

PRACOWNIA POZIOM B: 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. Identyfikacja składników mieszaniny dwóch związków organicznych.
- Ćwiczenie 4. Zastosowanie metody chromatografii cienkowarstwowej do identyfikacji składników mieszaniny dwóch stałych związków organicznych.
- Ćwiczenie 5. Izolacja i rozdział składników materiału biologicznego.
- Ćwiczenie 6. Identyfikacja składników materiału biologicznego metodą spektroskopii UV/Vis; porównanie danych doświadczalnych z literaturą.
- Ćwiczenie 7. Analiza wybranych leków metodami chemicznymi i chromatograficznymi.
- Ćwiczenie 8. Enzymatyczne metody identyfikacji związków.
- Ćwiczenie 9. Identyfikacja metodami spektroskopowymi składników mieszanin (ćw.3, 4).

INFORMACJE O PRACOWNI IZO ORAZ ZASADACH ZALICZENIA

Każda pracownia trwa 6.5 godz. Ćwiczenia 2, 3 i 9 wykonywane są 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 (45 godz. - część laboratoryjna).
- 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

Ćwiczenia 2, 3, 4 i 9 nie wymagają instrukcji. Wszystkie ćwiczenia wstępnie omawia asystent, a nowe techniki są przedstawiane w formie pokazu. Ćwiczenia 1, 5, 7 i 8 wykonuje się według instrukcji, z którą trzeba się zapoznać przed zajęciami.

Przed przystąpieniem do ćwiczeń należy zaliczyć sprawdzian wejściowy.

INSTRUKCJE,
WSKAZÓWKI DO ĆWICZEŃ

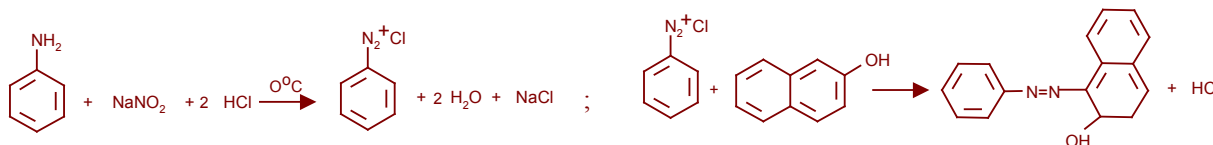
Ćwiczenie 1: Reakcje identyfikujące grupy funkcyjne.

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 alkioloamina	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 rządowe aromatyczne: powstaje N-nitrozoamina (oleista, barwna ciecz lub ciało stałe)

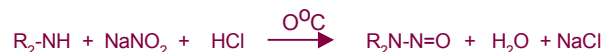
aminy III rządowe aromatyczne: powstaje C-nitrozoamina w postaci żółtego lub zielonego osadu



aminy I rządowe alifatyczne: powstająca sól diazoniowa ulega natychmiastowemu rozkładowi – wydzielą się gazowy azot.



aminy II rządowe alifatyczne: powstaje N-nitrozoamina (oleista, barwna ciecz)



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

WYKONANIE:

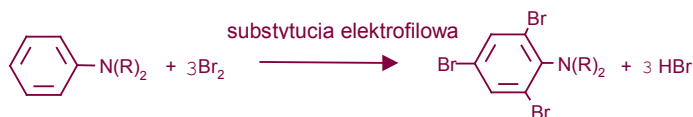
10% r. kwasu solnego; 10% r. azotanu(III) sodu; lód; 2-naftol; 10% r. wodorotlenku sodu

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. Oziębnić, 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.

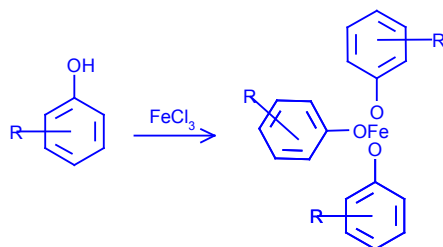
b) Do małej kolbki wlać 0.5cm³ badanej substancji, 1cm³ wody dodać ok. 0.2cm³ chlorku benzoilu. Dodawać porcjami, wstrząsając ok. 1cm³ 20% wodorotlenku sodu (do uzyskania odczynu zasadowego. Obserwować powstawanie osadu lub oleju.

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)



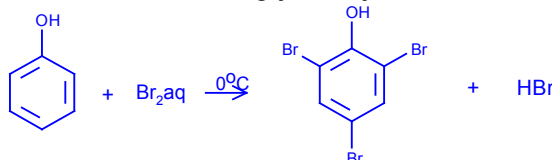
WYKONANIE:

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:

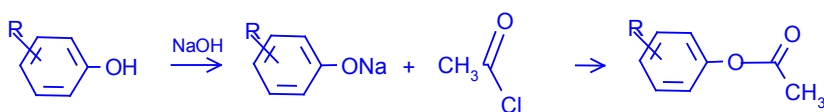
2% roztw. bromu w CCl_4 lub woda bromowa

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.

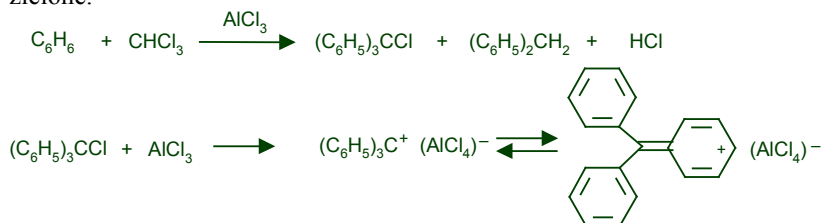
Podobnie postępuje się przy zastosowaniu chlorku benzoilu.

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

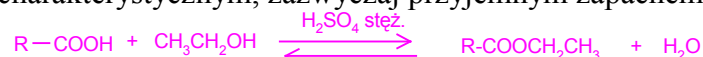
Jod rozpuszczony w eterze etylowym (czy innych rozpuszczalnikach zawierających tlen) daje zabarwienie żółtobrazowe.

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.

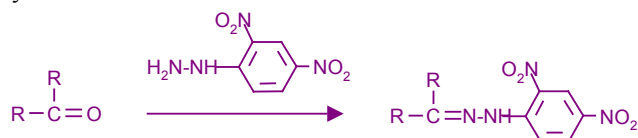
Obserwować powstawanie warstwy estru. Badać zapach.

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. Oziębować, 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 cm^3 1% roztworu wodnego azotanu srebra, 0.5 cm^3 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 cm^3) ; ogrzewać ok. pięć minut na łaźni wodnej. Dodatni wynik: obserwuje się wydzielanie ceglastego osadu.

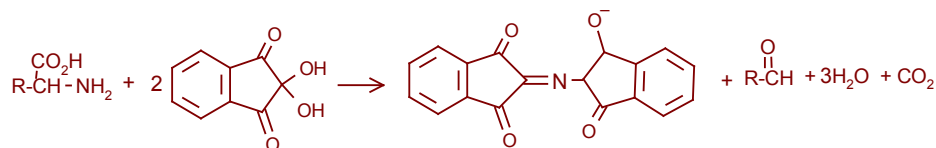
(Odczynnik Trommera: CuSO_4 + wodorotlenek sodu; odczynnik Benedicta: CuSO_4 + mieszanina cytrynianu sodu i węglanu sodu).

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 cm^3 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.

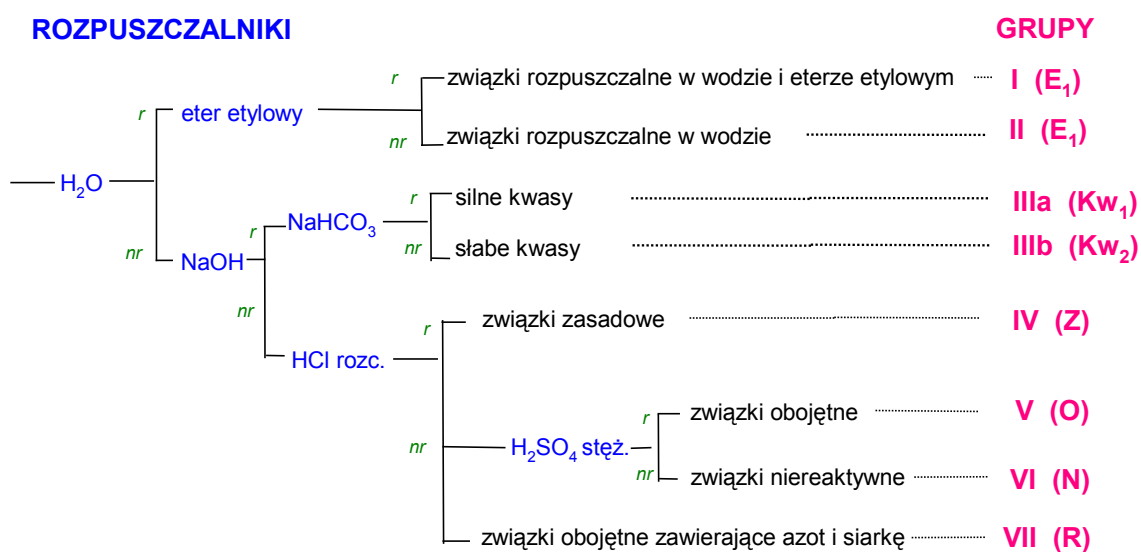
Literatura - [1] - [7]

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.

Identyfikacja składników mieszaniny dwóch związków organicznych:

- próby wstępne
- rozdzielenie mieszaniny metodą ekstrakcji; oczyszczenie składników
- oznaczenie stałych fizykochemicznych
- ustalenie rodzaju grup funkcyjnych na podstawie charakterystycznych reakcji
- synteza pochodnych krystalicznych i oznaczenie stałych fizykochemicznych (jeśli jest niezbędne)
- porównanie otrzymanych wyników z danymi literaturowymi.

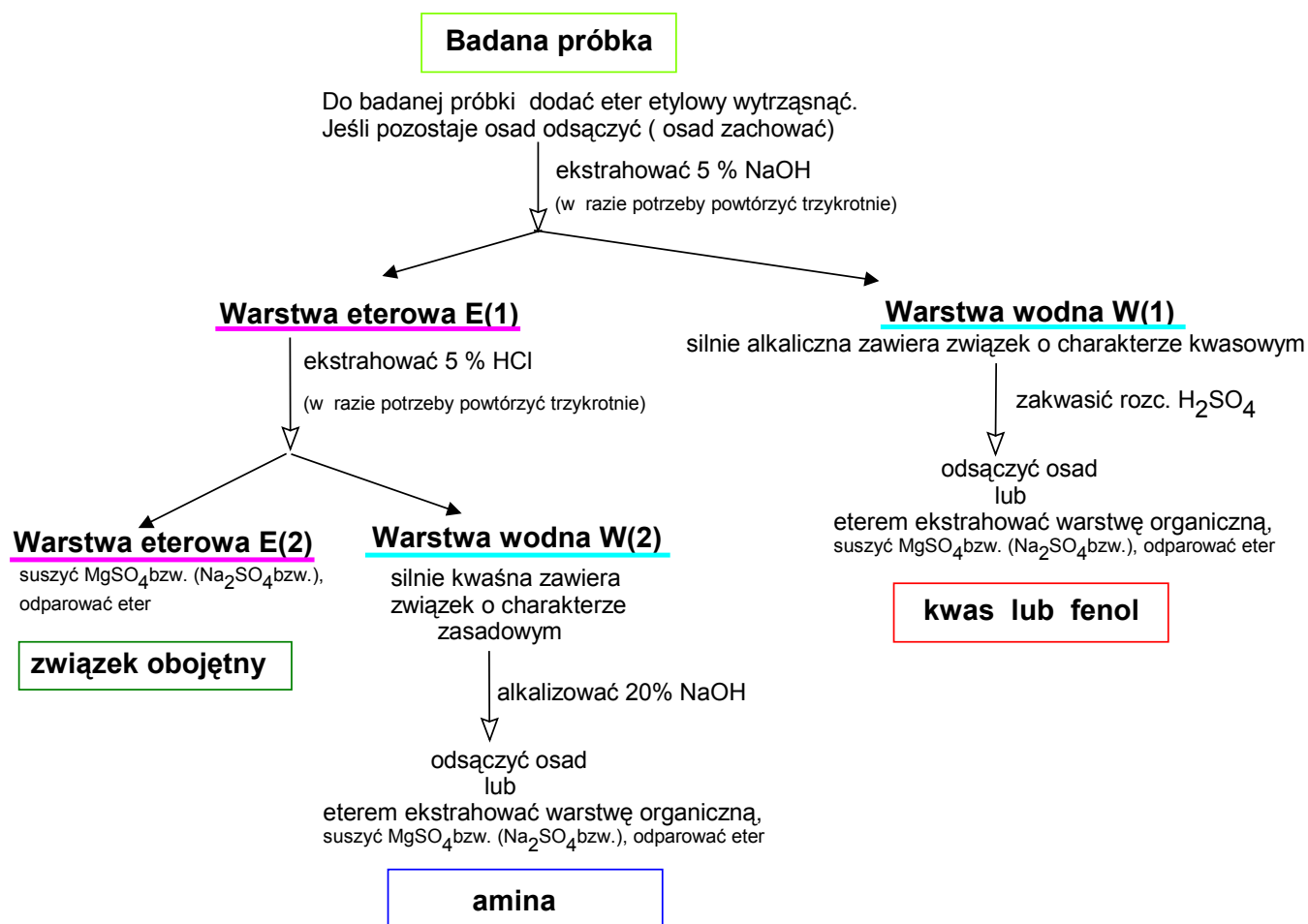
Literatura - [1] - [7]

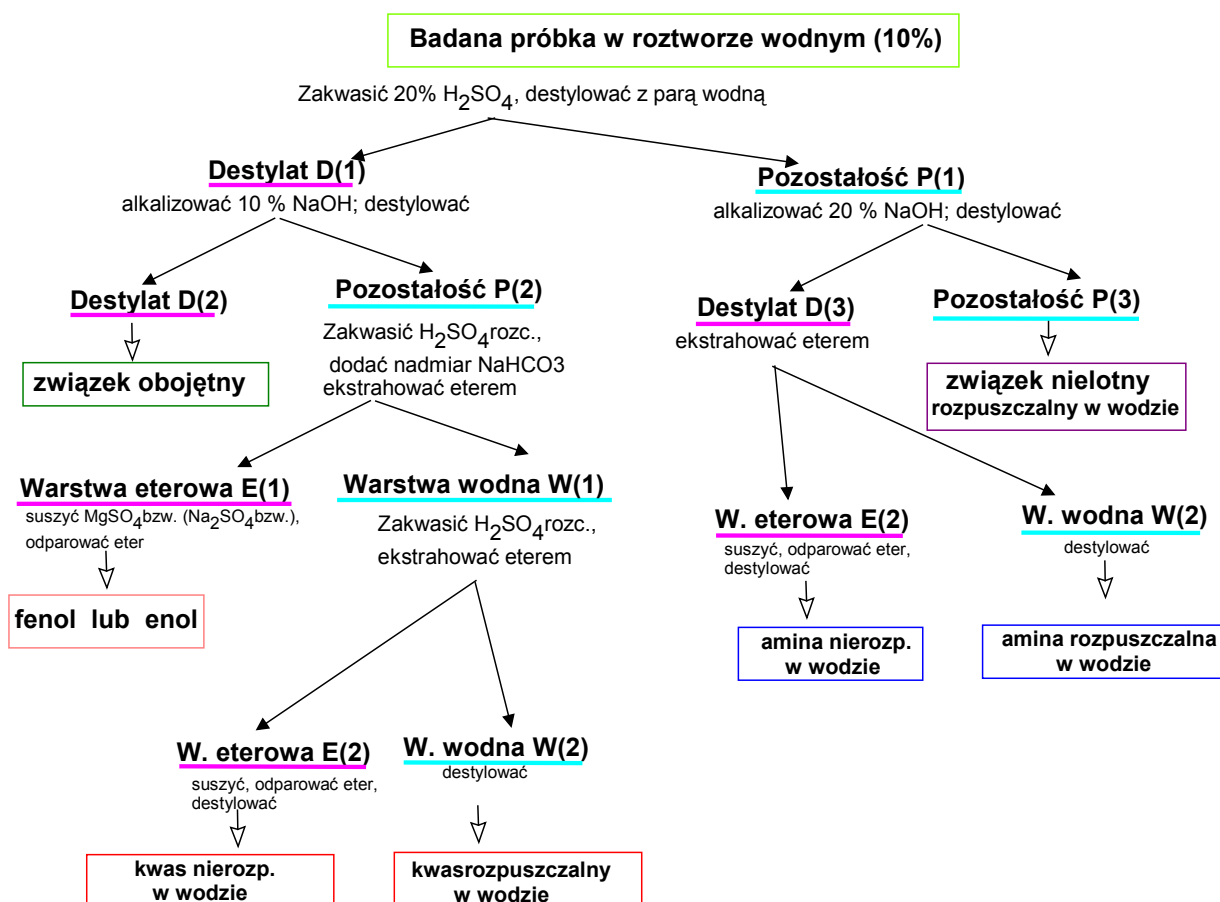
Ad a) próby wstępne

Próby wstępne polegają na stwierdzeniu czy składniki mieszaniny są rozpuszczalne w wodzie, czy też nie. W zależności od wyniku stosujemy odmienny schemat rozdziału składników mieszaniny.

Ad b) Rozdzielenie mieszaniny metodą ekstrakcji; oczyszczenie składników.

SCHEMAT ROZDZIELANIA MIESZANIN ZWIĄZKÓW NIEROZPUSTCZALNYCH W WODZIE





Ćwiczenie 4.

Zastosowanie metody chromatografii cienkowarstwowej do identyfikacji składników mieszaniny dwóch stałych związków organicznych.

- dobór warunków rozdziału chromatograficznego
- oznaczenie wartości R_f i przyporządkowanie substancjom wzorcowym
- określenie właściwości chemicznych, ustalenie rodzaju grup funkcyjnych na podstawie reakcji testowych
- oznaczenie stałych fizykochemicznych
- porównanie otrzymanych wyników z danymi literaturowymi.

Literatura - [1] - [10]

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.

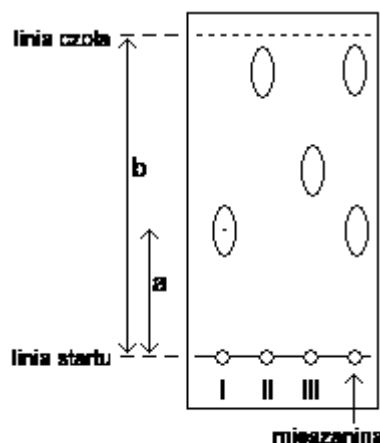
Polepszenie rozdziału uzyskuje się przez stosowanie mieszanin rozpuszczalników o różnej polarności.

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.

WYKONANIE ĆWICZENIA

Materiały

- płytki chromatograficzne (żel krzemionkowy)
- komora chromatograficzna
- płytki analityczne, kapilary, pipetki, bibuła,
- linijka, ołówek, nożyczki, szczypce
- cylinder miarowy
- suszarka fryzjerska

Odczynniki

- wzorce
- badana mieszanina dwóch substancji
- rozpuszczalniki

Zestaw zawiera cztery probówki – w jednej znajduje się mieszanina dwóch związków, w pozostałych są substancje wzorcowe.

Niewielkie ilości substancji należy rozpuścić w odpowiednio dobranym rozpuszczalniku (aceton lub chloroform), a roztwory umieścić na płytce analitycznej.

Przygotowanie komór chromatograficznych

Każdą komorę chromatograficzną wyłożyć płatkami bibuły dla lepszego nasycenia jej parami rozpuszczalników.

Jako eluenty zastosować: heksan i chloroform. W przypadku gdy oba eluenty będą za słabe zastosować aceton.

Jeśli okaże się konieczne - zastosować mieszaninę rozpuszczalników. Proporcję składników należy dobrać metodą prób i błędów.

Układ rozwijający nalać na dno komory chromatograficznej i pozostawić na ok. 15-30 min.

Przygotowanie płytek

Wielkość płytek musi być dopasowana do rozmiaru komory chromatograficznej!

Na płytce narysować miękkim ołówkiem linię startu i linię czoła (ok. 0,5 - 1 cm od krawędzi płytki). Na linię startu nanieść po ok. 2 μ l roztworów wzorcowych i odpowiednią mieszanę tak, by powstające plamki miały średnicę ok. 1-2 mm. Wysuszyć.

Rozdział chromatograficzny, wyznaczenie wartości współczynników R_f

Przygotowaną płytkę umieścić za pomocą szczypiec w komorze. Prowadzić proces chromatografowania do chwili, gdy czoło rozpuszczalnika dotrze do górnej, narysowanej wcześniej linii. Płytkę wyjąć i po wysuszeniu w strumieniu ciepłego powietrza (suszarką) wyznaczyć współczynniki R_f badanych związków w wybranym układzie rozwijającym. Ustalić skład mieszaniny.

Identyfikacja składników mieszaniny

Dla substancji stanowiących badaną mieszaninę oznaczyć grupę rozpuszczalności, określić właściwości chemiczne; na podstawie reakcji testowych ustalić rodzaj grup funkcyjnych; oznaczyć temperaturę topnienia. Na podstawie porównania otrzymanych wyników z danymi literaturowymi zaproponować prawdopodobne struktury składników mieszaniny.

Potwierdzenie struktur nastąpi po opracowaniu widm IR, NMR (patrz ćwiczenie 9)

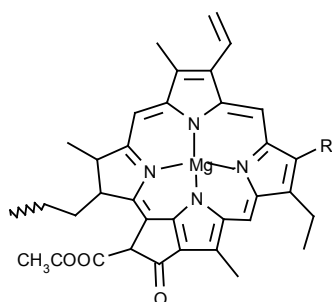
Ćwiczenie 5.

Izolacja i rozdział składników materiału biologicznego.

Zadanie problemowe. Opracowanie literaturowe wybranego tematu i wykonanie części doświadczalnej.

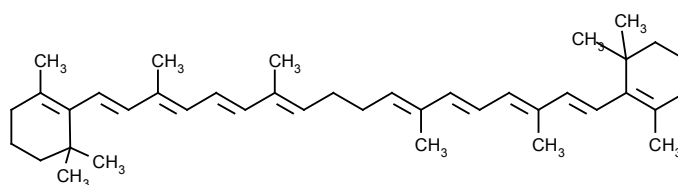
Instrukcja: Izolacja i rozdział składników materiału biologicznego - barwniki liści.

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.

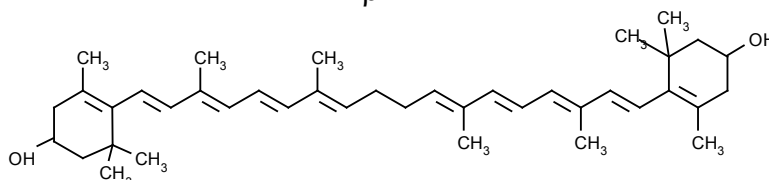


chlorofil a R = CH₃

chlorofil b R = CHO



β-karoten



ksantofil

Celem ćwiczenia jest wydzielenie barwników z liści metodą ekstrakcji i ich analiza za pomocą chromatografii cienkowarstwowej oraz rozdział poszczególnych grup barwników przy zastosowaniu adsorpcyjnej chromatografii kolumnowej.

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

EKSTRAKCYJA BARWNIKÓW Z LIŚCI

Około 5 g świeżych lub mrożonych, zielonych liści (z dowolnej rośliny) pokroić i ucierać w moździerzu porcelanowym z małą ilością (ok. 10cm³) 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 chromatografii kolumnowej. 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)

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

ADSORPCYJNA CHROMATOGRAFIA KOLUMNOWA

Żel krzemionkowy wsypać do zlewki, dodać heksan i wymieszać. Tak przygotowaną zawiesiną napęlić kolumnę chromatograficzną, zabezpieczoną od strony kranu zwitkiem waty. Przy pomocy pipetki nanieść na kolumnę heksanowy roztwór barwników. Po wsiąknięciu roztworu opłukać ścianki kolumny heksanem. Składniki mieszaniny barwników eluować stosując skokowy gradient stężenia eteru etylowego w heksanie (5, 20, 50, 80% v/v). Zbierać jedynie frakcje o największym natężeniu barwy. Otrzymane ekstrakty posłużą do wykonania ćwiczenia 6.

Literatura - [17] - [20]

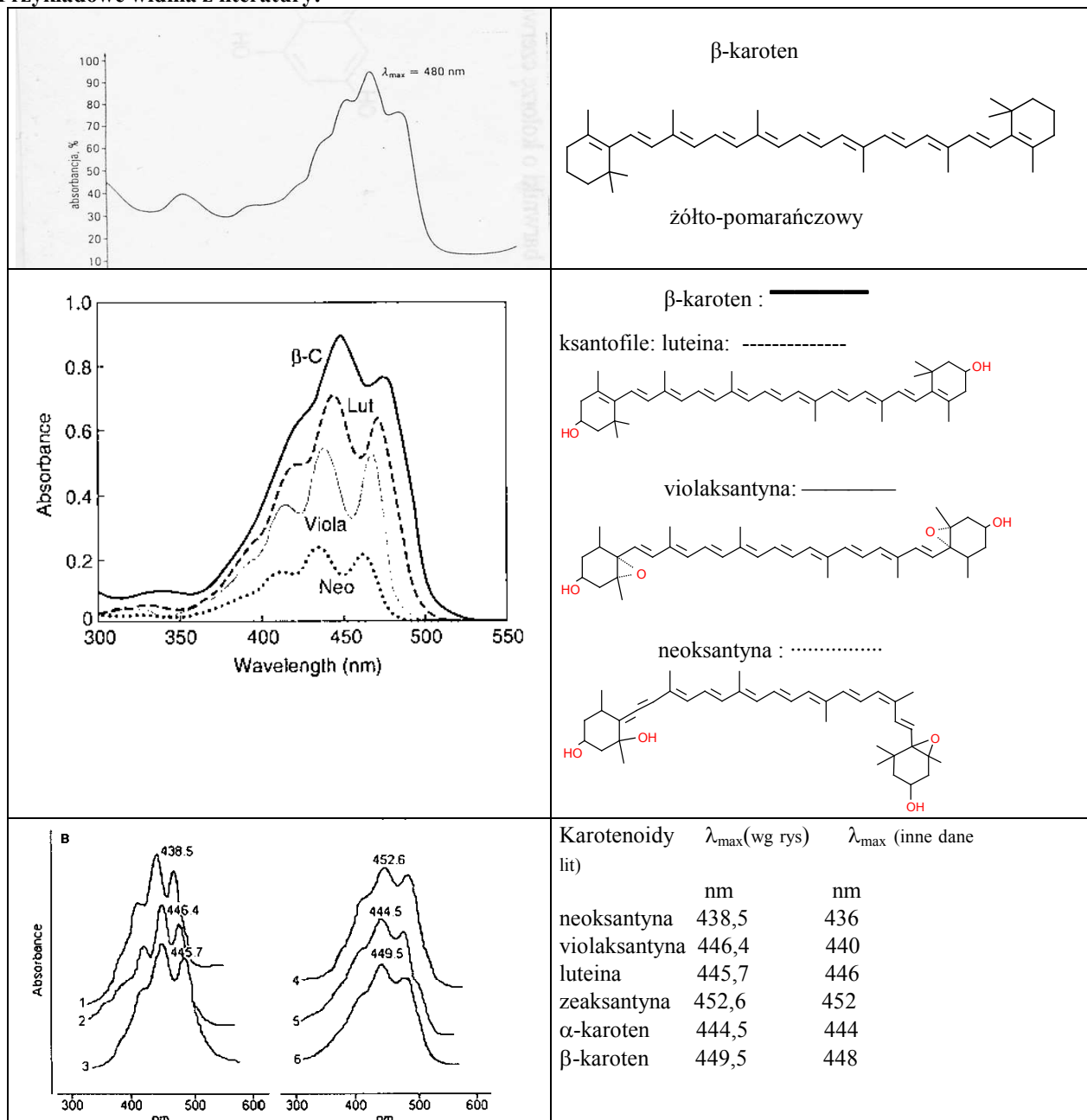
Ćwiczenie 6.

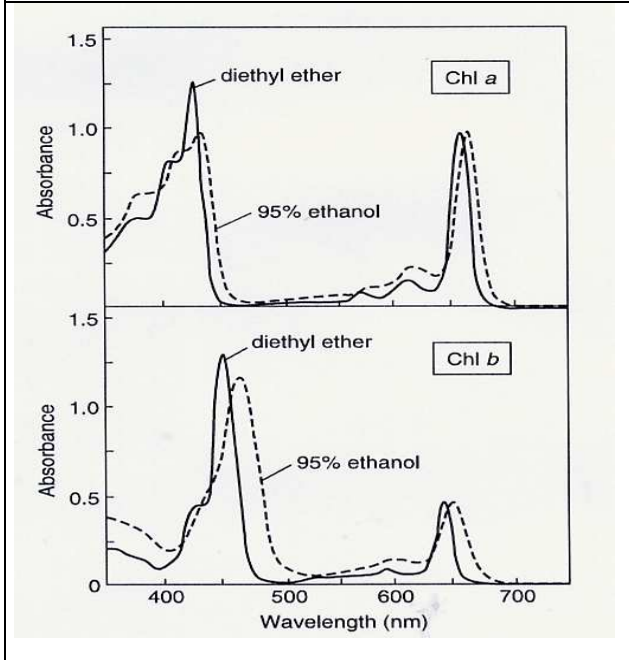
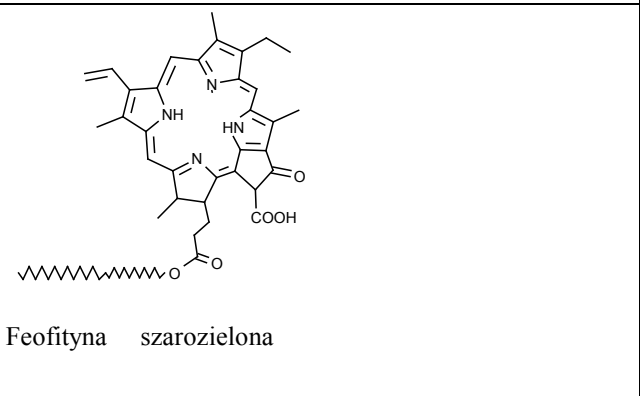
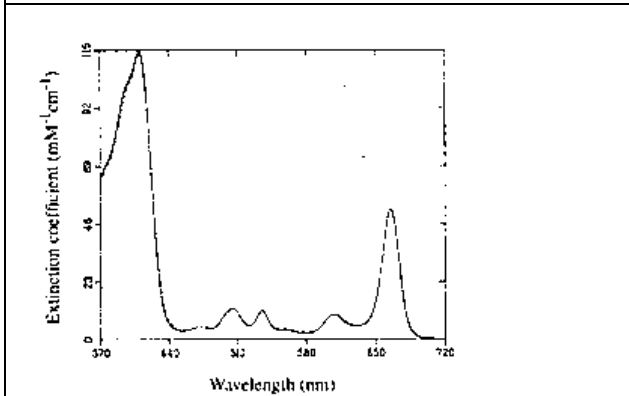
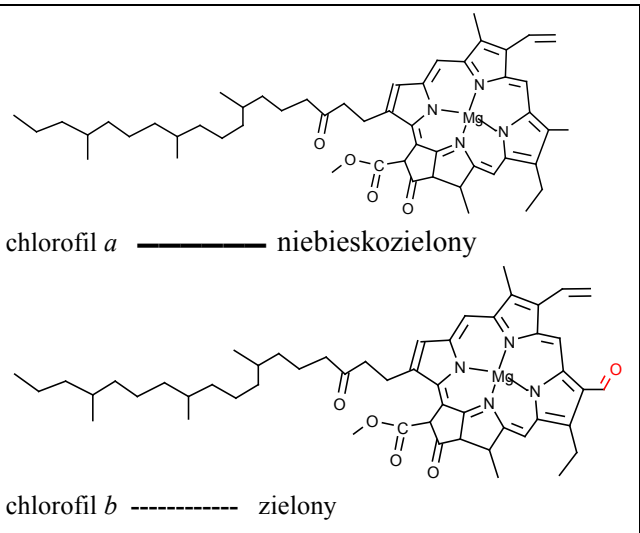
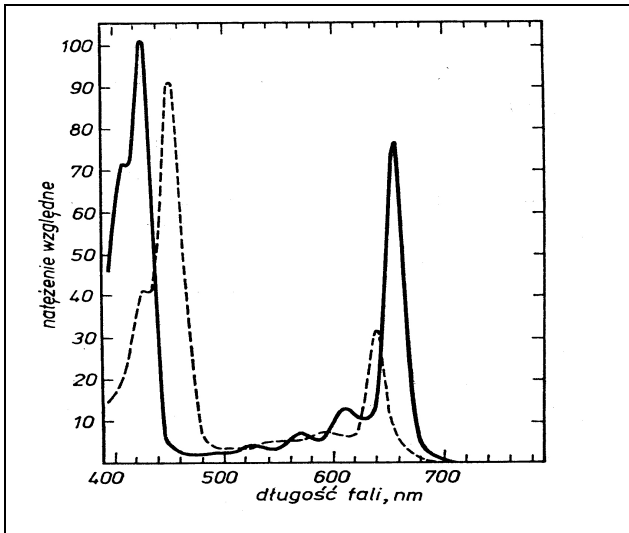
Identyfikacja składników materiału biologicznego metodą spektroskopii UV/Vis; Porównanie danych doświadczalnych z literaturą.

Przygotowane w ćwiczeniu nr 5 frakcje poszczególnych barwników rozcieńczyć odpowiednim dla danej frakcji eluentem (mieszaniny eter etylowy - heksan 5, 20, 50, 80% v/v). Zapisać widma każdej frakcji w zakresie 200 nm-700 nm. Otrzymane widma porównać z danymi literaturowymi.

Literatura - [11] - [13], [16], [18], [20], [21],

Przykładowe widma z literatury:





Wpływ rozpuszczalnika na widmo chlorofilu a

Wpływ rozpuszczalnika na widmo chlorofilu b

Ćwiczenie 7.

Analiza metodami chemicznymi i chromatograficznymi wybranych leków.

Zadanie problemowe. Opracowanie literaturowe wybranego tematu i wykonanie części doświadczalnej.

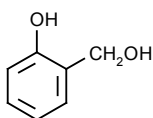
Instrukcja: Analiza metodami chemicznymi i chromatograficznymi leków zawierających aspirynę.

Aspiryna jest lekiem znanym od dawna już w XIX wieku niemieccy chemicy opracowali syntezę aspiryny, wykorzystując do tego celu substancję naturalną - kwas salicylowy, występującą w roślinie zwanej wierzby błotnej; nazwa łacińska to *Spirea ulmaria*.

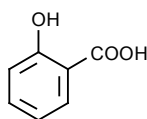
Produkt otrzymany w wyniku acetylowania składnika rośliny **Spirea** otrzymał nazwę **aspiryna**. Warto wiedzieć, że w korze wierzby (łac. *Salix*) znajduje się alkohol salicylowy tzw. saligenina. Wywary z kory wierzby były już w starożytności stosowane przeciw gorączce, bólowi, czy przeciw reumatyzmowi..

Aspiryna jest zaliczana do niesterydowych leków przeciwzapalnych. Wykazuje ona zdolność blokowania enzymu cyklooksygenazy, odpowiedzialnego za syntezę w organizmie pewnego typu prostaglandyn wywołujących reakcję zapalną i odczucie bólu.

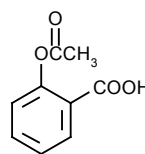
Wywary z kory wierzby działają na żołądek łagodniej niż aspiryna, gdyż substancja czynna - saligenina nie zawiera grupy karboksylowej.



Alkohol salicylowy
(saligenina)

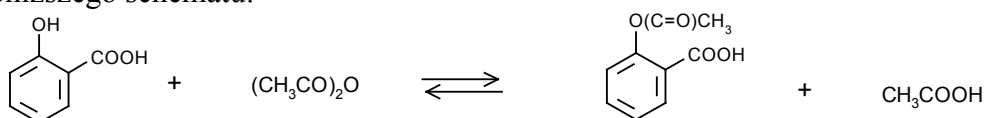


kwas salicylowy

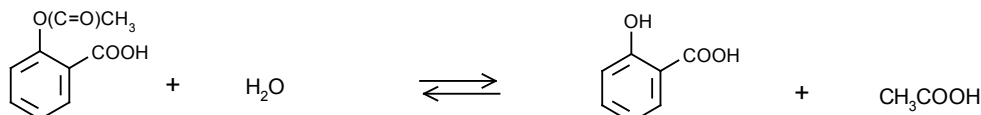


kwas acetylosalicylowy
(aspiryna)

Kwas acetylosalicylowy (aspiryna) z dobrą wydajnością otrzymuje się w wyniku estryfikacji kwasu salicylowego bezwodnikiem octowym w obecności kwasu siarkowego według poniższego schematu:



Aspiryna stosowana jako lek nie może być przetrzymywana przez długi czas, gdyż w obecności wilgoci i w podwyższonej temperaturze łatwo ulega hydrolizie na kwas salicylowy i kwas octowy według schematu:



Obecność kwasu salicylowego może mieć uboczne działanie polegające na podrażnieniu przewodu pokarmowego.

Występowanie zanieczyszczeń można badać różnymi metodami, np.:

1. za pomocą testu z chlorkiem żelaza(III)
2. metodą chromatografii cienkowarstwowej
3. przez określenie temperatury topnienia badanej próbki kwasu acetylosalicylowego.

SYNTEZA KWASU ACETYLOSALICYLOWEGO

WYKONANIE

Odczynniki

kwas salicylowy 10 g
bezwodnik octowy 15 g (14 cm³)
kwask siarkowy stęż. 0.1 cm³, etanol

Aparatura

erlenmajerka 200 -250 cm³, termometr
zestaw do krystalizacji z etanolu
łaznia wodna

W erlenmajerce umieścić kwas salicylowy, bezwodnik octowy i 2-3 krople kwasu siarkowego. Zawartość kolby ogrzewać przez 20 min. na łaźni wodnej i jednocześnie ostrożnie mieszać termometrem utrzymując temperaturę w granicach 55-60°C. Następnie mieszaninę ochłodzić, dodać 100 cm³ wody destylowanej, zamieszać bagietką, a wytrącony osad odsączyć pod zmniejszonym ciśnieniem, przemyć małą ilością wody i krystalizować z mieszaniny etanolu (ok.30 cm³) i wody destylowanej (ok.80 cm³). Wydajność 12 g t.t.=135-136°C.

WYDZIELANIE KWASU ACETYLOSALICYLOWEGO Z TABLETEK FARMACEUTYKÓW (aspiryna, polopiryna, asprokol, etopiryna, encopiryn itp)

Tabletki farmaceutyków składają się z substancji czynnych m.in. z kwasu acetylosalicylowego i masy tabletkowej, którą zwykle stanowi talk lub skrobia, sole nieorganiczne, substancje poprawiające smak.

Kwas acetylosalicylowy można oddzielić od masy tabletkowej za pomocą krystalizacji.

WYKONANIE

Odczynniki:

aspiryna w tabletkach
95% etanol, woda dest.

Sprzęt laboratoryjny:

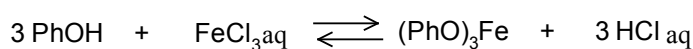
kolba stożkowa 100cm³, łaźnia wodna, lejek szklany,
kolba ssawkowa, lejek sitowy, pompka wodna, nożyczki

Pięć tabletek aspiryny (polopiryny) umieścić w kolbie stożkowej, dodać 10 cm³ etanolu, ogrzewać do momentu rozpadnięcia się tabletek. W roztworze znajdzie się kwas acetylosalicylowy. Masa tabletkowa pozostanie w osadzie. Osad odsączyć na ogrzanym lejku szklanym zaopatrzonym w sącdek karbowany. Do pozostałego oziębionego przesącza dodaje się 20-30 cm³ zimnej wody destylowanej. Dodatek wody powoduje wypadanie osadu aspiryny z roztworu (zmniejsza się rozpuszczalność aspiryny w roztworze wodno alkoholowym). Wydzielone kryształy odsączyć na lejku sitowym i suszyć na powietrzu.

ANALIZY JAKOŚCIOWE

TEST Z CHLORKIEM ŻELAZA (III)

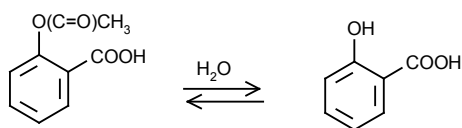
Związki zawierające grupę fenolową lub enolową dają barwne kompleksy z chlorkiem żelaza(III) według schematu:



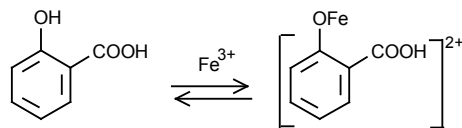
W przypadku przeterminowanych leków zawierających aspirynę pod wpływem wilgoci w wyniku hydrolizy może powstawać szkodliwy kwas salicylowy, którego obecność można stwierdzić przedstawionym wyżej testem.

Schematy reakcji:

Hydroliza aspiryny do kwasu salicylowego:



Identyfikacja kwasu salicylowego:



WYKONANIE

Odczynniki:

1% roztwór FeCl_3
wydzielona aspiryna, przesącz krystalizacyjny,
kwas acetylosalicylowy z syntezy, kwas salicylowy

Sprzęt laboratoryjny:

statyw, probówki, pipetki

Badane próbki rozpuścić w wodzie destylowanej (ok. 2 cm^3 ; w razie potrzeby dodać parę kropli etanolu). Do każdej probówki dodać po kilka kropli roztworu FeCl_3 . Zanotować wyniki.

ANALIZA CHROMATOGRAFICZNA

WYKONANIE

Odczynniki:

badane próbki (jw),
etanol, aceton, butan-1-ol,
octan etylu, 12,5% woda amoniakalna

Sprzęt laboratoryjny:

płytki chromatograficzne (silikażel),
komora chromatogr., lampa UV, kapilary,
nożyczki, szczypce, suszarka fryzjerska,
ołówek, pipetki, cylinder, bibuła, linijka,

Komorę chromatograficzną wyłożyć płatkami bibuły dla lepszego nasycenia jej parami rozpuszczalników.

Przygotować układ rozwijający: octan etylu: aceton : butan-1-ol : woda amoniakalna (5 : 4 : 3 : 1)

Układ rozwijający nalać na dno komory chromatograficznej i pozostawić na ok. 15 - 30 min.

Wielkość płytek musi być dopasowana do rozmiaru komory chromatograficznej!

Na płytce narysować miękkim ołówkiem od góry linię startu a od dołu płytki linię czoła (0,5 - 1 cm od krawędzi płytki). Na linię startu nanieść po ok. $2 \mu\text{l}$ etanolowych roztworów badanych próbek tak, by powstające plamki miały średnicę ok. 1 mm. Wysuszyć. Przygotowaną płytkę umieścić za pomocą szczypiec w komorze. Prowadzić proces rozwijania chromatogramu do chwili, gdy czoło rozpuszczalnika dotrze do górnej, narysowanej wcześniej linii. Płytkę wyjąć i po wysuszeniu w strumieniu ciepłego powietrza (suszarka) ustalić położenie plamek za pomocą lampy UV. Wyznaczyć współczynniki R_f badanych związków.

Literatura - [1] - [10], [21].

Ćwiczenie 8. Enzymatyczne metody identyfikacji związków

Jest wiele metod identyfikacji związków organicznych. Metody te można podzielić na chemiczne, spektroskopowe, i biochemiczne, np. enzymatyczne. Te ostatnie stosuje się z powodu selektywności enzymów.

Zastosowany w ćwiczeniu enzym: dehydrogenaza alkoholowa przyspiesza przekształcanie się etanolu w aldehyd octowy i odwrotnie. Może też katalizować przemiany innych alkoholi.

Dehydrogenaza alkoholowa występuje w komórkach wielu bakterii, grzybów, roślin i zwierząt. Współdziała z koenzymem - cząsteczką NAD⁺ lub NADH. W reakcji tworzenia aldehydu octowego zużywany jest NADH, a jako produkt uboczny powstaje NAD⁺:



W centrum katalitycznym enzymu pochodzącego z drożdży lub z organizmu ludzkiego znajduje się atom cynku. U bakterii białko to w centrum zawiera żelazo, zaś u owadów nie zawiera żadnego metalu. W międzynarodowej klasyfikacji enzymów dehydrogenaza alkoholowa należy do klasy oksydoreduktaz i ma numer EC.1.1.1.1.

Celem tego ćwiczenia będzie wykrycie wśród analizowanych próbek alkoholu pierwszorzędowego (etanolu) za pomocą drożdżowej (z *Saccharomyces cerevisiae*) dehydrogenazy alkoholowej (E.C.1.1.1.1), która to katalizuje selektywne utlenianie alkoholi pierwszorzędowych. Detekcja będzie przeprowadzana spektrofotometrycznie.

WYKONANIE

Odczynniki:

próbki alkoholi o różnej rzędowości,
0.06 M bufor pirofosforanowy pH 8.5
20 μM roztwór NAD⁺,
enzym (1,3 mg w 1cm³ buforu; 340U/mg,
370 U/mg białka)

Sprzęt laboratoryjny, aparatura:

probówki, pipety, statyw,
spektrofotometr UV/Vis
kuweta kwarcowa

Do kuwety kwarcowej (grubość 1 cm, objętość 3 cm³) odpipetować 2.92 cm³ buforu pirofosforanowego. Następnie dodać 20 μl roztworu NAD⁺. Zmierzyć absorbancję przy długości fali 340 nm. Dodać 50 μl analizowanej próbki i ponownie zmierzyć absorbancję. Dodać 10 μl enzymu i mierzyć zmiany absorbancji (10 min). Podobnie zbadać wszystkie próbki.

Literatura - [17] - [20]

Ćwiczenie 8. Wariant B. Identyfikacja enzymu katalazy

Enzymy są katalizatorami reakcji biochemicznych. Zwiększają one szybkość reakcji chemicznych, same nie ulegają przy tym zmianie. Katalizowane przez enzymy reakcje przebiegają zwykle w łagodnych warunkach (niewysoka temperatura, ciśnienie atmosferyczne, $\text{pH} \cong 7$). Enzymy są wysoce specyficzne w stosunku do substratu z którym reagują.

Jednym z dobrze znanych enzymów jest katalaza soku z ziemniaka. Katalaza odznacza się bardzo dużą szybkością reakcji. Jedna cząsteczka katalazy może w sekundę rozłożyć 40 milionów cząsteczek nadtlenu wodoru. Tak duża wydajność potrzebna jest do ochrony elementów komórki przed czynnikami utleniającymi.

Działanie katalazy łatwo zaobserwować za pomocą reakcji rozkładu wody utlenionej do wody i tlenu cząsteczkowego. W obecności katalazy reakcja ta przebiega bardzo szybko.
($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$)

Materiały i aparatura

nadtlenek wodoru (30%), świeży ziemniak,
tarka, gaza, kolbki płaskodenne, łaźnia lodowa, wrząca łaźnia

Wykonanie

Przygotować 0,5%, 3%, 6% roztwory wody utlenionej przez rozcieńczenie 30% nadtlenu wodoru wodą destylowaną.

Utrzeć ziemniak. Do otrzymanej miazgi dodać w przybliżeniu taką samą ilość wody. Wycisnąć sok za pomocą gazy. Przechowywać sok w kąpieli lodowej.

Dodać 2 ml soku do 30 ml roztworów (0,5%, 3%, 6%) nadtlenu wodoru i wstrząsnąć.

Dodać 2 ml soku do 30 ml destylowanej wody.

Powtórzyć z 6% wodą utlenioną używając soku ogrzanego przez 10 minut we wrzącej łaźni wodnej (denaturacja enzymu).

Zanotować obserwacje.

Ćwiczenie 9.

Identyfikacja metodami spektroskopowymi składników mieszanin z ćwiczeń 3 i 4

Identyfikacja składników mieszaniny na podstawie analizy widm.

1. Widma w podczerwieni (IR). Określenie położenia pasm absorpcji wiązań.
2. Widma protonowego rezonansu jądrowego (^1H NMR)
identyfikacja typu protonów na podstawie przesunięć chemicznych, stosunku intensywności grup sygnałów, rozszczepień spinowo-spinowych.
3. Widma węglowego rezonansu jądrowego (^{13}C NMR)
identyfikacja sygnałów na podstawie przesunięcia chemicznego atomów węgla, oraz porównania z widmami zapisanymi w technice *off-resonance*
4. Porównanie widm IR i NMR z literaturą.

Literatura - [11] - [16]

INSTRUKCJA OPISU ĆWICZEŃ

Ćwiczenie 1.

Opis musi zawierać: cel, wykonane reakcje ze schematami, obserwacje i wyniki, wnioski.

Ćwiczenie 2

Cel : Identyfikacja związku organicznego

Tok analizy, obserwacje:

1. Wygląd substancji.....

2. Temp. topnienia lub wrzenia..... $^{\circ}\text{C}$

3. Skład pierwiastkowy: C, H,.....

4. Grupa rozpuszczalności:

H_2O :.....; Eter:.....; NaOH :.....; NaHCO_3 :.....; HCl :.....; H_2SO_4 stęż.:.....; H_3PO_4 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:..... $^{\circ}\text{C}$

7. Dane literaturowe. Nazwa i wzór zidentyfikowanej substancji.

Ćwiczenie 3

Cel: Identyfikacja mieszaniny dwóch związków organicznych:

Tok analizy:

1. Stan fizyczny mieszaniny:.....

2. Sposób rozdzielania (opis z uwzględnieniem schematów reakcji):

.....

3. Charakter kwasowo-zasadowy rozdzielonych substancji:

A:.....

B:.....

4. Temperatura topnienia(wrzenia):

A:..... °C..

B:..... °C.

5. Grupa rozpuszczalności:

A:.....

B:.....

6. Reakcje charakterystyczne (opis i schematy reakcji prób pozytywnych):

A:.....

B:.....

Klasy związków odpowiadające charakterystyce:

A:.....

B:.....

7. Wybór i wykonanie pochodnych krystalicznych - równania reakcji:

.....

A:.....

B:.....

Temp. topnienia pochodnych:

A:..... °C..

B:..... °C.

8. Dane literaturowe. Nazwy i wzory substancji A i B

A:.....

B:.....

Ćwiczenie 4.

Opis musi obejmować cel ćwiczenia, opracowane warunki rozdziału chromatograficznego, wynik tego rozdziału (wartości R_f i przyporządkowanie substancjom wzorcowym), przedstawienie wykonanych reakcji testowych (ze schematami) pozwalających na określenie właściwości chemicznych i rodzaju grup funkcyjnych, oznaczenie stałych fizykochemicznych, porównanie wyników z danymi literaturowymi, określenie prawdopodobnej struktury badanych związków.

Ćwiczenie 5.

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

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

Ćwiczenie 6.

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 poszczególnych frakcji a widmami barwników roślinnych pokazanymi w literaturze.

Ćwiczenie 7.

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

W dyskusji wyników porównać metodę chemiczną i chromatograficzną do identyfikacji śladowych ilości substancji będącej zanieczyszczeniem leku.

Ćwiczenie 8.

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

Ćwiczenie 9.

Analiza widm badanych substancji (składniki mieszaniny z ćwiczenia 2 oraz 3):

- a) IR - określenie rodzaju grup funkcyjnych na podstawie położenia pasm absorpcji drgań wiązań
- b) ^1H NMR - określenie rodzaju i liczby równocennych protonów na podstawie wartości przesunięć chemicznych i analizy multipletów w widmach
- c) ^{13}C NMR - określenie liczby i rodzaju atomów węgla na podstawie wartości przesunięć chemicznych
- d) obliczenie dla wskazanego związku przesunięć chemicznych protonów lub atomów węgla według reguł addytywności.

WYMAGANIA DO SPRAWDZIANÓW WEJŚCIOWYCH

Sprawdzian 1

IDENTYFIKACJA ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH METODAMI KLASYCZNYMI

A. 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.

B. 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 rzędowność, reakcja z kwasem azotowym(III), redukcja.
5. Aminy - wykrywanie charakteru zasadowego, rozróżnianie rzędowności (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 rzędowności (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. Nityle - hydroliza.
14. Chlorowcopochodne - 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.

C Krystaliczne pochodne służące do identyfikacji związków organicznych:

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

Sprawdzian 2

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 przeciwprądowej
 - b) ekstrakcja czynnymi chemicznie rozpuszczalnikami (wykorzystanie reaktywności grupowej, np. rozdział związków obojętnych kwaśnych słabo zasadowych itp.).
3. Destylacja prosta lub frakcyjna - efektywność rozdziału w zależności od różnic w wartościach temperatur wrzenia. Mieszaniny azeotropowe.
4. Destylacja z parą wodną - zasady tej metody, możliwości zastosowania.

Sprawdzian 3

CHROMATOGRAFICZNE METODY ROZDZIELANIA MIESZANIN ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH. IDENTYFIKACJA ZWIĄZKÓW METODĄ CHROMATOGRAFII

1. Chromatografia - podstawy fizykochemiczne:
 - a) ogólne podstawy fizyczne chromatografii adsorpcyjnej, podziałowej oraz jonowymiennej;
 - b) podstawy fizyczne chromatografii adsorpcyjnej, stosowane adsorbenty i ich aktywność; szereg eluotropowy rozpuszczalników
 - c) podstawy fizyczne chromatografii podziałowej; faza ruchoma, faza 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 oraz 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
- c) Wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa - rodzaje wypełnień, rozmiary kolumn, warunki dobrej pracy kolumny.
- d) Dobór rodzaju chromatografii do oznaczenia określonego związku organicznego.

Sprawdzian 5

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

Wpływ budowy związku organicznego na widmo UV/Vis

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

ZALECANA LITERATURA

1. K. Bańkowski, A. Krawczyk, R. Siciński, J. Stepiński, 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. Walczyna, 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. Krackowski, 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. eter, 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 wody 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 gazów, wody i prądu.
12. **Każdy student obowiązany jest stosować się do regulaminu pracowni.**