

PRACOWNIA — POZIOM A: METODY IDENTYFIKACJI ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH

kierownik: dr Jolanta Jaroszevska-Manaj; ZChO; pok.137; jjmanaj@chem.uw.edu.pl

PROGRAM PRACOWNI

Ćwiczenie 1. Reakcje identyfikujące grupy funkcyjne.

Ćwiczenie 2. Identyfikacja nieznanego związku organicznego.

Ćwiczenie 3. Zastosowanie metody chromatografii cienkowarstwowej do identyfikacji składników mieszaniny związków organicznych. Izolacja składników materiału biologicznego

Ćwiczenie 4. Rozdział składników materiału biologicznego metodą chromatografii kolumnowej.

Ćwiczenie 5. Identyfikacja składników materiału biologicznego metodą spektroskopii UV/Vis; porównanie danych doświadczalnych z literaturą.

INFORMACJE O PRACOWNI IZO ORAZ ZASADACH ZALICZENIA

Każda pracownia trwa 4 godz. Ćwiczenie 2 wykonywane jest indywidualnie, pozostałe w grupach dwuosobowych. **Opisy zaliczane na ocenę każdy student opracowuje indywidualnie.** Do zaliczenia należy przedstawić dziennik laboratoryjny z notatkami prowadzonymi w trakcie pracy na pracowni.

Warunkiem zaliczenia PRACOWNI jest:

- wykonanie i zaliczenie zadań laboratoryjnych (20 godz.).
- zaliczenie sprawdzianów wejściowych (część teoretyczna).
- uporządkowanie sprzętu laboratoryjnego oraz rozliczenie finansowe za zniszczony sprzęt

Ocena z PRACOWNI stanowi średnią ocen części laboratoryjnej i teoretycznej.

INFORMACJE O ĆWICZENIACH

Wszystkie ćwiczenia wstępnie omawia asystent, a nowe techniki są przedstawiane w formie pokazu. Ćwiczenia wykonuje się według instrukcji, z którą trzeba się zapoznać przed zajęciami.

Przed przystąpieniem do ćwiczeń należy zaliczyć sprawdzian wejściowy.

INSTRUKCJE, WSKAZÓWKI DO ĆWICZEŃ

JJM

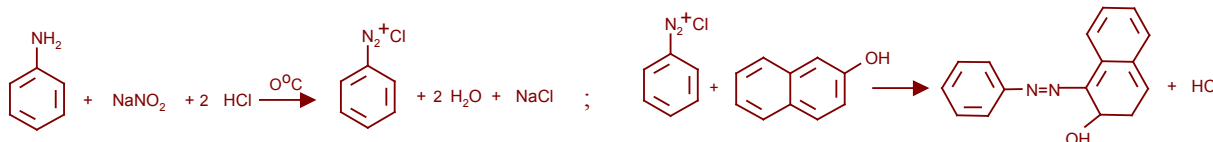
Ćwiczenie 1: Reakcje identyfikujące grupy funkcyjne.

AMINY

Związek	Typ	Reakcje
Anilina, lub p-toluidyna	I rz amina aromatyczna	NaNO ₂ /HCl/0°C- r. z kw. azotowym(III); r. z Br ₂ aq
N,N-dimetyloanilina	III rz amina aromatyczna	
Glicyna lub alkiloamina	I rz amina alifatyczna	NaNO ₂ /HCl/0°C- r. z kw. azotowym(III)
Prolina lub N-metyloanilina	II rz amina	

1) Reakcja z kwasem azotowym(III) (**WYCIĄG!**)

aminy I rz. aromatyczne: powstaje sól diazoniowa, która w reakcji z 2-naftolem daje barwnik azowy



aminy II rzędowe aromatyczne: powstaje N-nitrosoamina (oleista, barwna ciecz lub ciało stałe)

aminy III rzędowe aromatyczne: powstaje C-nitrosoamina w postaci żółtego lub zielonego osadu



aminy I rzędowe alifatyczne: powstająca sól diazoniowa ulega natychmiastowemu rozkładowi – wydziela się gazowy azot.



aminy II rzędowe alifatyczne: powstaje N-nitrosoamina (oleista, barwna ciecz)



aminy III rzędowe alifatyczne: w temperaturze 0°C nie reagują z kwasem azotowym(III).

WYKONANIE:

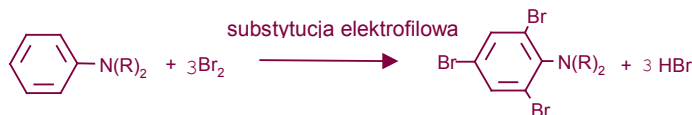
10% r. kwasu solnego; 10% r. azotanu(III) sodu; lód; 2-naftol; 10% r. wodorotlenku sodu

Próbkę badanej aminy ok. 0.2 cm³ lub 0.2g (wielkość połowy ziarnka grochu) rozpuścić w kwasie solnym. Sprawdzić odczyn kwasowy papierkiem wskaźnikowym. Probówkę umieścić w łaźni oziębiającej na ok. 5 min. Nie wyjmując probówki z łaźni dodawać powoli ok. 2 cm³ roztworu azotanu (III) sodu. Zanotować obserwowane zmiany.

- amina alifatyczna I rz. - obserwuje się obficie wydzielający się azot
- amina alifatyczna II rz. - obserwuje się wydzielanie żółtej nierozpuszczalnej cieczy
- amina alifatyczna III rz. – nie obserwuje się zmian (brak reakcji)
- amina aromatyczna II rz. - obserwuje się wydzielanie barwnej nierozpuszczalnej cieczy lub osadu
- amina aromatyczna III rz. - obserwuje się wydzielanie barwnego osadu
- amina aromatyczna I rz. - nie obserwuje się zmian – powstaje rozpuszczalna sól diazoniowa, którą należy zidentyfikować przez dodanie do otrzymanej mieszaniny poreakcyjnej 0.5 - 1 cm³ nasyconego roztworu 2-naftolu w 10%NaOH – powstaje intensywnie zabarwiony osad (najczęściej czerwony).

2) Bromowanie (**WYCIĄG!**)

Aminy aromatyczne łatwo ulegają reakcji bromowania na zimno bez katalizatora.



WYKONANIE:

2% roztw. bromu w CCl₄ lub woda bromowa

Do próbki badanej aminy ok. 0.2 cm³ lub 0.2g (wielkość połowy ziarnka grochu) dodać trzy krople odczynnika. Wstrząsnąć, obserwować odbarwienie roztworu bromu.

ALKOHOLE

tert-butanol	OH w alkoholach	r. z HCl stęż./ZnCl ₂ bzw.(próba Lucasa); r. acylowania; próba jodoformowa
etanol	OH w alkoholach	

1) Rozróżnianie rzędowości alkoholi

Alkohole trzeciorzędowe w obecności bezwodnego chlorku cynku bardzo szybko reagują z kwasem solnym (stężonym) dając chlorki alkilowe (nierozpuszczalne, oleiste ciecze). Alkohole drugorzędowe reagują powoli: po 5-10 min. Pojawia się zmętnienie, a dopiero po dłuższym czasie powstaje warstewka chlorku alkilowego. Alkohole pierwszorzędowe nie reagują.



WYKONANIE:

Odczynnik Lucasa: 15,5g bezwodnego chlorku cynku w 10 cm³ stężonego kwasu solnego.

Do próbki alkoholu III rzędowego ok. 0.5 cm³ dodać ok. 3 cm³ odczynnika. Zakorkować probówkę i mocno skłócić. Pozostawić w spokoju, obserwować czy powstaje warstwa oleista.

2) Próba jodoformowa

Alkohole zawierające grupę hydroksylową przy drugim atomie węgla ulegają reakcji jodoformowej. Alkohole III rz. nie dają tej reakcji.



WYKONANIE:

Odczynnik : 10g jodku potasu i 5g jodu rozpuszcza się w 50 cm³ wody dest.; 5% NaOH

Do próbki alkoholu (etanol) ok. 5 kropli dodać ok. 2cm³ wody i 1-2cm³ 5% NaOH, a następnie kroplami dodawać odczynnik do chwili utrzymania się ciemnej barwy jodu. Jeśli po kilku minutach nie pojawi się osad wstawić probówkę do gorącej wody na kilka minut. Oziębic, obserwować zmiany.

3) Acylowanie (**WYCIĄG!**)

Alkohole w reakcji z chlorkiem acetylu lub benzoilu tworzą estry: osady lub ciecze nie rozpuszczalne w wodzie o miłym zapachu.



WYKONANIE (wykonać jedną z podanych prób):

Odczynniki: chlorek acetylu, nasycony roztw. węglanu sodu, lub chlorek benzoilu, 20% roztw. NaOH

a) Do 0.5cm³ badanej substancji (etanol) dodać ok. 0.5cm³ chlorku acetylu. Obserwować efekt cieplny oraz wydzielanie się chlorowodoru. Wylać zawartość probówki do nasyconego roztworu węglanu sodu. Obserwować warstwę oleistą, zbadać zapach.

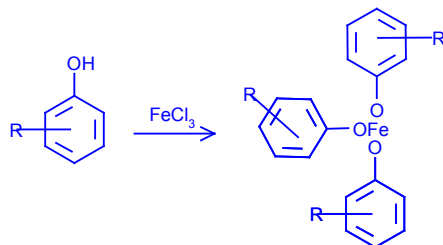
b) Do małej kolbki wlać 0.5cm³ badanej substancji, 1cm³ wody dodać ok. 0.2cm³ chlorku benzoilu. Dodawać porcjami, wstrząsając ok. 1cm³ 20% wodorotlenku sodu (do uzyskania odczynu zasadowego. Obserwować powstawanie osadu lub oleju.

FENOLE

Rezorcyna, fenol lub 2-naftol	OH przy pierścieniu aromatycznym	r. z FeCl_3 ; r. z Br_2 ; r. acylowania z $\text{RC}(=\text{O})\text{Cl}$
-------------------------------------	-------------------------------------	---

1) Reakcja z solami żelaza (III)

Fenole z solami żelaza (III) dają barwne kompleksy (fioletowe, granatowe, purpurowe, zielone – barwa zależy od podstawników w pierścieniu aromatycznym)



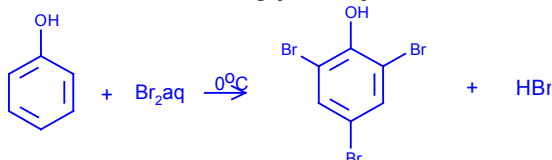
WYKONANIE:

2% roztw. chlorku żelaza(III), etanol

Próbkę badanego fenolu ok. 0.2 cm^3 lub 0.2g (wielkość połowy ziarnka grochu) rozpuścić w wodzie lub etanolu następnie dodać parę kropli odczynnika. Obserwować zabarwienie roztworu.

2) Bromowanie (**WYCIĄG!**)

Fenole bardzo łatwo ulegają reakcji bromowania na zimno bez katalizatora.



WYKONANIE:

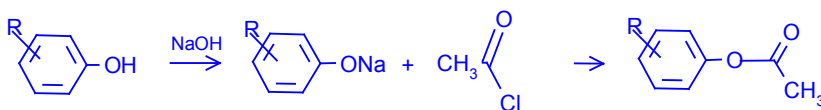
2% roztw. bromu w CCl_4 lub woda bromowa

Do próbki fenolu ok. 0.2 cm^3 lub 0.2g (wielkość połowy ziarnka grochu) dodać 5 cm^3 wody lub 10% HCl a następnie wkraplać odczynnik. Wstrząsać, obserwować odbarwienie roztworu bromu.

Dodanie większej ilości odczynnika pozwala na otrzymanie osadu tribromopochodnej fenolu.

3) Acylowanie (**WYCIĄG!**)

Fenolany łatwo ulegają reakcji acylowania z bezwodnikiem octowym, chlorem acetylu lub benzoilu dając w wyniku odpowiednie estry (octany lub benzoesany).



WYKONANIE:

20% roztw. NaOH, bezwodnik octowy lub chlorek acetylu, lód

Próbkę fenolu ok. 0.2 cm^3 lub 0.2g (wielkość połowy ziarnka grochu) rozpuścić w 1-2 cm^3 roztworu wodorotlenku sodu następnie dodać drobno pokruszony lód i ok. 1 cm^3 bezwodnika octowego* lub chlorku acetylu. Wstrząsać parę minut. Obserwować powstający osad lub olej tworzącego się estru.

* reakcja przebiega łagodniej.

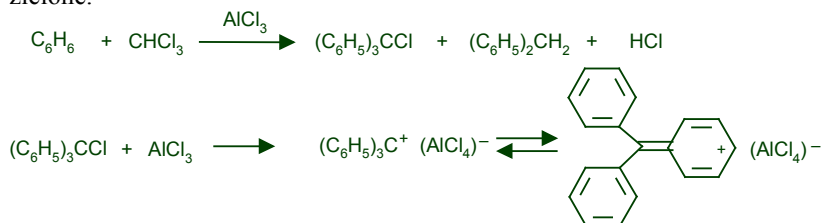
Podobnie postępuje się przy zastosowaniu chlorku benzoilu.

WĘGLOWODORY

Toluen, naftalen antracen	węglowodór aromatyczny	r. z AlCl_3 bzw. $+\text{CHCl}_3$; rozpuszczalność w H_2SO_4 stęż.
---------------------------------	------------------------	--

1) Reakcja z AlCl_3 i chloroformem

Związki aromatyczne reagują z chloroformem w obecności bezwodnego AlCl_3 dając barwne kompleksy. Pochodne benzenu są żółte lub pomarańczowe, pochodne naftalenu - fioletowe, niebieskie lub zielone, pochodne antracenu - zielone.



WYKONANIE :

Odczynniki: bezwodny chlorek glinu, chloroform

Do 5 kropli badanej substancji (ok. 0.1g) dodać ok. 1 cm³ chloroformu. Otrzymany roztwór nanieść na kryształek bezwodnego chlorku glinu na płytce do analizy kroplowej. Obserwować zmiany.

2) Działanie kwasem siarkowym

A) Węglowodory aromatyczne nie rozpuszczają się na zimno w kwasie siarkowym.

B) Alkeny, alkany

cykloheksen	alken	reakcja z Br_2aq ; reakcja z KMnO_4
heksan	węglowodór alifatyczny	rozpuszczalność w H_2SO_4 stęż.; zabarwienie roztw. jodu

1) Reakcja z bromem (**WYCIĄG!**)

Węglowodory nienasycone ulegają reakcji addycji. Następuje odbarwienie wody bromowej



WYKONANIE :

Odczynniki: woda bromowa

1 cm³ badanej substancji dodać ok. 0.5 cm³ odczynnika. Wstrząsnąć obserwować zmiany.

2) Reakcja z manganianem(VII) potasu

Węglowodory nienasycone ulegają reakcji addycji. Następuje natychmiastowe odbarwienie roztworu manganianu(VII) potasu.



WYKONANIE :

Odczynnik: 0.5% roztwór manganianu (VII) potasu w wodzie destylowanej.

Do 0.5 cm³ badanej substancji dodać ok. 2 cm³ acetonu, a następnie dodawać odczynnik po kropli. Wstrząsnąć obserwować zmiany. Jeśli po 3-4 kroplach zabarwienie znika związek zawiera układ nienasycony.

3) Działanie stężonym kwasem siarkowym

Ww. nasycone nie rozpuszczają się na zimno w stężonym kwasie siarkowym. Ww. nienasycone rozpuszczają się powoli: roztwór ogrzewa się, ciemnieje, następuje zwęglenie, wydzielają się SO_2 .

4) Rozpuszczanie jodu

Jod rozpuszczony w węglowodorach daje zabarwienie różowofioletowe.

ETERY

eter etylowy	eter	rozpuszczalność w H ₂ SO ₄ stęż.; zabarwienie roztworu jodu
--------------	------	---

1) Działanie stężonym kwasem siarkowym

Eter etylowy rozpuszcza się na zimno w stężonym kwasie siarkowym.

2) Rozpuszczanie jodu

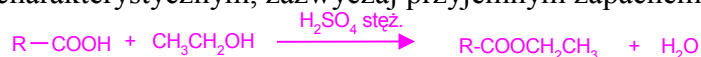
Jod rozpuszczony w eterze etylowym (czy innych rozpuszczalnikach zawierających tlen) daje zabarwienie żółtobrazowe.

KWASY

kwas benzoesowy	grupa karboksylowa	reakcja estryfikacji
-----------------	--------------------	----------------------

1) Reakcja estryfikacji

Kwasy karboksylowe w reakcji z alkoholami dają estry – związki nierozpuszczalne w wodzie odznaczające się charakterystycznym, zazwyczaj przyjemnym zapachem.



WYKONANIE :

Odczynniki: metanol kwas siarkowy stęż., nasycony roztwór węglanu sodu

0.5g kwasu (ilość odp. 1-2 ziarnkom grochu) dodać ok. 1cm³ alkoholu i 2 krople H₂SO₄ stęż. Ogrzewać do wrzenia przez ok. 10 min. Ochłodzić wylać ostrożnie na 5 cm³ nasyconego roztworu węglanu sodu.

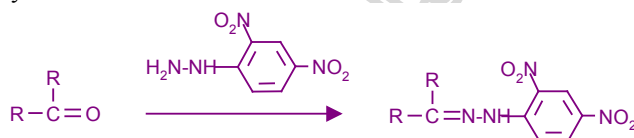
Obserwować powstawanie warstwy estru. Badać zapach.

ZWIĄZKI KARBONYLOWE

aceton	gr.karbonylowa-keton	r. z 2,4-dinitrofenylohydrazyną; r. haloformowa
--------	----------------------	---

1) Reakcja z 2,4-dinitrofenylohydrazyną

Związki zawierające grupę karbonylową (**aldehydy i ketony**) w reakcji z 2,4-dinitrofenylohydrazyną dają krystaliczne osady dinitrofenylohydrazonów.



WYKONANIE:

Odczynnik : 2g 2,4-dinitrofenylohydrazyny rozpuścić w 15cm³ stężonego kwasu siarkowego. Roztwór ten dodawać do 150cm³ etanolu ciągle mieszając i ziębiąc. Całość rozcieńczyć 500cm³ wody destylowanej. W razie potrzeby przesączyć.

Do próbki ok. 2-3 kropli dodać ok. 3cm³ klarownego odczynnika, mocno wstrząsnąć, pozostawić na kilka, kilkanaście minut. Obserwować pojawianie się osadu.

2) Próba jodoformowa

Ketony zawierające grupę karbonylową przy drugim atomie węgla oraz aldehyd octowy ulegają reakcji jodoformowej. (patrz alkohole).



WYKONANIE:

Odczynnik : 10g jodku potasu i 5g jodu rozpuszcza się w 50 cm³ wody dest.; 5% NaOH

Do próbki ketonu ok. 5 kropli dodać ok. 2cm³ wody i 1-2cm³ 5% NaOH, a następnie kroplami dodawać odczynnik do chwili utrzymania się ciemnej barwy jodu. Jeśli po kilku minutach nie pojawi się osad wstawić probówkę do gorącej wody na kilka minut. Oziębnić, obserwować zmiany.

ALDEHYDY

glukoza aldehid octowy	gr.karbonylowa -aldehyd	próba lustra srebrowego (próba Tollensa), lub próba Fehlinga ($\text{CuO} \rightarrow \text{Cu}_2\text{O}$)
---------------------------	-------------------------	--

Wykonać jedną z podanych prób 1) lub 2).

1) Próba Tollensa

Próba Tollensa jest ogólną reakcją na aldehydy. Ulegają jej również cukry.



WYKONANIE:

Odczynniki : 1% r. wodny azotanu srebra, 5% r. NaOH, woda amoniakalna

Do starannie oczyszczonej probówki dodać 0.5 cm³ 1% roztworu wodnego azotanu srebra, 0.5 cm³ roztworu 5% NaOH oraz kroplami wodę amoniakalną do chwili rozpuszczenia utworzonego osadu. Następnie dodać parę kropli aldehydu. Wstrząsnąć, ogrzać w ciepłej łaźni wodnej. Obserwować tworzenie lustra lub osad srebra.

2) Próba Fehlinga

Próba Fehlinga jest modyfikacją próby Trommera; tu wodorotlenek miedzi (II) zastosowany jako kompleks z winianem jest lepiej rozpuszczalny i reakcja przebiega łatwiej. Reakcji tej ulegają zazwyczaj aldehydy alifatyczne i cukry redukujące (sacharoza nie daje tej próby).

W wyniku reakcji redoks powstaje ceglasty osad tlenku miedzi (I). [Formaldehyd jako silny reduktor powoduje wytrącenie miedzi metalicznej].



WYKONANIE:

Odczynniki : **I** – wodny roztwór siarczanu(VI) miedzi (II),

II - alkaliczny roztwór winianu sodowo-potasowego.

Do probówki zawierającej dwie krople lub ok. 0.1g badanej substancji dodać mieszaninę odczynników **I** i **II** (po 1 cm³) ; ogrzewać ok. pięć minut na łaźni wodnej. Dodatni wynik: obserwuje się wydzielanie ceglatego osadu.

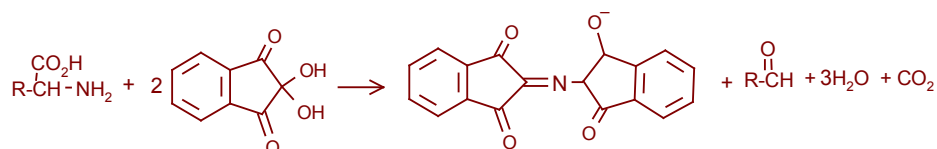
(Odczynnik Trommera: CuSO_4 + wodorotlenek sodu; odczynnik Benedicta: CuSO_4 + mieszanina cytrynianu sodu i węglanu sodu).

AMINOKWASY

Glicyna lub prolina	aminokwas	próba ninhydrynowa
---------------------	-----------	--------------------

1) Próba ninhydrynowa

Związki z I rzędową grupą aminową dają z ninhydryną błękitne (lub purpurowe) zabarwienie roztworu.



WYKONANIE:

Do szczypty aminokwasu rozpuszczonego w 0.5 cm³ wody destylowanej dodać 3 krople 0.5% wodnego roztworu ninhydryny. W razie potrzeby ogrzać. Obserwować zabarwienie.

Aminokwasy z II rz. grupą aminową dają żółte zabarwienie.

Aminokwasy z grupą NH_2 , podobnie jak aminy I rzędowe ulegają reakcji z kwasem azotowym (III).

Ćwiczenie 2.

Identyfikacja nieznanego związku organicznego:

- pomiar stałych fizykochemicznych (np. temp. wrzenia lub topnienia)
- oznaczenie grupy rozpuszczalności
- ustalenie rodzaju grupy funkcyjnej na podstawie charakterystycznych reakcji
- wykonanie pochodnej krystalicznej i oznaczenie stałych fizykochemicznych (jeśli okaże się niezbędne)
- porównanie otrzymanych wyników z danymi literaturowymi.

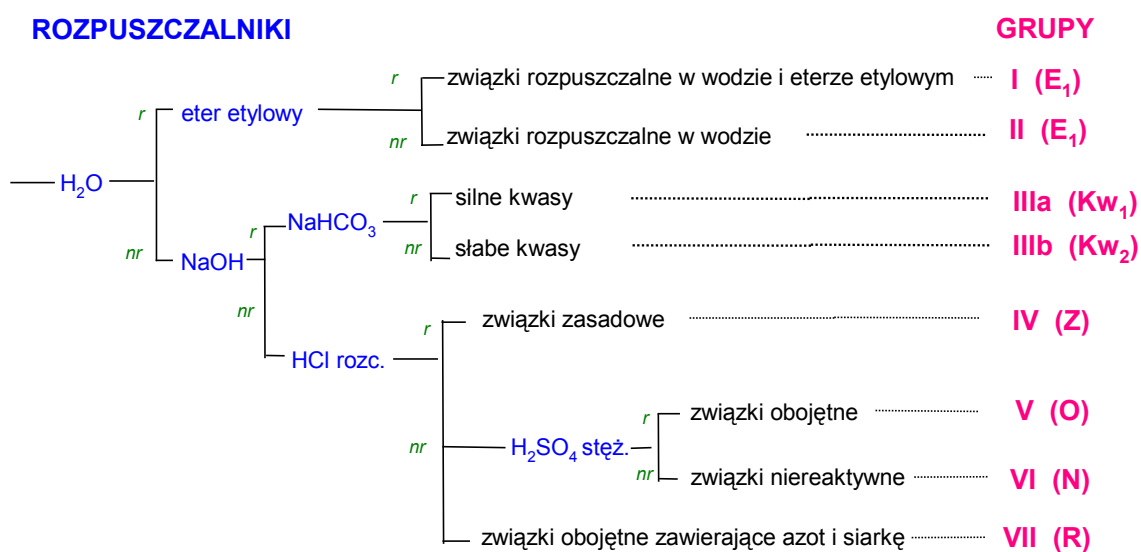
Literatura - [1] - [7]

Ad b)

Na podstawie oznaczenia rozpuszczalności w odpowiednio dobranych rozpuszczalnikach badany związek jest zaklasyfikowany do grupy rozpuszczalności oznaczanej w literaturze rzymskimi cyframi lub symbolami literowymi:

GRUPA		ROZPUSZCZALNOŚĆ	CHARAKTER
I (E₁)		Woda, eter etylowy	związki o małej cząsteczce - obojętne, kwasowe, zasadowe (alkohole, aldehydy, ketony, kwasy, estry (do 4 atomów węgla) aminy (do 6 atomów węgla))
II (E₂)		tylko woda	związki polarne, np. sole, aminokwasy, związki wielowodorotlenowe, wielokarboksylowe
IIIa (Kw₁)		NaOH i NaHCO ₃	związki kwasowe
IIIb (Kw₂)		tylko NaOH	związki słabo kwasowe
IV (Z)		HCl	związki zasadowe
V (O)	Nie zawierają azotu, siarki	H ₂ SO ₄ stęż.	związki obojętne: aldehydy, ketony estry bezwodniki, chlorki kwasowe, alkohole, etery węglowodory nienasycone węglowodory aromatyczne
VI (N)	Nie zawierają azotu, siarki	nierozpuszczalne	związki niereaktywne węglowodory, chlorowcopochodne
VII (R)	Zawierają azot, siarkę	nierozpuszczalne	różne typy związków zawierających azot, siarkę

SCHEMAT. Oznaczanie grupy rozpuszczalności.



Ćwiczenie 3.

Zastosowanie metody chromatografii cienkowarstwowej do identyfikacji składników mieszaniny związków organicznych. Izolacja składników materiału biologicznego.

CHROMATOGRAFIA (podstawy)

Metody chromatograficzne znajdują głównie zastosowanie do identyfikacji i oznaczania substancji. Stosuje się je również do otrzymywania czystych związków chemicznych, co jest nieodzowne przy określaniu struktury. Zarówno związki naturalne jak i otrzymywane syntetycznie są zwykle zanieczyszczone domieszkami substancji o zbliżonych właściwościach. W takich przypadkach, spośród różnych sposobów oczyszczania (krystalizacja, destylacja, ekstrakcja) metody chromatograficzne są najskuteczniejsze.

Każdy układ chromatograficzny składa się z trzech zasadniczych elementów: **fazy nieruchomej** (stacjonarnej), fazy **ruchomej** i substancji **rozdzielanej**. Fazę stacjonarną może stanowić substancja porowata - adsorbent (żel krzemionkowy, tlenek glinowy, celuloza itp.), może to być woda lub rozpuszczalnik organiczny naniesiony na nośnik nieaktywny. Fazę ruchomą stanowi rozpuszczalnik lub układ rozpuszczalników, poruszający się względem fazy stacjonarnej działaniem sił kapilarnych lub na skutek swobodnego przepływu.

Mieszanina rozdzielana rozpuszcza się w fazie ruchomej i wędruje wraz z nią. Ruch ten może być spowalniany lub zatrzymany przez fazę stacjonarną na skutek adsorpcji, chemisorpcji lub w wyniku konkurencyjnego rozpuszczania substancji badanej w rozpuszczalniku fazy stacjonarnej. W zależności od charakteru zjawisk rozróżnia się chromatografię adsorpcyjną, podziałową (rozdzielczą), jonowymienną itd.

Chromatografia adsorpcyjna

Zjawisko adsorpcji polega na zatrzymywaniu substancji przez porowatą powierzchnię ciała stałego. Częsteczki badanego związku przyczepiają się w aktywnych miejscach adsorbenta, czyli podlegają działaniu sił adsorpcji, ale jednocześnie przejawiają dążność do przechodzenia do roztworu (desorpcja). W wyniku tych przeciwstawnych tendencji ustala się równowaga dynamiczna pomiędzy ilością cząsteczek zaadsorbowanych i ilością cząsteczek powracających do roztworu. Gdy substancja jest całkowicie adsorbowana, plama na chromatogramie w ogóle nie ulegnie przesunięciu. Natomiast, gdy substancja nie adsorbuje się wcale, plamka badanej substancji wędruje z czołem rozpuszczalnika stanowiącego fazę ruchomą.

Najważniejszym czynnikiem decydującym o rozdziale mieszaniny metodą chromatografii adsorpcyjnej jest selektywność adsorpcji jej składników w stosowanym układzie.

Wpływ adsorbenta. O właściwościach adsorbenta decyduje jego charakter chemiczny, struktura krystalograficzna, ilość wody hydratacyjnej, a także zanieczyszczenia. Aktywność adsorpcyjna niektórych, częściej stosowanych adsorbentów wzrasta w następującej kolejności: celuloza, żel krzemionkowy, tlenek glinu

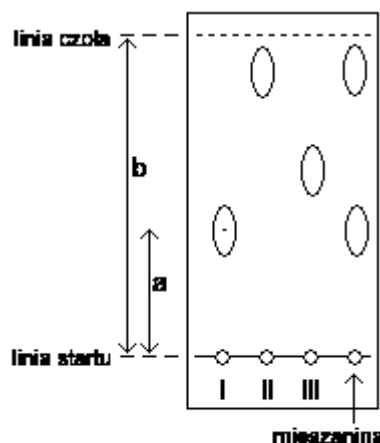
Wpływ rozpuszczalnika. W układach adsorpcyjnych ciało stałe - ciecz, rozpuszczalnik nie zachowuje się całkowicie biernie wobec substancji rozpuszczonej i adsorbenta. W wielu przypadkach poprzez solwatację zmienia się powinowactwo substancji badanej do adsorbenta. Równocześnie rozpuszczalnik może zmieniać aktywność adsorbenta. W doborze odpowiedniego rozpuszczalnika przydaje się szereg eluotropowy wskazujący wzrastającą siłę wymywania: heksan < toluen < chloroform < eter etylowy < aceton < alkohole < woda < zasady, kwasy organiczne. Polepszenie rozdziału uzyskuje się przez stosowanie mieszanin rozpuszczalników o różnej polarności.

Chromatografia cienkowarstwowa

Zaletą chromatografii cienkowarstwowej jest jej duża czułość umożliwiającą wykrywanie śladowych ilości składników badanej mieszaniny oraz duża szybkość rozwijania chromatogramów.

Położenie plam poszczególnych składników określa się za pomocą **współczynnika R_f** :

$$R_f = \frac{\text{odległość środka plamy od linii startu}}{\text{odległość czoła rozpuszczalnika od linii startu}}$$



Przykładowo: $R_{fI} = \frac{a}{b}$

Powtarzalność wartości R_f zależy od warunków, w jakich przeprowadza się chromatografię. Ważnym czynnikiem, który ma wpływ na prawidłowe rozwijanie chromatogramu i na wartość R_f jest nasycenie komory parami rozpuszczalnika rozwijającego. Uzyskuje się to przez kondycjonowanie komory wyłożonej bibułą przez okres od 15 min. nawet do 2 godz.

Nie jest wskazane stosowanie świeżo sporządzonych roztworów mieszanin rozpuszczalników - trzeba odczekać (15-60 min) aż ustali się równowaga. Jednak nie należy przygotowywać roztworów na zapas, bowiem mogą nastąpić zmiany składu w czasie przechowywania (reakcje między składnikami, zmiany pod wpływem światła, odparowywanie składników lotniejszych itp.). Zazwyczaj po 3-4 dniach należy przygotować nowe roztwory.

Duży wpływ na rozdział chromatograficzny ma temperatura. Zmiany temperatury powodują zmiany składu fazy ruchomej, a także wpływają na rozpuszczalność substancji badanej.

Dla identyfikacji związku, jeśli to możliwe, najlepiej równocześnie chromatografować obok siebie próbkę badaną, wzorcową i ich mieszaninę.

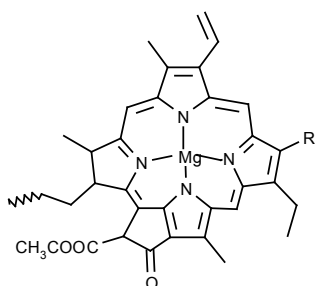
Płytki chromatograficzne. Obecnie używa się płytek handlowych z odpowiednim adsorbentem. Płytki na folii są łatwe w użyciu. Można je przyciąć nożyczkami do odpowiedniej wielkości.

Nanoszenie roztworów substancji badanej. Roztwory nanosi się w postaci plamek lub pasm na linię startu w odległości 0.5 - 1 cm od krawędzi płytki. Do nanoszenia stosuje się mikropipety lub kapilary. Pożądane jest by powstała plamka była jak najmniejsza. Przy małym stężeniu roztwór nakrapla się kilkakrotnie w tym samym miejscu.

Komory chromatograficzne. Są to pojemniki szklane z dopasowaną pokrywą. Bardzo wygodne w stosowaniu są zwykłe słoiki. Na dno nalewa się roztwór rozwijający. Wewnętrzne ścianki wykłada się bibułą, która wchłania roztwór rozwijający, co ułatwia wysycenie komory parami rozpuszczalników.

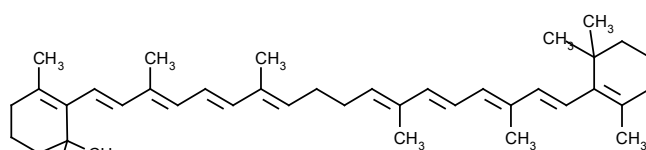
Izolacja składników materiału biologicznego. Barwniki liści.

Podstawowym barwnikiem chloroplastów (liści) jest chlorofil - zielony barwnik istotny w procesie fotosyntezy. Obok niego występują m.in. barwniki z grupy karotenoidów, z których podstawowymi są karoteny i ksantofile.

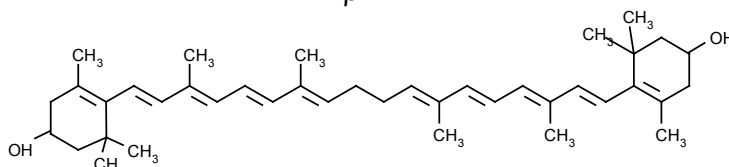


chlorofil a R = CH₃

chlorofil b R = CHO



β-karoten



ksantofil

Celem ćwiczenia jest wydzielenie barwników z liści metodą ekstrakcji i ich analiza za pomocą chromatografii.

WYKONANIE

Odczynniki

aceton

heksan

eter etylowy

Na₂SO₄ bezwodny

Aparatura, materiały

moździerz porcelanowy, nóż, nożyczki, bibuła

rozdzielacz, zlewki lub erlenmajerki, lejek szklany,

płytki chromatograficzne (silikażel),

komora chromatograficzna,

EKSTRAKCJA BARWNIKÓW Z LIŚCI

Około 5 g świeżych lub mrożonych, zielonych liści (z dowolnej rośliny) pokroić i ucierać w moździerzu porcelanowym z małą ilością (ok. 10 cm³) acetonu. Acetonową zawiesinę przesączyć. Materiał roślinny jeszcze dwukrotnie ucierać z acetonem, sączyć. Połączone ekstrakty acetonowe umieścić w rozdzielaczu, ekstrahować kilkakrotnie heksanem do momentu, aż wszystkie barwniki przejdą do warstwy heksanowej (warstwa acetonowa powinna się odbarwić). Oddzielone frakcje heksanowe przenieść do rozdzielacza następnie przemyć trzykrotnie małymi porcjami wody. Oddzielić warstwę organiczną i wysuszyć ją za pomocą bezwodnego Na₂SO₄. Osuszony roztwór barwników zagęścić odparowując rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem.

CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA (TLC)

Zagęszczony heksanowy ekstrakt barwników nanieść kapilarą na płytkę chromatograficzną. Czynność powtarzać (po wysuszeniu poprzedniej porcji) dopóty, aż plamki będą intensywnie barwne. Resztę roztworu pozostawić do wykonania ćwiczenia 4. Płytkę wstawić do komory z roztworem rozwijającym (heksan : aceton 7:3). Rozwijać do momentu, aż czoło rozpuszczalnika znajdzie się w odległości ok. 0.5 cm od górnej krawędzi płytki. Płytkę wyjąć z komory, zaznaczyć czoło rozpuszczalnika i wysuszyć w temperaturze pokojowej. Obliczyć wartość R_f dla poszczególnych barwnych plam. Przy identyfikacji barwników posługujemy się następującymi wskazówkami z szeregu wartości R_f:

karoteny > chlorofil a > chlorofil b > ksantofile

Wykonać szkic chromatogramu TLC notując przy każdej plamie jej barwę, obliczony R_f oraz nazwę zidentyfikowanego związku.

Przykładowe wartości R_f barwników:

Układ rozwijający heksan : aceton (7:3) adsorbent: silikażel.

Pigment	kolor	Wartość R_f
karoten	żółto-pomarańczowy	0.91
feofityna	szary	0.75
chlorofil a	niebiesko-zielony	0.63
chlorofil b	zielony	0.58
ksantofile	żółty	0.53
	żółty	0.47
	żółty	0.32

Ćwiczenie 4.

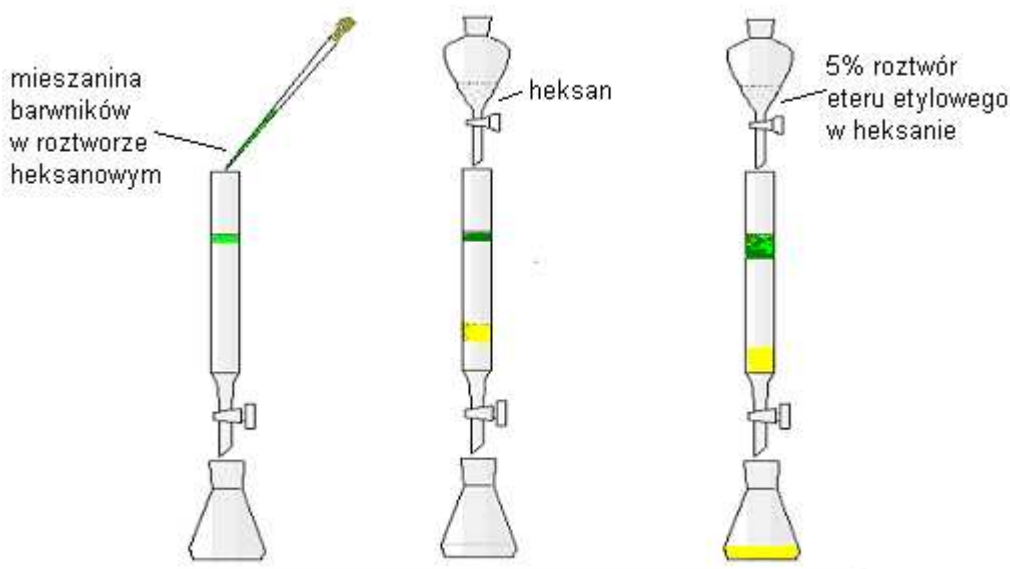
Rozdział składników materiału biologicznego metodą chromatografii kolumnowej.

ADSORPCYJNA CHROMATOGRAFIA KOLUMNOWA

Heksanowy roztwór barwników

kolumna chromatograficzna, wypełnienie (silikażel), pipety, kapilary,

Żel krzemionkowy wsypać do zlewki, dodać heksan i wymieszać. Tak przygotowaną zawiesinę napełnić kolumnę chromatograficzną, zabezpieczoną od strony kranu zwitkiem waty. Przy pomocy pipetki nanieść na kolumnę heksanowy roztwór barwników (ćwiczenie 3). Po wsiąknięciu roztworu opłukać ścianki kolumny heksanem. Karoteny eluować heksanem lub 5% v/v roztworem eteru w heksanie. Zbierać jedynie frakcję o największym natężeniu barwy.



Zastosowanie roztworu eteru etylowego o większym stężeniu pozwala wydzielić pozostałe barwniki.

Otrzymana frakcja posłuży do wykonania ćwiczenia 6.

Literatura - [17] - [20]

PRZYGOTOWANIE OPISU ĆWICZEŃ

Ćwiczenie 1.

Opis identyfikacji każdej analizowanej grupy funkcyjnej musi zawierać: cel, sposób wykonania i schematy reakcji, obserwacje i wyniki oraz wnioski.

Ćwiczenie 2

Cel : Identyfikacja związku organicznego

Tok analizy, obserwacje:

1. Wygląd substancji.....

2. Temp. topnienia lub wrzenia..... °C

3. Skład pierwiastkowy: C, H,.....

4. Grupa rozpuszczalności:

H₂O:.....; Eter:.....; NaOH:.....; NaHCO₃:.....; HCl:.....; H₂SO₄ stęż.:.....; H₃PO₄ stęż.:

Wniosek :

5. Reakcje charakterystyczne (opis wykonanych prób, równania reakcji prób dodatnich):

Klasy związków odpowiadające przedstawianej charakterystyce:

6. Wybór i wykonanie pochodnych krystalicznych - równania reakcji:

Temp. topnienia pochodnej:..... °C

7. Dane literaturowe. Nazwa i wzór zidentyfikowanej substancji.

Ćwiczenie 3, 4.

Opracowanie ćwiczenia musi zawierać: cel, opis metodyki (informacje literaturowe), stosowane warunki wydziałania barwników z materiału biologicznego, warunki analizy TLC, warunki rozdziału i przebieg chromatografii kolumnowej, obserwacje i wyniki, porównanie wyników z literaturą, wnioski.

W dyskusji wyników uzasadnić ewentualne występowanie innego składnika, nie wymienionego w instrukcji lub brak jakiegoś z czterech wymienionych barwników roślinnych w produktach rozdziału chromatograficznego.

Ćwiczenie 5.

Opracowanie ćwiczenia musi zawierać: cel, opis metodyki (informacje literaturowe), obserwacje i wyniki, porównanie wyników z literaturą, wnioski.

W dyskusji wyników zidentyfikować maksima absorpcji badanych barwników; uzasadnić różnice między otrzymanymi widmami oraz widmami barwników roślinnych pokazanymi w literaturze.

WYMAGANIA DO SPRAWDZIANÓW WEJŚCIOWYCH

Sprawdzian 1

Reakcje charakterystyczne związków organicznych.

1. Kwasy - wykrywanie charakteru kwasowego, tworzenie estrów.
2. Fenole - próba z FeCl_3 , próba z Br_2 , tworzenie barwników azowych.
3. Enole - próba z FeCl_3 .
4. Nitrozwiązki alifatyczne i aromatyczne - kwasowość a rzędowość, reakcja z kwasem azotowym(III), redukcja.
5. Aminy - wykrywanie charakteru zasadowego, rozróżnianie rzędowości (reakcja z HNO_2 , metoda Hinsberga), acylowanie, rozróżnianie amin alifatycznych i aromatycznych, tworzenie soli, odzyskiwanie amin z soli.
6. Pochodne hydrazyny.
7. Aldehydy i ketony - rozróżnianie związków karbonylowych (próba Tollensa, Fehlinga), próba jodoformowa, reakcje z hydroksyloaminą, hydrazyną i jej pochodnymi.
8. Estry - tworzenie kwasów hydroksamowych, hydroliza (identyfikacja produktów)
9. Alkohole - reakcja z sodem, rozróżnianie rzędowości (próba Lukasa), acylowanie, próba jodoformowa.
10. Etery - Próba z jodem, rozszczepianie kwasem jodowodorowym.
11. Bezwodniki, halogenki kwasowe - reakcje z alkoholami i aminami, hydroliza, ruchliwość chlorowca w halogenkach acylowych.
12. Amidy - hydroliza, wyodrębnianie i identyfikacja produktów.
13. Nitryle - hydroliza.
14. Chlorowcopolchodne - rozróżnianie typu chlorowa (reakcje z AgNO_3 , NaI).
15. Węglowodory - wykrywanie układu aromatycznego oraz wiązań wielokrotnych.
16. Aminokwasy i peptydy - charakter amfoteryczny aminokwasów, identyfikacja grupy aminowej i kwasowej. Wykrywanie wiązania peptydowego.
17. Węglowodany - rozpuszczalność, próba ogólna wykrywania cukrów, próby na cukry redukujące.

Sprawdzian 2

IDENTYFIKACJA ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH METODAMI KLASYCZNYMI

Tok postępowania w trakcie jakościowej analizy organicznej:

1. Kryteria czystości związku organicznego. Oczyszczanie próbki.
2. Stałe fizyczne związków organicznych.
3. Jakościowe oznaczanie pierwiastków (N, S, Cl, Br, J). Stapianie z sodem.
4. Podział związków organicznych na grupy rozpuszczalności.

Krystaliczne pochodne służące do identyfikacji związków organicznych:

1. Wymagania stawiane zadowalającej pochodnej krystalicznej.
2. Znajomość reakcji otrzymywania podstawowych pochodnych krystalicznych związków organicznych (węglowodorów i ich nitro i chlorowcopolchodnych, kwasów karboksylowych i ich pochodnych, fenoli, amin o różnej rzędowości, alkoholi, aldehydów, ketonów, aminokwasów, węglowodanów).

Sprawdzian 3

KLASYCZNE METODY ROZDZIELANIA MIESZANIN ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH

1. Krystalizacja - rozpuszczalność związków organicznych, stosowane rozpuszczalniki oraz ich dobór w zależności od natury oczyszczanego związku i zanieczyszczeń.
2. Ekstrakcja
 - a) podstawy ekstrakcji (współczynnik podziału), sposób wykonania, zasady ekstrakcji przeciuprądowej
 - b) ekstrakcja czynnymi chemicznie rozpuszczalnikami (wykorzystanie reaktywności grupowej, np. rozdział związków obojętnych kwaśnych słabo zasadowych itp.).
3. Destylacja prosta i frakcyjna - efektywność rozdziału w zależności od różnic w wartościach temperatur wrzenia. Mieszaniny azeotropowe.
4. Destylacja z parą wodną - zasady tej metody, możliwości zastosowania.

CHROMATOGRAFICZNE METODY ROZDZIELANIA MIESZANIN ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH. IDENTYFIKACJA ZWIĄZKÓW METODĄ CHROMATOGRAFII

1. Chromatografia - podstawy fizykochemiczne:
 - a) ogólne podstawy fizyczne chromatografii adsorpcyjnej, podziałowej, jonowymiennej;
 - b) podstawy fizyczne chromatografii adsorpcyjnej, stosowane adsorbenty i ich aktywność; szereg eluotropowy rozpuszczalników
 - c) podstawy fizyczne chromatografii podziałowej, faza ruchoma i stacjonarna, rodzaje wypełnień, chromatografia w odwróconych fazach.
2. Techniki chromatograficzne:
 - a) chromatografia cienkowarstwowa - stosowane adsorbenty, dobór rozpuszczalników rozwijających, wizualizacja plam (odczynniki wywołujące), wartości R_f i ich odtwarzalność, chromatografia cienkowarstwowa preparatywna
 - c) chromatografia bibułowa - technika wstępująca i spływowa, wywoływanie plam, wartości R_f i ich odtwarzalność
3. Dobór rodzaju chromatografii do oznaczenia określonego związku organicznego.

Sprawdzian 4

CHROMATOGRAFIA KOLUMNOWA

- a) Chromatografia kolumnowa - wybór wypełnienia i eluentów w zależności od składu mieszaniny rozdzielanej, sposób postępowania w przypadku nieznanego składu, ilość nakładanej substancji w zależności od ilości wypełnienia, kontrola rozdziału
 - b) Chromatografia gazowa - faza stacjonarna i faza ruchoma, czasy retencji i ich odtwarzalność, identyfikacja pasm, zastosowanie w celach preparatywnych
 - e) wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa - rodzaje wypełnień, rozmiary kolumn, warunki dobrej pracy kolumny.
- c) Dobór rodzaju chromatografii do oznaczenia określonego związku organicznego.

SPEKTROSKOPIA W NADFIOLECIE (UV) I ŚWIETLE WIDZIALNYM (VIS).

Sprawdziany obejmują również zagadnienia związane z wykonaniem ćwiczeń (instrukcje).

ZALECANA LITERATURA

1. K. Bańkowski, A. Krawczyk, R. Siciński, J. Stępiński, A. Temeriusz - *Ćwiczenia z organicznej analizy jakościowej i chemii bioorganicznej* - Wyd. UW, 1990.
2. A. Vogel - *Preparatyka organiczna* - WNT, 1984
3. Z. Jerzmanowska - *Analiza jakościowa związków organicznych* - PZWL, 1975.
4. J. Woliński, J. Terpiński - *Organiczna analiza jakościowa* - PWN, 1973.
5. J. Bojarski (red) - *Ćwiczenia z preparatyki i analizy organicznej* - Collegium Medicum - UJ, 1996.
6. R. Walczyńska, J. Sokołowski, G. Kupryszewski - *Analiza związków organicznych* - Wyd. Uniw. Gdańskiego, 1996.
7. J. Wróbel (red.) - *Preparatyka i elementy syntezy organicznej* - PWN, 1983.
8. J.A. Moore, D.L. Dalrymple - *Ćwiczenia z chemii organicznej* - PWN, 1976.
9. A. Berthillier - *Chromatografia i jej zastosowanie* - PWN, 1975.
10. Opieńska-Blauth, H. Kraczkowski, H. Brzuszkiewicz - *Zarys chromatografii cienkowarstwowej* - PWRiL, 1971, 1976.
11. L.A. Kazicyna, N.B. Kupletska - *Metody spektroskopowe wyznaczania struktury związków organicznych* - PWN, 1974, 1976.
12. M. Szafran, Z. Dega-Szafran - *Określanie struktury związków organicznych metodami spektroskopowymi* - PWN, 1988.
13. a) R. M. Silverstein, C. C. Bassler - *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych* - PWN 1970. b) R. M. Silverstein, F.X. Webster, D.J. Kiemle *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych* - PWN 2007.
14. F. Wehrli, T. Wirthlin - *Interpretacja widm w spektroskopii ^{13}C NMR* - PWN, 1985
15. A. Ejchart, L. Kozerski - *Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego ^{13}C* - PWN, 1981, 1988.
16. W. Zieliński, A. Rajca (red) - *Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych* - WNT, 1995.
17. B.D. Hames, N.M. Hooper, J.D. Houghton - *Krótkie wykłady: Biochemia* - PWN, 2001.
18. L. Kłyszajko-Stefanowicz - *Ćwiczenia z biochemii* - PWN, 1999.
19. R.K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell - *Biochemia Harpera* - PZWL, 2004.
20. C.N.R. Rao, – *Spektroskopia elektronowa związków organicznych* - PWNT, 1982.
21. a) R.T. Morrison, R.N. Boyd - *Chemia Organiczna* - PWN, 1998.
b) J. McMurry - *Chemia Organiczna* - PWN, 2005.

REGULAMIN PRACOWNI Z CHEMII ORGANICZNEJ

1. Uczęszczanie na ćwiczenia jest obowiązkowe. Każda nieobecność musi być usprawiedliwiona zwolnieniem lekarskim. Trzykrotne opuszczenie zajęć bez usprawiedliwienia skutkuje zawieszeniem studenta w ćwiczeniach i powiadomieniem Dziekana.
2. **Na ćwiczenia nie wolno się spóźniać.** Trzykrotne spóźnienie jest traktowane jak dzień nieobecności!
3. **Studenci obowiązani są pracować wyłącznie w bawełnianych fartuchach laboratoryjnych i okularach ochronnych. Student przystępujący do ćwiczeń musi być ubezpieczony.**
4. **Studenci MUSZĄ ZNAĆ ZASADY BHP w laboratoriach chemicznych oraz zasady udzielania pierwszej pomocy w nieszczęśliwych wypadkach. INSTRUKCJA ZNAJDUJE SIĘ W SALI ĆWICZEŃ.**
5. **Studentom nie wolno spożywać posiłków w sali ćwiczeń, pracować z uszkodzonym, grożącym wypadkiem szkłem laboratoryjnym, używać sprzętu pomocniczego niezgodnie z jego przeznaczeniem, trzymać teczek i torebek na stole laboratoryjnym lub na podłodze przyjmować gości na sali ćwiczeń**
6. **Wszystkie prace z rozpuszczalnikami palnymi (np. etery, aceton, alkohole, węglowodory, estry itd.) należy wykonywać w odległości 3 m od palnika z otwartym ogniem.**
7. Pozostałości po syntezie należy zbierać w przeznaczonych na ten cel, odpowiednio oznaczonych pojemnikach. **Nic oprócz roztworów wodnych nie powinno trafić do zlewu !**
8. Studenci obowiązani są do przestrzegania porządku i czystości na stole przy którym pracują, na sali, w szafkach i szufladach ze szkłem i sprzętem laboratoryjnym.
9. Kierownik ćwiczeń wyznacza **dyżurnych**, którzy pilnują porządku w trakcie trwania zajęć, dbają o systematyczne wyjmowanie szkła z suszarki i odkładanie na właściwe miejsce. Przynajmniej 30min. przed końcem ćwiczeń dyżurni porządkują salę: odkładają na miejsce odczynniki chemiczne, szkło i sprzęt pomocniczy, sprzątają stoły i konsole pod wyciągami, gaszą palniki, zakręcają krany i zdejmują z nich węże, wyłączają urządzenia elektryczne jak wagi, autotransformatory oraz wyciągi.
10. Każdy student jest odpowiedzialny materialnie za szkło i sprzęt laboratoryjny. W przypadku zniszczenia studenci są zobowiązani do odkupienia lub zapłaty za naprawę.
11. Wszystkich studentów obowiązuje oszczędność w używaniu odczynników chemicznych gazu, wody i prądu.
12. **Każdy student obowiązany jest stosować się do regulaminu pracowni.**