
67	Colchicina	2	8	21	18,5	17	—
68	Pilocarpina	70	85	106	40	19,5	-23

In tal modo si osserva che mentre a pH acido la tubocurarina e la dimetil-tubocurarina non si separano sensibilmente, a pH alcalino si ha addirittura una inversione della direzione di migrazione della tubocurarina rispetto alla dimetiltubocurarina (fig. 1, 2).

Lo stesso avviene con le basi puriniche caffeina, teobromina teofillina (fig. 1, 2) da cui si deduce che la separazione per queste sostanze è possibile a pH 11,4.

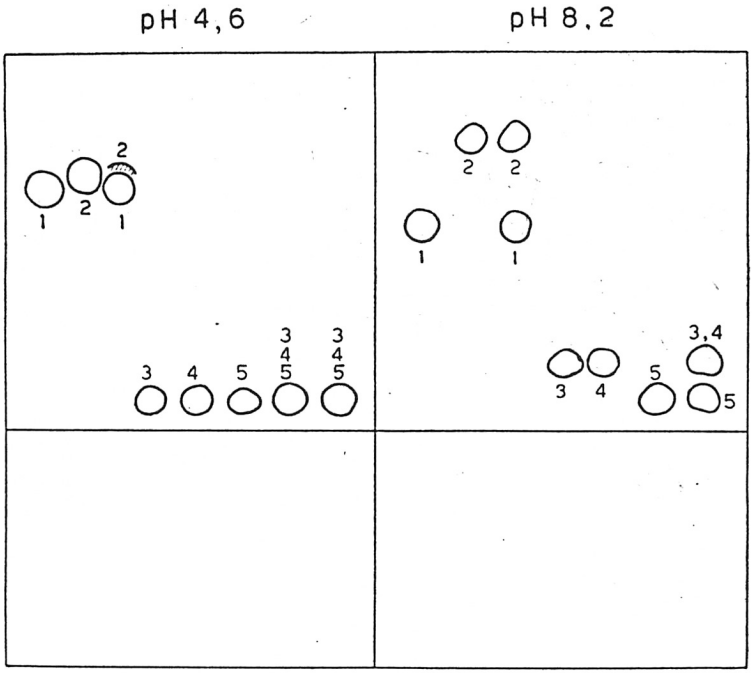

FIG. 1. - Leggenda: 1: Tubocurarina; 2: dimetil-tubocurarina; 3: Caffeina; 4: Teobromina; 5: Teofillina.

Anche nel caso degli alcaloidi del *Chelidonium majus* (berberina, protopina, sanguinarina, chelidonina, sparteina) si può avere a pH 7,3 una ottima separazione che non si verifica a pH inferiori (fig. 2); a pH 6,4 non si ha una risoluzione sufficiente tra chelidonina e protopina.

Nel caso di miscele naturali abbiamo esaminato estratti grezzi di alcaloidi; ad es. nel caso della *Opuntia cilidrica* abbiamo potuto riscontrare una macchia fondamentale dovuta a un alcaloide che in base alle prove di confronto è stato identificato con la mezcalina, mentre le resine e le altre sostanze dell'estratto non interferiscono.

Egualmente esaminando un campione di curaro Macus abbiamo potuto mettere in evidenza, impiegando come elettrolita acido acetico, la presenza di alcaloidi del gruppo della curarina e della calebassina con una esperienza della durata di appena un'ora senza che le resine e gli altri principi del curaro interferiscano sulla separazione e sulle reazioni cromatiche di riconoscimento.

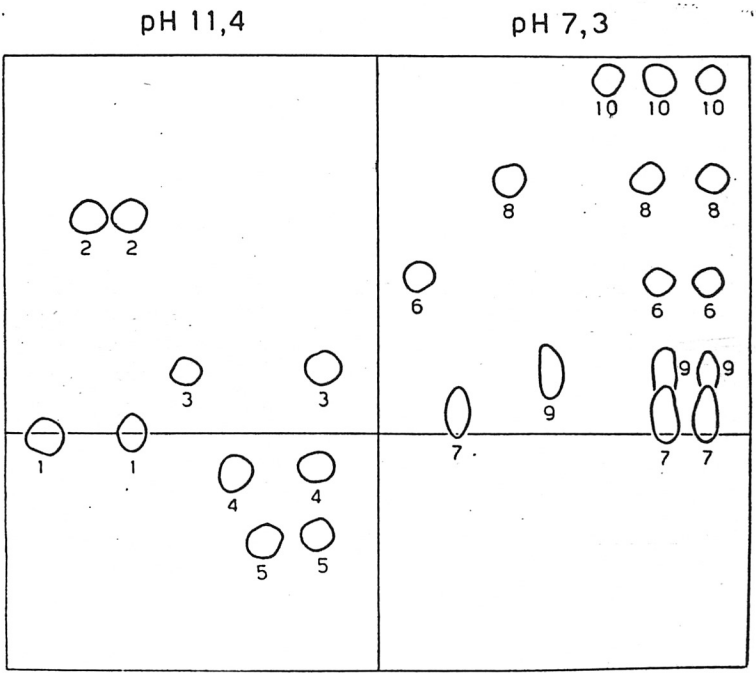

FIG. 2. - Leggenda: 1-5 vedi fig. 1; 6: Chelidonina; 7: Sanguinarina; 8: Protopina; 9: Berberina; 10: Sparteina.

Gli esempi soprariportati insieme ai dati disponibili permettono concludere che la tecnica elettroforetica su carta offre un notevole aiuto nella risoluzione di numerosi problemi analitici nel campo degli alcaloidi naturali.

Con l'aiuto infatti dei dati ora a disposizione, è possibile prevedere il comportamento di una miscela anche complessa e di realizzarne la separazione impiegando il pH o i pH più opportuni.

Per ciò che riguarda i problemi di costituzione e di alcaloidi di struttura non nota il comportamento elettroforetico ai vari pH può consentire di rivelare su quantità limitate di sostanze la presenza di gruppi funzionali caratteristici.

PARTE SPERIMENTALE

Apparecchiatura. — *a*) Per le esperienze preliminari orientative abbiamo impiegato un semplice apparecchio di Durrum disponendo la sostanza sulla striscia con il metodo della banda.

b) Per le misure delle mobilità degli alcaloidi abbiamo invece usato l'apparecchio LKB ([5]) per elettroforesi, che consente con un foglio unico di effettuare l'elettroforesi di 8 sostanze contemporaneamente.

Si impiega come carta la Whatman 1, in quanto questa consente, dato il suo spessore limitato, di lavorare con tensioni di 8 V/cm. Se si ricorre a carte più spesse, ad es. alla Whatman 31 extra spessa si ha un riscaldamento eccessivo e distillazione di acqua.

Tampone. — E' stato impiegato il tampone universale di Britton e Robinson ([6]) a base di acido fosforico, borico, acetico e soda che ci consentiva di andare da un pH 2 a un pH 11,4.

Da pH 2 a pH 4 la forza ionica è di 0,02-0,04 mentre da pH 6,8 a pH 11,4 si è diluito il tampone a 1/4, dato che l'effetto Joule era troppo notevole e la forza ionica dell'elettrolita da noi adoperato è stata di 0,015 per pH 6,4; 0,02 per pH 8,2; 0,03 per pH 10,5 e 0,03 per pH 11,4.

Alcaloidi. — Abbiamo impiegato soluzioni alcoliche di alcaloidi, talvolta cloroformiche o acquose all'1%, in modo da avere circa 10-30 μg di alcaloide.

Rivelazione. — L'elettroferogramma prima di essere rivelato con reattivi chimici viene osservato alla luce U.V. filtrata con filtro Corning Dow 9863. In questo caso gli alcaloidi appaiono o fluorescenti oppure danno un assorbimento; il metodo consente un riconoscimento di 5 γ di sostanza.

Il cromatogramma viene quindi esposto ai vapori di iodio per rivelare rapidamente le sostanze.

Per ulteriore conferma si nebulizza sul cromatogramma:

a) per rivelare gli elettroferogrammi effettuati tra pH 6 e pH 11,4 si nebulizza la carta con una soluzione di acido solforico 2N in modo da acidificarla, quindi una soluzione di reattivo allo iodobismutato di potassio (0,5 g di carbonato basico di bismuto, si discioglie in 1,5 cm^3 di HCl conc., si aggiungono 3 g di KJ e si porta a 10 cm^3 si diluisce a 50 cm^3 prima dell'impiego).

b) per rivelare gli elettroferogrammi effettuati tra pH 2 e 6 si usa una soluzione di iodoplatinato di potassio (1 g di acido cloroplatinico si scioglie in 20 cm^3 di HCl N e 6 cm^3 di acqua formano la sol. A; la sol.

([5]) Science Tools, *1*, 6 (1954).

([6]) Britton, The hydrogen ion - London Chapman & Hall (1932).

B è costituita da KJ al 10%; il reattivo si prepara al momento mescolando una parte in volume di A con nove di B e aggiungendo 20 parti di acqua).

Tecnica. — Si taglia un foglio di carta Whatman 1 delle dimensioni 18 × 46 cm che si bagna nel tampone e si asciuga tra due fogli di carta da filtro asciutta, quindi la si dispone nell'apparecchio di elettroforesi e si fa quindi passare la corrente per un'ora con una tensione di 8 Volts/cm (conviene verificare sulla carta stessa) in modo da equilibrare il sistema.

A questo punto si mette la sostanza sull'asse centrale del foglio mediante una pipetta capillare attraverso dei fori disposti nella lastra di perspex che ricopre il foglio.

L'elettroforesi dura tre ore; dopo interrompe l'operazione ed il foglio si toglie subito e si asciuga con una corrente di aria fredda.

Ringraziamo il Prof. E. Ghirardi Direttore scientifico della SIMES, Milano per averci fornito numerosi campioni di alcaloidi.

Uno di noi (J.A.C.F.) ringrazia la Facultad de Química y Farmacia dell'Università di Montevideo per la borsa di studio che gli ha consentito di compiere queste ricerche.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Chimica terapeutica - 30 luglio 1956.