

CZĘŚĆ A: ANALIZA SUBSTANCJI ORGANICZNYCH

WSTĘP

A1. KRYSTALIZACJA

- A.1.1. Dobór właściwego rozpuszczalnika do krystalizacji.
- A.1.2. Identyfikacja oczyszczonego związku.

A.2. OZNACZANIE STAŁYCH FIZYCZNYCH ORAZ USTALANIE SKŁADU PIERWIASTKOWEGO ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH

A.3. CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA (TLC)

- A.3.1. TLC barwników roślinnych.
- A.3.2. TLC barwników organicznych.

A.4. GRUPOWE REAKCJE CHARAKTERYSTYCZNE ZWIĄZKÓW KARBONYLOWYCH

- A.4.1. Reakcje charakterystyczne dla aldehydów i ketonów.
- A.4.2. Reakcje charakterystyczne dla aldehydów.
- A.4.3. Reakcje charakterystyczne dla ketonów.

A.5. IDENTYFIKACJA SUBSTANCJI ORGANICZNYCH POPRZECZ POCHODNE KRYSTALICZNE

- A.5.1. Osazony cukrów
- A.5.2. Semikarbazony związków karbonylowych

A.6. DESTYLACJA I EKSTRAKCJA

- A.6.1. Olejek goździkowy
- A.6.2. Olejek anyżowy
- A.6.3. Kofeina z herbaty
- A.6.4. Trigliceryd trimirystyna z gałki muskatołowej

WSTĘP

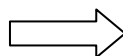
Zagadnienia analityczne obejmują problemy jakościowe (rozdział mieszanin, oczyszczanie związków organicznych, wyznaczanie ich stałych fizycznych, ustalanie składu jakościowego i wreszcie szeroko pojętej struktury, a także identyfikacja związków znanych) oraz ilościowe (np. wyznaczanie wzoru cząsteczkowego i masy cząsteczkowej). Należy jednak pamiętać, że w codziennej praktyce analitycznej stosuje się powszechnie do ustalania struktury związków metody spektroskopowe takie jak widma w podczerwieni (IR), widma w nadfiolecie i świetle widzialnym (UV-VIS), magnetyczny rezonans jądrowy (NMR) i spektrometria masowa (MS)).

Identyfikacja związków może dotyczyć substancji znanych i opisanych w literaturze lub też nowych połączeń otrzymanych na drodze syntezy lub wyosobnionych z materiału naturalnego. W obu przypadkach sposób postępowania w klasycznej analizie jakościowej jest identyczny i obejmuje:

- ustalenie czystości związku,
- oznaczenie temperatury topnienia ciała stałego lub temperatury wrzenia cieczy,
- ustalenie zawartości poszczególnych pierwiastków w związku,
- oznaczenie tzw. grupy rozpuszczalności związku co pozwala na przyporządkowanie związku do grupy o określonych właściwościach chemicznych,
- identyfikację grup funkcyjnych w związkach za pomocą reakcji charakterystycznych,
- otrzymanie pochodnych krystalicznych danego związku, co pozwala na jego ostateczną identyfikację, jeśli jest to związek znany.

Pełny tok analizy związku organicznego jest pracochłonny i wymaga wielu godzin eksperymentowania, stąd też niniejsze ćwiczenia traktują tylko przykładowo poszczególne etapy analizy, posługując się materiałem i procesami, które mogą być interesujące dla studentów biologii, biologii molekularnej i biotechnologii.

A jak wytłumaczyć zamieszczenie w części analitycznej ćwiczeń z izolacji substancji z materiału roślinnego? Jeżeli przez materiał roślinny rozumie się skomplikowaną mieszaninę związków chemicznych, w tym oligomerów i polimerów, to rozdział tej złożonej mieszaniny w celu wydobywania jednego lub kilku związków jest też analizą (z greckiego: *análysis* – rozbiór, rozkład złożonej całości na składniki).



[DO SPISU TREŚCI](#)

A.1. KRYSTALIZACJA

(Szczegółowe zasady postępowania omówione są w rozdziale V.1. KRYSTALIZACJA
w zasadniczej części skryptu)

Celem części A.1.1. niniejszego ćwiczenia jest dobór odpowiedniego rozpuszczalnika do krystalizacji nieznanego związku, a następnie jego oczyszczenie przez krystalizację.

Część A.1.2. niniejszego ćwiczenia obejmuje identyfikację otrzymanego do analizy związku na podstawie porównania oznaczonej temperatury topnienia z danymi umieszczonymi w Tabeli 1 (analizowana substancja znajduje się w tym spisie związków) oraz wyników „prób mieszania” wykonanych kolejno ze wszystkimi związkami o zbliżonych temperaturach topnienia.

Część doświadczalna

Odczynniki:

[etanol](#)

[toluen](#)

[eter naftowy \(tw. 60 - 90 °C\)](#)

[aceton](#)

[octant etylu](#)

Sprzęt laboratoryjny:

6 probówek

kolba okrągłodenna 100 cm³

chłodnica zwrotna wodna

lejek szklany

kolba stożkowa 100 cm³

lejek Büchnera

kolba ssawkowa

płaszcz grzejny

pipety

kapilary

UWAGA: Praca z odczynnikami toksycznymi i drażniącymi. Obowiązują rękawice ochronne i praca pod wyciągiem!

A.1.1. Dobór właściwego rozpuszczalnika do krystalizacji.

Próbki badanego związku umieszcza się w sześciu kolejnych oznaczonych probówkach (w każdej po ok. 30 mg substancji) i dodaje się do probówek po 1 cm³ każdego z rozpuszczalników, czyli wody, etanolu, toluenu, eteru naftowego, acetonu i octanu etylu. Wszystkie probówki wstrząsa się i obserwuje rozpuszczalność związku. Eliminuje się te rozpuszczalniki, w których związek rozpuszcza się całkowicie już w temperaturze pokojowej. Pozostałe probówki ogrzewa się ostrożnie w płaszczu grzejnym tak, aby doprowadzić roztwory do wrzenia. Probówki, w których nastąpiło całkowite rozpuszczenie się osadu, odstawia się na 15 minut do ochłodzenia i obserwuje, czy powstają kryształy substancji rozpuszczonej. Do probówek, w których osady w temperaturze wrzenia roztworu nie rozpuściły się, dodaje się stopniowo odpowiedni rozpuszczalnik aż do objętości ok. 3 cm³ i ponownie ogrzewa do wrzenia. Eliminuje się te rozpuszczalniki, w których próbka nadal nie uległa rozpuszczeniu. Pozostałe probówki z klarownymi roztworami odstawia się na 15 minut do krystalizacji w temperaturze pokojowej. Obserwuje się narastanie kryształów i na podstawie wyników eksperymentalnych wybiera się najbardziej odpowiedni rozpuszczalnik.¹

Pozostałą po doborze rozpuszczalnika substancję waży się, a następnie przeprowadza krystalizację całej ilości związku z uprzednio dobranego rozpuszczalnika. Niezbędną ilość rozpuszczalnika można oszacować na podstawie wyników prób doboru rozpuszczalnika, stosując odpowiednią proporcję. Przykładowo, jeżeli 30 mg próbki rozpuściło się na gorąco w

¹ Pozostałe po doborze rozpuszczalnika roztwory umieszcza się w odpowiednich pojemnikach: toluen, eter naftowy, octan etylu i etanol w pojemniku O, roztwór acetonowy oraz wodny w pojemniku A.

1 cm³ wody, to można oczekiwać, że do krystalizacji 1 g próbki będzie należało użyć 33 cm³ wody. Nie należy jednak dodawać od razu całej ilości rozpuszczalnika, lecz rozpocząć od wprowadzenia ok. 1/3 oszacowanej ilości, czyli w omawianym przypadku ok. 10 cm³ wody. Możliwe jest jednak, że efektywna krystalizacja będzie wymagała użycia znacznie większej ilości rozpuszczalnika, niż wynikało to z szacunków. Kolba, w której będzie ogrzewany roztwór, powinna zatem pomieścić objętość roztworu nawet dwukrotnie większą od oszacowanej.

Kolejne etapy ćwiczenia, czyli rozpuszczanie badanej próbki we wrzącym rozpuszczalniku w kolbie okrągłodennej pod chłodnicą zwrotną, sączenie gorącego roztworu przez sączeek fałdowany, pozostawienie roztworu do krystalizacji i odsączenie wydzielonego osadu na lejku Büchnera należy wykonywać zgodnie z opisem podanym w rozdziale *Krystalizacja*. Przesącze po krystalizacji należy pozostawić do czasu uzyskania pewności, że wydajność krystalizacji jest zadowalająca.¹

Oczyszczoną i wysuszoną substancję waży się i ponownie oznacza temperaturę topnienia. Próbki pozostawiane do wysuszenia należy koniecznie opisać symbolem próbki i swoim nazwiskiem! Gdy istnieje podejrzenie, że próbka nadal jest zanieczyszczona (topnienie zachodzi w szerokim przedziale temperatury lub w temperaturze niższej niż przed krystalizacją), należy ponownie przeprowadzić krystalizację. Jeżeli można uznać, że próbka jest czysta, oblicza się wydajność procesu krystalizacji.

A.1.2. Identyfikacja oczyszczonego związku.

Spośród związków podanych w Tabeli 1 wybiera się substancje o temperaturach topnienia zbliżonych do badanej próbki i wykonuje się z nimi próby mieszania. Jednakowe ilości badanego związku i wzorca miesza się i **dokładnie rozciera**, a następnie oznacza temperaturę topnienia. W oparciu o wyniki prób mieszania dokonuje się identyfikacji analizowanej próbki.

¹ Niepotrzebne przesącze umieszcza się w odpowiednich pojemnikach: etanolu, toluenu, eteru naftowego i octanu etylu w pojemniku **O**, roztwór acetonowy w pojemniku **A**. Sposób postępowania z roztworami wodnymi należy uzgodnić z prowadzącym ćwiczenie. Sączki należy umieścić w pojemniku **P**.

TABELA 1: Analizowane związki organiczne uszeregowane według rosnącej temperatury topnienia.

L.p.	Nazwa związku	Tt. [°C]
1	Bifenyl	70
2	2-Nitroanilina	71
3	1,3-Dinitrobenzen	90
4	Benzylidenoazyna	92
5	Benzoesan 2-naftyłu	110
6	Acetanilid	114
7	3-Nitroanilina	114
8	4-Nitrofenol	114
9	Kwas benzoesowy	122
10	2-Naftol	123
11	Kwas cynamonowy	133
12	Benzoina	137
13	Kwas 2-chlorobenzoesowy	139
14	Kwas 3-nitrobenzoesowy	141
15	Kwas antranilowy	144 – 6
16	4-Nitroanilina	147
17	Kwas salicylowy	159
18	Benzanilid	163
19	Benzimidazol	171 - 2
20	1-Jodo-4-nitrobenzen	171
21	Kwas 4-aminobenzoesowy	186 – 7
22	Benzoiloglicyna	187

Zadania:

1. Narysuj wzór strukturalny substancji zidentyfikowanej w części **A.1.2.** ćwiczenia.
2. Niekiedy podczas krystalizacji dodaje się do roztworu oczyszczanej substancji węgla aktywnego. Wyłumacz, czemu służy ta operacja. Wyjaśnij, dlaczego nie wolno dodawać węgla do gorącego roztworu substancji oczyszczanej.
3. Czy w celu uzyskania dużych, dobrze wykształconych kryształów należy gorący roztwór chłodzić szybko, czy też powoli? Czy uzyskanie dużych kryształów zawsze gwarantuje ich czystość?

Sprawozdanie z ĆWICZENIA A.1. powinno zawierać następujące dane:

1. Cel ćwiczenia:
2. Temperatura topnienia związku otrzymanego do krystalizacji:
3. Masa związku przeznaczonego do krystalizacji:
4. Próby rozpuszczalności związku:

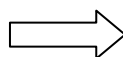
Rozpuszczalnik	Rozpuszczalność na zimno	Rozpuszczalność na gorąco	Rozpuszczalność po dodaniu rozpuszczalnika i ponownym ogrzaniu
Woda			
Etanol			
Toluen			
Eter naftowy			
Aceton			
Octan etylu			

Legenda: R – rozpuszczalny; X - brak rozpuszczalności.

5. Wnioski z doboru rozpuszczalnika:
6. Masa kryształów otrzymanych po krystalizacji:
7. Obliczenie wydajności procesu:
8. Próby mieszania:

Związek dodany do substancji badanej	Temperatura topnienia mieszaniny

9. Substancja zidentyfikowana:
10. Wnioski końcowe i odpowiedzi do zadań umieszczonych na końcu ćwiczenia:



[DO SPISU TREŚCI](#)

A.2. OZNACZANIE STAŁYCH FIZYCZNYCH ORAZ USTALANIE SKŁADU PIERWIASTKOWEGO ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH

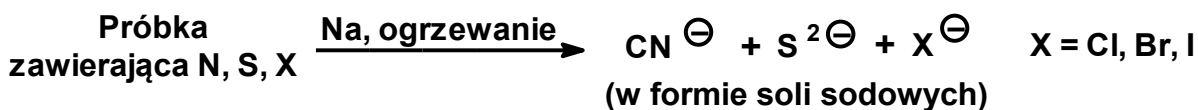
Mając do czynienia z nieznaną substancją, należy sprawdzić, czy jest to substancja organiczna. W tym celu spala się niewielką ilość badanego związku na szpatułce metalowej w płomieniu palnika. Już sama palność związku z wytworzeniem produktów gazowych (głównie CO₂ i para wodna) świadczy o jego organicznej naturze. Natomiast po spaleniu związków nieorganicznych pozostaje popiół tlenków. Należy pamiętać, że sole związków organicznych również pozostawiają na szpatułce osad, świadczący o obecności metalu w związku. Doświadczonemu chemikowi obserwacja procesu spalania może dostarczyć wielu cennych informacji. I tak np. substancje o dużej zawartości węgla w stosunku do wodoru (węglowodory aromatyczne) barwią płomień na kolor żółtopomarańczowy i wydzielają w trakcie spalania sadzę, natomiast pochodne węglowodorów alifatycznych, zwłaszcza zawierające tlen, powodują niebieskie zabarwienie płomienia.

Aby scharakteryzować daną substancję organiczną, należy oznaczyć jej stałe fizyczne, a więc temperaturę topnienia ciał stałych oraz temperaturę wrzenia dla cieczy (patrz rozdział *Oznaczanie stałych fizycznych* w zasadniczej części skryptu). Należy też zwrócić uwagę na wygląd substancji oraz jej barwę. Substancję można bardzo ostrożnie powąchać, kierując jej pary dłonią w kierunku nosa. Natomiast **zakazane jest sprawdzanie smaku substancji analizowanej**.

Dalszy krok w analizie związku organicznego stanowi oznaczenie zawartości pierwiastków najczęściej występujących w związkach organicznych obok węgla i wodoru, a więc fluorowców (chloru, bromu lub jodu), azotu i siarki.

Fluorowce najprościej jest wykryć w tzw. próbie Beilsteina, która polega na spalaniu niewielkiej ilości badanego związku na siatce miedzianej. Związki organiczne zawierające fluorowce ogrzewane z tlenkiem miedzi(II) tworzą, z wyjątkiem fluoru lotne halogenki miedzi, które barwią płomień na zielono lub niebiesko-zielono. Fluorek miedzi(II) również tworzy się w takiej próbie, nie jest jednak lotny. Zabarwienie płomienia wykazują także inne związki (między innymi tiomocznik, cyjanki, tiocyjaniany niektóre pochodne pirydyny i puryny), ma więc ona znaczenie jedynie orientacyjne. **Należy pamiętać, że w próbie Beilsteina mogą się tworzyć bardzo toksyczne i odporne termicznie związki z grupy halogenopochodnych dibenzodioksyn lub dibenzofuranów; próbę, jako bardzo czułą, należy więc wykonać dla niewielkiej ilości badanej substancji pod sprawnie działającym wyciągiem**

W próbie Beilsteina nie można jednak wykryć rodzaju fluorowca. Aby to ustalić, należy dokonać rozkładu badanej substancji w procesie stapiania próbki z metalicznym sodem, co pozwala także na wykrycie azotu i siarki. Wszystkie te pierwiastki zawarte w związku organicznym w trakcie jego degradacji termicznej z udziałem sodu zostają przeprowadzone w związki jonowe, których wykrycie za pomocą czułych reakcji z odczynnikami nieorganicznymi nie jest skomplikowane.



Część doświadczalna

Odczynniki:

[sód metaliczny](#)
[pentacyjanonitrozyłóżelazian\(III\) sodu](#)
[\(nitroprusydek sodu\)](#)
[siarczan\(VI\) żelaza\(II\)](#)
[kwas siarkowy\(VI\) \(10%\)](#)
[kwas azotowy\(V\) \(10%\)](#)
[azotan\(V\) srebra \(1%\)](#)
[amoniak stęż.](#)
[chloroform](#)
[manganian\(VII\) potasu](#)

Sprzęt laboratoryjny:

fiolki szklane
szpatułka metalowa
parownicza
szczytce
próbówki
siatka miedziana
palnik gazowy
termometr

UWAGA: Praca z odczynnikami toksycznymi i żrącymi. Obowiązują rękawice ochronne i praca pod wyciągiem! Szczególną ostrożność należy zachować podczas pracy z metalicznym sodem!

Dla otrzymanych do analizy dwu próbek (ciecz i ciało stałe) należy wykonać następujące badania:

- sprawdzić, czy badany związek jest substancją organiczną (przez spalanie na szpatułce),
- oznaczyć temperaturę topnienia dla ciała stałego, a dla cieczy temperaturę wrzenia,
- wykonać stapianie z sodem metalicznym oraz próby na obecność siarki, azotu i fluorowców.

Próba Beilsteina na fluorowce

Na wyprażoną w płomieniu i ochłodzoną siatkę miedzianą wprowadza się odrobinę substancji badanej, po czym ogrzewa się siatkę w płomieniu palnika. Zielononiebieskie zabarwienie wskazuje na obecność fluorowca.

Stapianie z sodem

Do szklanej fiolki wprowadza się mały kawałek metalicznego sodu, a następnie odrobinę badanej substancji (kilka kryształków lub 2-3 krople). Fiolkę trzymaną przy pomocy metalowych szczytce wprowadza się do płomienia palnika i bardzo ostrożnie ogrzewa aż do stopienia sodu, a następnie ogrzewa się mocno jej dno do czerwonego żaru i gorącą fiolkę wrzuca do parowniczk z 5 - 10 cm³ wody destylowanej. (**Uwaga:** nadmiar użytej wody zmniejsza stężenie badanych jonów w roztworze, co może prowadzić do błędnych wyników analizy). Jeśli fiolka nie pęknie, rozbija się ją szklanym pręcikiem. Płyn z parowniczk sący się, a bezbarwny przesącz wykorzystuje się do dalszych prób. Jeśli przesącz jest żółty lub brunatny, próbę stapiania należy powtórzyć, gdyż rozkład związku nie był całkowity. Dla szczególnie lotnych związków można dodać do fiolki przed stopieniem substancji z sodem niewielką ilość cukru.

Próba na siarkę

Do około 1 cm³ badanego alkalicznego przesączu dodaje się 4 - 5 kropli rozcieńczonego 0,1% wodnego, świeżo przygotowanego roztworu nitroprusydku sodu Na₂[Fe(CN)₅NO]. Krótkotrwałe pojawienie się intensywnego, ciemnopurpurowego zabarwienia związku kompleksowego Na₄[Fe(CN)₅NOS] wskazuje na zawartość siarki w badanej próbce.¹

Próba Lassaigne'a na azot

¹ Zawartość próbówki umieszcza się w pojemniku **W-Z**.

Około 3 cm³ silnie alkalicznego przesącza ogrzewa się do wrzenia z kryształkiem siarczanu(VI) żelaza(II). Początkowo wytrąca się wodorotlenek żelaza(II), który w trakcie ogrzewania na powietrzu ulega częściowemu utlenieniu do związków żelaza(III). Po ochłodzeniu dodaje się rozcieńczonego kwasu siarkowego(VI) do odczynu kwaśnego (kontrola przy pomocy papierka wskaźnikowego). Jeśli substancja zawiera azot, to występuje zielononiebieskie zabarwienie roztworu, a po dłuższym odstaniu wydziela się osad błękitu pruskiego (heksacyjanożelazianu(II) żelaza(III)) Fe₄[Fe(CN)₆]₃¹.

Próba na fluorowce

Jeśli badana substancja nie zawiera ani azotu, ani siarki, to 2 cm³ alkalicznego przesącza zakwasza się rozcieńczonym kwasem azotowym(V) i dodaje się kilka kropli 1% roztworu azotanu(V) srebra. Powstanie białego lub żółtego osadu wskazuje na zawartość chloru, bromu lub jodu. Jeśli substancja zawiera azot lub siarkę, to 2 cm³ badanego przesącza po zakwaszeniu rozcieńczonym kwasem azotowym(V) ogrzewa się do wrzenia przez kilka minut dla odpędzenia siarkowodoru lub cyjanowodoru. Po zagęszczeniu do połowy objętości i uzupełnieniu wodą destylowaną do pierwotnej objętości wykonuje się próbę z azotanem(V) srebra.

Ustalanie rodzaju fluorowca

Otrzymany w próbie na fluorowce osad halogenku srebra, po zdekantowaniu płynu, zadaje się niewielką objętością stężonego amoniaku. Rozpuszczenie się osadu AgX wskazuje na obecność chloru. Jeśli osad jest jasnożółty i rozpuszcza się tylko częściowo, oznacza to, że substancja zawiera brom. Osad żółty i zupełnie nierozpuszczalny w amoniaku wskazuje na zawartość jodu. W praktyce zdarza się, że zamiast wyraźnego osadu pojawia się niewielka ilość rozproszanego koloidalnego osadu, wtedy objętość dodawanego amoniaku powinna być znikoma, a rozpoznanie fluorowca jest szczególnie trudne.²

Rodzaj obecnego w próbce fluorowca można też ustalić stosując reakcje redoksowe. Opiera się to na fakcie, że bardziej aktywny chlor wypiera brom i jod z ich związków. W celu przeprowadzenia takiej próby 1–2 cm³ roztworu po stopieniu z sodem zakwasza się rozcieńczonym kwasem siarkowym, ochładza i dodaje 1 cm³ chloroformu. Następnie przygotowuje się roztwór 5% kwasu chlorowodorowego z dodatkiem kilku kryształków KMnO₄. Stanowi on ekwiwalent wody chlorowej (jony chlorkowe zostają utlenione manganianem(VII) potasu do wolnego chloru). Roztwór ten dodaje się kroplami do badanej próbki przy energicznym mieszaniu. Warstwa organiczna może pozostać bezbarwna, co wskazuje na obecność chloru w próbce, może przyjąć barwę brunatną lub czerwono-brunatną, co wskazuje na obecność bromu w próbce, lub może przyjąć barwę fioletową, co wskazuje na obecność jodu w próbce. Ta ostatnia barwa zanika po dodaniu nadmiaru wody chlorowej, gdyż dalsze utlenianie jodu daje bezbarwny jodan.³

Zadania:

1. Dlaczego siatkę miedzianą przed wykonaniem próby Beilsteina należy dobrze wyprażyć?
2. Napisz ciąg reakcji prowadzących do otrzymywania błękitu pruskiego w próbie Lassaigne'a.

¹ Zawartość próbki umieszcza się w pojemniku **W-K**.

² Zawartość próbki przed dodaniem amoniaku (w razie braku fluorowców) umieszcza się w pojemniku **W-K**, a po ewentualnym dodaniu amoniaku w pojemniku **W-Z**.

³ Zawartość próbki umieszcza się w pojemniku **O**.

Sprawozdanie z ĆWICZENIA A.2. powinno zawierać następujące dane:

1. Cel ćwiczenia:
2. Tabela z wynikami obserwacji i pomiarów:

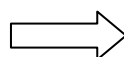
	Substancja stała	Substancja ciekła
Ogólna charakterystyka substancji		
Temperatura topnienia		
Temperatura wrzenia		
Próba na azot		
Próba na siarkę		
Próba Beilsteina na fluorowce		
Próba na fluorowce z AgNO_3		
Ustalenie rodzaju fluorowca w próbie z AgNO_3		
Ustalenie rodzaju fluorowca w próbie z wodą chlorową		

3. Wnioski końcowe dotyczące składu substancji:

Substancja stała:

Substancja ciekła:

4. Odpowiedzi do zadań umieszczonych na końcu ćwiczenia:



[DO SPISU TREŚCI](#)

A.3. CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA (TLC):

ROZDZIAŁ I IDENTYFIKACJA SUBSTANCJI ORGANICZNYCH

(Szczegółowe zasady postępowania omówione są w rozdziale V.5. CHROMATOGRAFIA w zasadniczej części skryptu)

Celem niniejszego ćwiczenia jest zapoznanie się z tą metodą na trzech przykładach: rozdziału i identyfikacji na podstawie wartości współczynników R_f , barwników roślinnych ([A.3.1.](#)) lub barwników organicznych ([A.3.2.](#)).

A.3.1. TLC barwników roślinnych.

Celem ćwiczenia jest potwierdzenie przydatności chromatografii cienkowarstwowej do rozdziału i identyfikacji barwników roślinnych zawartych w świeżych liściach. Barwniki roślinne odgrywają poważną rolę w metabolizmie organizmów żywych. Najważniejsze z nich to karotenoidy (wśród nich żółte węglowodory zbudowane z jednostek izoprenowych, czyli α -, β - i γ -karoteny oraz ksantofile, będące ich żółtymi analogami ketonowymi lub wodorotlenowymi) oraz zielone barwniki porfiryne skompleksowane z magnezem, czyli chlorofil A (niebieskozielony) i chlorofil B (żółtozielony).

Część doświadczalna

Odczynniki:

płytki TLC pokryte SiO_2
[toluen](#)
[etanol bezw.](#)
[aceton](#)
[eter naftowy \(tw. 40 - 60 °C\)](#)

Sprzęt laboratoryjny:

komora chromatograficzna
pęseta
kapilary
małe probówki
moździerz
pipeta Pasteura

Przygotowanie próbek

Kilka listków (lekko zwiędniętych) pietruszki, selera, szczawiu, roszponki, mniszka lub innej rośliny nie zawierającej zbyt wiele wody myje się, osusza (np. ręcznikiem papierowym) i rozdrabnia w moździerzu z dodatkiem niewielkiej ilości suchego piasku. Do otrzymanej papki dodaje się po ok. 2 ml acetonu i eteru naftowego i ponownie uciera. Ekstrakt wciąga się przez watkę do pipetki Pasteura i przenosi do mikroprobówki. Ciecz rozdziela się na dwie fazy: dolną zabarwioną na żółto, zawierającą dużo wody oraz górną, organiczną o ciemnozielonej barwie. Warstwy rozdziela się dokładnie, wciągając do pipetki Pasteura górną, zieloną warstwę, którą następnie umieszcza się w małej fiolce i poddaje analizie chromatograficznej.

Wykonanie oznaczenia

Próbkę badanego ekstraktu nanosi się kilkakrotnie przy pomocy bardzo cienkiej kapilary na skrawek bibuły. Po uzyskaniu odpowiedniej wprawy (plamki powinny mieć małą średnicę i intensywną barwę), nanosi się zielony roztwór na płytkę w miejscu zaznaczonej ołówkiem linii startu. Przygotowuje się komorę do rozwijania chromatogramu. Może to być zamykany słoik wyłożony bibułą, zawierający eluent, czyli mieszaninę eteru naftowego, toluenu i bezw. etanolu w stosunku 8:3:2. Następnie umieszcza się płytkę w komorze i rozwija chromatogram. Gdy czoło eluenta znajduje się w odległości 0,5 - 1 cm od górnej

krawędzi płytki, należy ją wyjąć pęsetką, a przy pomocy ołówka zaznaczyć czoło rozpuszczalnika oraz obrysować poszczególne plamki. Po wysuszeniu płytki obliczyć R_f dla poszczególnych plamek. Wiedząc, że w tych warunkach wartości R_f wynoszą odpowiednio: β -karoten: 0,80 - 0,90; chlorofil A: 0,65 - 0,70; chlorofil B: 0,60 - 0,65; ksantofile: 0,55 - 0,60 należy zidentyfikować barwniki w badanej roślinie.

Uwaga: Na chromatogramie mogą pojawić się barwne plamy produktów degradacji chlorofili, szczególnie gdy roślina była zwiędnięta, wysuszona lub zamrożona. Uzyskane wartości R_f mogą się nieco różnić od podanych powyżej, gdyż zależą one bardzo silnie od składu eluenta i aktywności nośnika. Nigdy nie ma pewności, że dwa eksperymenty zostały wykonane przy zachowaniu identycznych warunków.

A.3.2. TLC barwników organicznych.

Celem ćwiczenia jest wykrycie, które z wzorcowych barwników organicznych (eozyna, fluoresceina, czerwień metylowa, oranż 2-naftolowy, 1-fenyloazo-2-naftol – zwany też Sudanem I) znajdują się w mieszaninie otrzymanej do analizy.

Część doświadczalna

Odczynniki:

płytki do TLC pokryta SiO_2

mieszanina [toluenu](#) z [acetonem](#) w stosunku 3 : 1

roztwory barwników o stęż. ok. 0,1 % w toluenie lub etanolu:

[eozyna](#), [oranż 2-naftolowy](#),

[fluoresceina](#), [czerwień metylowa](#)

[1-fenyloazo-2-naftol \(Sudan I\)](#)

Sprzęt laboratoryjny:

komora chromatograficzna

pęseta

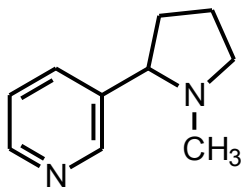
kapilary

Wykonanie oznaczenia

Na gotową płytkę pokrytą żelem krzemionkowym nanosi się kapilarą roztwory pięciu wzorców oraz badaną próbkę. Następnie umieszcza się płytkę w komorze zawierającej eluent, czyli mieszaninę toluenu i acetonu w stosunku 3:1 i rozwija chromatogram. Gdy czoło rozpuszczalnika znajdzie się w odległości 0,5 - 1 cm od górnej krawędzi płytki, należy ją wyjąć przy pomocy pęsety, zaznaczyć ołówkiem czoło rozpuszczalnika i po wysuszeniu obliczyć wartości R_f dla poszczególnych plamek. Na podstawie obliczonych wartości R_f oraz barwy plamek należy określić skład badanej próbki.

Zadania:

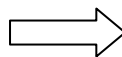
1. Narysuj wzór strukturalny β -karotenu oraz innego karotenoidu, występującego na przykład w pomidorach, likopenu.
2. Narysuj wzór strukturalny oranżu 2-naftolowego. Zaproponuj kilkietapową syntezę tego barwnika z 2-naftolu i benzenu.
3. Alkaloid nikotynę chromatografowano na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym. Rozpuszczalnik przebył drogę 8 cm. W układzie rozwijającym chloroform/metanol/amoniak substancja przebyła 6,3 cm, natomiast w układzie rozwijającym chloroform/metanol/kwas octowy droga przebyta przez substancję wyniosła zaledwie 0,6 cm. Oblicz współczynniki R_f i wyjaśnij to zjawisko. Odpowiadając na to pytanie pamiętaj o charakterze zasadowym alkaloidu i o ewentualnej możliwości jego reakcji z którymś ze składników eluenta.



nikotyna

Sprawozdanie z ĆWICZENIA A.3. powinno zawierać następujące dane:

1. Cel ćwiczenia:
2. Opis sposobu przygotowania materiału roślinnego do chromatografii oraz warunków wykonania chromatogramów:
3. Dołączone chromatogramy z obliczonymi wartościami R_f dla ćwiczeń A.3.1. i A.3.2. oraz interpretację tych wyników:
4. Odpowiedzi do zadań umieszczonych na końcu ćwiczenia:



[DO SPISU TREŚCI](#)

A.4. GRUPOWE REAKCJE CHARAKTERYSTYCZNE ZWIĄZKÓW KARBONYLOWYCH

Reakcje grupowe to testowe, stosunkowo szybkie i łatwe do przeprowadzenia w skali półmikro reakcje charakterystyczne dla grup funkcyjnych występujących w związkach organicznych. Ich pozytywny rezultat pozwala ustalić strukturę badanego nieznanego związku. Niniejsze ćwiczenie stanowi przykład zastosowania reakcji grupowych do badania aldehydów i ketonów. Niektóre z tych reakcji są charakterystyczne dla obydwu klas związków, inne pozwalają na ich rozróżnienie i mają charakter wybiórczy. Celem ćwiczenia jest przeprowadzenie odpowiednich testów i określenie czy dwie próbki otrzymane do analizy to związki karbonylowe, a jeśli tak, to czy są to aldehydy, czy ketony.

Część doświadczalna

Odczynniki:

[chlorowodorek hydroksyloaminy](#)
[etanol](#)
[oranż metylowy \(1% roztwór w etanolu\)](#)
[wodorotlenek sodu](#)
[kwas chlorowodorowy stężony](#)
[2,4-dinitrofenylohydrazyna \(roztwór w etanolu\)](#)
roztwory Fehlinga I i II
[azotan\(V\) srebra \(1% roztwór\)](#)
[amoniak stężony](#)
[manganian\(VII\) potasu](#)
[wodorotlenek potasu](#)
[1,3-dinitrobenzen](#)
[pentacyjanonitrozyłozelazian\(III\) sodu](#)
[\(nitroprusydek sodu\)](#)
[kwas octowy](#)

Sprzęt laboratoryjny:

probówki
źródło ciepła

UWAGA: Praca z odczynnikami toksycznymi i żrącymi. Obowiązują rękawice ochronne i praca pod wyciągiem!

A.4.1. Reakcje charakterystyczne dla aldehydów i ketonów.

Wykrywanie grupy karbonylowej w próbie z chlorowodorkiem hydroksyloaminy

Tworzeniu oksymu w tej reakcji towarzyszy wydzielanie chlorowodoru, co można wykryć za pomocą wskaźnika.

Niewielką ilość chlorowodoru hydroksyloaminy rozpuszcza się w etanolu i dodaje kilka kropli etanolowego roztworu oranżu metylowego (uzyskany roztwór powinien mieć barwę jasnopomarańczową). Następnie do tej probówki dodaje się kryształek lub kroplę badanej substancji. Zmiana barwy z pomarańczowej na różowoczerwoną wskazuje na obecność grupy karbonylowej. Jeśli nie ma żadnych objawów reakcji, należy probówkę ogrzać do wrzenia. Próba powyższa dotyczy związków o charakterze obojętnym.¹

¹ Zawartość probówek umieszcza się w pojemniku ○

Reakcja związków karbonylowych z 2,4-dinitrofenylohydrazyną

Tworzące się w tej reakcji 2,4-dinitrofenylohydrazony aldehydów i ketonów są słabo rozpuszczalne i wydzielają się szybko po zmieszaniu substratów.

Do 3 cm³ odczynnika - 2,4-dinitrofenylohydrazyny w etanolu - dodaje się 2-3 krople (150 - 200 mg) badanej substancji lub jej roztworu w etanolu. Jeżeli po upływie 10 min wytrąci się żółty krystaliczny osad lub olej krzepnący po pewnym czasie, świadczy to o obecności grupy karbonylowej.¹

A.4.2. Reakcje charakterystyczne dla aldehydów (odróżnienie aldehydu od ketonu).

Reakcja aldehydów z odczynnikiem Fehlinga

Do zmieszanych porcji (po 2,5 cm³) roztworów Fehlinga I i II (I – roztwór wodny siarczanu(VI) miedzi(II), II – roztwór wodny winianu potasowo-sodowego i wodorotlenku sodu) dodaje się 0,1 g badanego związku i ogrzewa do wrzenia. Odbarwienie mieszaniny i osadzenie się na ściankach i dnie probówki ceglasczerwonego osadu tlenku miedzi(I) mogą świadczyć o tym, że badany związek jest aldehydem.²

Uwaga: Tylko niektóre aldehydy reagują z odczynnikiem Fehlinga w sposób jednoznaczny, dlatego też nie należy uważać wyników tej reakcji za decydujące kryterium obecności lub braku grupy –CHO w badanym związku.

Reakcja aldehydów z odczynnikiem Tollensa

W dobrze wymytej probówce umieszcza się 0,5 cm³ 1% roztworu azotanu(V) srebra, 0,5 cm³ 1% roztworu wodnego wodorotlenku sodu i dodaje się kroplami stęż. roztwór amoniaku aż do rozpuszczenia wydzielonego osadu. Do tego roztworu dodaje się parę kropli lub kryształków aldehydu i wstrząsa mieszaninę. Jeżeli aldehyd nie rozpuszcza się w wodzie, to należy dodać jego roztwór w minimalnej ilości etanolu. Po kilku minutach, zwykle jednak dopiero po ogrzaniu do temperatury 50 – 60 °C, na ściankach probówki osadza się tzw. lustro srebrne lub wypada szary, bezpostaciowy osad metalicznego srebra.²

Uwaga: Niektóre ketony (np. cyklopentanon, cykloheksanon i dibenzoil) dają także pozytywny wynik próby Tollensa.

Reakcja aldehydów z manganianem(VII) potasu

Do 0,1 g aldehydu dodaje się kroplami, wstrząsając, 5% roztwór manganianu(VII) potasu aż do uzyskania trwałego zabarwienia. Zmiana barwy z fioletowej na brunatną potwierdza obecność aldehydu (nie jest to reakcja wybiórcza!).³

Brunatna barwa pochodzi od wytrącającego się w formie zawiesiny tlenku manganu(IV), natomiast roztwór odbarwia się, co można zaobserwować pobierając z probówki precyzyjnie kroplę zawiesiny i umieszczając ją na skrawku bibuły.

A.4.3. Reakcje charakterystyczne wykonywane tylko dla ketonów.

Reakcja z 1,3-dinitrobenzenem (wykrywanie ketonów metylowych i metylenowych)

Do niewielkiej ilości alkoholowego roztworu badanej substancji dodaje się kilka kropli etanolowego roztworu 1,3-dinitrobenzenu i kilka kropli 15% wodnego roztworu wodorotlenku potasu. Wystąpienie intensywnego, czerwono-fioletowego zabarwienia świadczy

¹ Zawartość probówek umieszcza się w pojemniku **O**

² Zawartość probówek umieszcza się w pojemniku **W-Z**

³ Zawartość probówek umieszcza się w pojemniku **W-M**.

o obecności w badanej substancji ugrupowania $\text{CH}_3\text{CO}-$ lub $-\text{CH}_2\text{CO}-$ (podobne zachowanie wykazują również niektóre aldehydy).¹

Reakcja Legala (charakterystyczna dla ketonów metylowych i metylenowych)

Alkoholowy roztwór badanego związku (1 – 2 krople) miesza się z dwiema kroplami 5% wodnego roztworu nitroprusydku sodu (świeżo sporządzonego), a następnie po upływie kilku minut alkalizuje się, dodając dwie krople 30% roztworu wodorotlenku sodu. Powstaje brunatnoczerwone zabarwienie, zmieniające się na niebieskie lub czerwone po ostrożnym zakwaszeniu mieszaniny kwasem octowym.²

Zadania:

1. Narysuj wzór strukturalny Lewisa cząsteczki chlorowodoru hydroksyloaminy.
2. Narysuj wzór strukturalny oranżu metylowego – wskaźnika stosowanego w próbie z chlorowodorkiem hydroksyloaminy.
3. Po wykonaniu ćwiczenia zapytaj prowadzącego, jakie związki dostałeś do analizy i napisz ich reakcje z :
 - a) chlorowodorkiem hydroksyloaminy
 - b) 2,4-dinitrofenylohydrazyną
4. Co jest przyczyną odbarwiania się roztworu manganianu(VII) potasu pod wpływem aldehydu? Jakie inne klasy związków dają pozytywną próbę z manganianem(VII) potasu?

Sprawozdanie z ĆWICZENIA A.4. powinno zawierać:

1. Tabela z wynikami obserwacji (np. zmiana barwy, powstawanie osadu itp.):

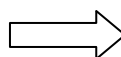
Odczynnik	Próbka I	Próbka II
Chlorowodorek hydroksyloaminy		
2,4-Dinitrofenylohydrazyna		
Odczynnik Fehlinga		
Odczynnik Tollensa		
Manganian(VII) potasu		
1,3-Dinitrobenzen		
Pentacyjanonitrozyłozelazian(III) sodu (nitroprusydek sodu)		

2. Wnioski końcowe dotyczące badanych substancji:

Próbka I:

Próbka II:

3. Odpowiedzi do zadań umieszczonych na końcu ćwiczenia:



¹ Zawartość próbek umieszcza się w pojemniku ○

² Zawartość próbek umieszcza się w pojemniku ○

[DO SPISU TREŚCI](#)

A.5. IDENTYFIKACJA SUBSTANCJI ORGANICZNYCH POPRZEZ POCHODNE KRYSTALICZNE

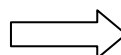
Ostatnim etapem analizy związków organicznych jest otrzymanie i scharakteryzowanie ich pochodnych krystalicznych. Posługując się, w zależności od struktury badanego związku, różnorodnymi reakcjami, można go przeprowadzić w stałą pochodną, a następnie porównać jej właściwości z dostępnymi danymi literaturowymi. Uzyskana zgodność danych jest podstawą rozpoznania związku. Pochodne krystaliczne analizowanych związków powinny być łatwe do otrzymania i oczyszczenia oraz cechować się ostrą temperaturą topnienia. Analiza kształtu i sposobu ułożenia kryształów pochodnej (tak jak w przypadku osazonów) jest przeprowadzana niezwykle rzadko.

W niniejszym ćwiczeniu analiza ta dotyczy identyfikacji cukrów za pomocą właściwości otrzymanych z nich osazonów (A.5.1.) lub identyfikacji związków karbonylowych poprzez ich semikarbazony (A.5.2.)

INSTRUKCJE:

[A.5.1. Osazony cukrów](#)

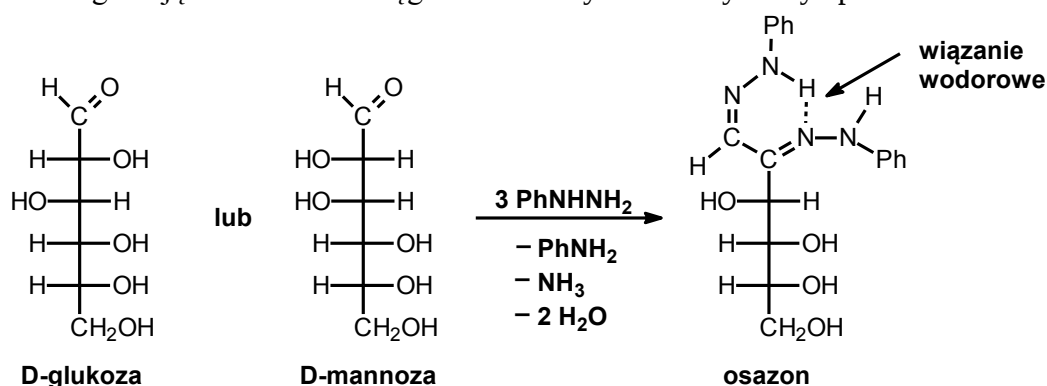
[A.5.2. Semikarbazony związków karbonylowych](#)

 [DO SPISU TREŚCI](#)

A.5.1. Osazony cukrów

Tworzenie się osazonów w reakcji cukrów (aldoz lub ketoz) z nadmiarem fenylohydrazyny jest jedną z najbardziej charakterystycznych reakcji dla tej grupy związków. Mechanizm tej reakcji jest dość złożony. W pierwszym etapie w wyniku reakcji cukru z fenylohydrazyną powstaje fenylohydrazon. W kolejnym etapie z enolu powstałego w wyniku tautomeryzacji fenylohydrazonu tworzy się anilina i ketimina, której reakcja z dwoma molami fenylohydrazyny prowadzi do powstaniu osazonu i amoniaku.

E. Fischer stwierdził, że tworzenie osazonów jest przydatne nie tylko do identyfikacji cukrów, ale także do określania ich konfiguracji np. dwie diastereoizomeryczne aldoheksozy D-glukoza i D-mannoza tworzą taki sam osazon. Wynika z tego, że te dwie aldozy różnią się jedynie konfiguracją wokół atomu węgla C-2. Cukry takie nazywamy epimerami.



Osazony są zwykle żółtymi, krystalicznymi związkami, o dobrze wykształconych kryształach. Są trudno rozpuszczalne w zimnej wodzie. Oglądane pod mikroskopem charakterystyczne postacie osazonów, jak również czas ich tworzenia mogą służyć do identyfikacji cukrów. Temperatura topnienia lub rozkładu są mniej pewnym parametrem. Dane te dla niektórych cukrów zestawiono w Tabeli 2.

TABELA 2: Właściwości analizowanych cukrów i ich osazonów

Cukier ^{a)}	Temperatura rozkładu cukru [°C]	Czas tworzenia się osazonu [min.]	Temperatura rozkładu osazonu ^{b)} [°C]
L-Arabinioza	160	10	166
Celobioza	225	*	198
D-Fruktoza	104	2	205
D-Galaktoza	170 (bezw.)	15-19	201
D-Glukoza	146 (bezw.)	4-5	205
D-Ksyloza	145	7	164
Laktoza	203 (hydrat)	*	200
Maltoza	165 (hydrat)	*	206
Sacharoza	185	30**	205

^{a)} Analizowane cukry nie stwarzają zagrożenia dla zdrowia człowieka i środowiska naturalnego. Związki te nie nadają się jednak do spożycia!

^{b)} Brak danych dotyczących wpływu osazonów na organizm człowieka i innych możliwych zagrożeń. Związki te należy traktować jako potencjalnie niebezpieczne dla zdrowia, unikać kontaktu ze skórą i oczami.

* Osazony wydzielają się dopiero po ochłodzeniu ze względu na dobrą rozpuszczalność w gorącej wodzie.

**W tym czasie następuje hydroliza i utworzenie osazonu monocukrów.

Celem ćwiczenia jest identyfikacja dwóch otrzymanych do analizy cukrów poprzez syntezę i scharakteryzowanie ich osazonów.

Część doświadczalna

Odczynniki:

chlorowodorek fenylohydrazyny (2 razy po 0,2 g)
octan sodu uwodn. (2 razy po 0,3 g)

Sprzęt laboratoryjny:

probówki
zlewka 250 cm³
szkiełka mikroskopowe
bagietka szklana
źródło ciepła

W probówce umieszcza się kolejno 0,1 g badanego cukru, 0,2 g chlorowodoru fenylohydrazyny, 0,3 g krystalicznego octanu sodu i 5 cm³ wody destylowanej. Zawartość probówki mocno wytrząsa się. Probówkę zatkaną zwitkiem waty umieszcza się w zlewce z wrzącą wodą, przy czym ilość wody w zlewce powinna być taka, aby zawartość probówek była całkowicie zanurzona. Gdyby substancje stałe nie rozpuściły się na zimno, to po chwilowym ogrzaniu należy ponownie wymieszać roztwór, nie wyjmując jednak probówki z wrzącej wody. Następnie obserwuje się uważnie, po ilu minutach od chwili zanurzenia probówki do wrzącej wody pojawi się wyraźne zmętnienie ze zmianą barwy na intensywnie żółtą lub żółty osad. Te probówki wyjmuje się ze zlewki i pozostawia do ostygnięcia. Probówki, w których nie pojawiło się zmętnienie po 30 minutach, wyjmuje się również ze zlewki i pozostawia do ochłodzenia. Zawiesiny utworzonych kryształków obserwuje się pod mikroskopem.¹ Należy odrysować postać krystaliczną oraz sposób ułożenia kryształów w większe zespoły, po czym porównać uzyskany obraz z fotografiami osazonów, dostępnymi na sali ćwiczeń.

Bardzo dobrej jakości zdjęcia osazonów wybranych cukrów można znaleźć na stronie internetowej Uniwersytetu w Lille (Francja) pod adresem:

<http://www4.ac-lille.fr/~svt/labo/glucide/osazo/exposa.htm>

Zadania:

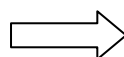
1. Sacharoza w reakcji z fenylohydrazyną daje po 30 minutach osad osazonu, który jest wynikiem wtórnej reakcji produktów hydrolizy disacharydu z fenylohydrazyną. Jaki osazon tworzy się w tej reakcji? Napisz zachodzące kolejno reakcje.
2. Narysuj wzory L-glukozy i L-mannozy w projekcji Fischera oraz wzory rzutowe Hawortha α -D-glukopiranozy i β -D-glukopiranozy.

Sprawozdanie z ĆWICZENIA A.5.1. powinno zawierać:

1. Tabelę z wynikami obserwacji:

	Czas tworzenia się osazonu	Postać krystaliczna (wynik obserwacji pod mikroskopem i porównania obrazu ze zdjęciami osazonów, ewentualnie szkic postaci kryształów)	Wnioski
Cukier I			
Cukier II			

2. Odpowiedzi do zadań umieszczonych na końcu ćwiczenia:



[Do początku rozdziału A.5](#)

¹ Zawartość probówek umieszcza się w pojemniku **W-Z**

A.5.2. Semikarbazony związków karbonylowych

Semikarbazony, które powstają w reakcji semikarbazydu ze związkami karbonylowymi są szczególnie przydatne w identyfikacji aldehydów i ketonów. Sposób ich wykorzystania w analizie przedstawia następujący przykład. Dwa ketony, pentan-2-on i pentan-3-on, posiadają identyczną temperaturę wrzenia (102 °C). Dają także identyczne reakcje charakterystyczne, tak więc ich rozróżnienie jest możliwe dopiero po przeprowadzeniu w pochodną krystaliczną, na przykład w semikarbazon. Różnica pomiędzy temperaturami topnienia semikarbazonów obu ketonów wynosi aż 33 °C, czyli bez trudu można określić, który z ketonów był analizowany. Oczywiście można dokonać takiej analizy przy pomocy metod spektroskopowych, szczególnie ¹H NMR.

Celem ćwiczenia jest identyfikacja otrzymanego do analizy ciekłego aldehydu bądź ketonu.

Część doświadczalna

Odczynniki:

[chlorowodorek semikarbazydu](#) 1,0 g
[octan sodu bezw.](#) 1,5 g
[etanol](#)

Sprzęt laboratoryjny:

kolba okrągłodenna 100 cm³
kolba okrągłodenna 50 cm³
chłodnica zwrotna wodna
lejek Büchnera
kolba ssawkowa
lejek szklany

Przed przystąpieniem do syntezy oznacza się temperaturę wrzenia otrzymanego do identyfikacji związku (patrz rozdział *Oznaczanie stałych fizycznych* w zasadniczej części skryptu).

Następnie w kolbie okrągłodennej o poj. 50 cm³ rozpuszcza się na zimno 1 cm³ aldehydu lub ketonu w 3 cm³ etanolu, po czym dodaje się 3 cm³ wody. Ewentualne zmętnienie usuwa się przez dodatek kilku kropli etanolu. Do tego roztworu dodaje się 1 g chlorowodoru semikarbazydu i 1,5 g bezwodnego octanu sodu. Wszystkie składniki dokładnie się miesza i ogrzewa mieszaninę przez 10 min na wrzącej łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Następnie po ostudzeniu chłodzi się mieszaninę reakcyjną intensywnie w wodzie z lodem pocierając ścianki naczynia bagietką. Gdyby nie pojawiały się kryształy, to należy dodać wody lub usunąć część etanolu przy pomocy wyparki obrotowej. Wydzielone kryształy semikarbazonu odsąca się na lejku Büchnera i przemywa wodą.¹ Surowy semikarbazon należy dokładnie wysuszyć i oznaczyć jego temperaturę topnienia. Może się okazać, że został w ten sposób uzyskany związek o dostatecznej czystości. W przeciwnym razie krystalizuje się go z wody lub z etanolu, lub z rozcieńczonego etanolu (1:1). Właściwy rozpuszczalnik do krystalizacji należy dobrać samodzielnie.² Po wysuszeniu oznacza się temperaturę topnienia pochodnej i porównuje wynik z danymi w Tabeli 3.

¹ Przesącz umieszcza się w pojemniku ○.

² Przesącz wylewa się do zlewu (woda) lub umieszcza się w pojemniku ○.

TABELA 3: Właściwości analizowanych aldehydów / ketonów i ich semikarbazonów

Aldehyd / Keton ^{a)}	Temperatura wrzenia [°C]	Temperatura topnienia semikarbazonu ^{b)} [°C]
3-Metylobutan-2-on (keton izopropylowo-metylowy)	94	113
Pentan-2-on	102	106
Pentan-3-on	102	139
Pinakolon (keton <i>tert</i> -butylowo-metylowy)	106	158
Heksan-2-on	128	129
Tlenek mezytylu (4-metylopent-3-en-2-on)	130	164
Cyklopentanon	131	210
Cykloheksanon	155	167
Benzaldehyd	179	224
Nonan-5-on (keton dibutyłowy)	185	90
Aldehyd salicyłowy (2-hydroksybenzaldehyd)	196	231
Acetofenon	202	199
4-Metylobenzaldehyd	204	234

^{a)} Analizowane związki karbonylowe są łatwopalnymi cieczami o intensywnym zapachu. Należy pracować pod sprawnym wyciągiem, z dala od źródeł ognia. Związki są szkodliwe po spożyciu, niektóre z nich mogą powodować podrażnienie skóry i oczu – należy nosić okulary i rękawice ochronne.

^{b)} Brak danych dotyczących wpływu osazonów na organizm człowieka i innych możliwych zagrożeń. Związki te należy traktować jako potencjalnie niebezpieczne dla zdrowia, unikać kontaktu ze skórą i oczami.

Zadania:

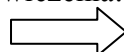
- Napisz równanie reakcji zidentyfikowanego związku karbonylowego z semikarbazidem. Jaką rolę pełni w tej reakcji octan sodu?
- Narysuj wzory strukturalne następujących związków :
 - chloral
 - butanodial
 - 6-metylocykloheks-2-enon
 - 1,4-difenylobutan-2-on
- Który ze związków, *p*-metoksybenzaldehyd czy *p*-nitrobenzaldehyd, jest bardziej reaktywny w reakcji addycji **nukleofilowej** do grupy karbonyłowej? Odpowiedź uzasadnij, pamiętając o klasyfikacji podstawników omawianej przy reakcji substytucji **elektrofilowej** aromatycznej.

Sprawozdanie z ĆWICZENIA A.5.2. powinno zawierać:

- Tabelę z wynikami obserwacji:

Temperatura wrzenia związku karbonyłowego	Temperatura topnienia semikarbazonu oraz dobrany rozpuszczalnik do krystalizacji	Wniosek

- Odpowiedzi do zadań umieszczonych na końcu ćwiczenia:



[Do początku rozdziału A.5](#)

A.6. DESTYLACJA I EKSTRAKCJA:

WYODRĘBNIANIE PRODUKTÓW NATURALNYCH Z MATERIAŁU ROŚLINNEGO

(Szczegółowe zasady postępowania omówione są w zasadniczej części skryptu w rozdziałach V.3. DESTYLACJA, V.4. EKSTRAKCJA oraz III.6. SUSZENIE – Suszenie cieczy)

Chemik organik, biolog lub farmaceuta stają często przed problemem wydobycia związków chemicznych z materiału roślinnego. W wielu wypadkach rośliny są najtańszym źródłem tych substancji, dużo tańszym niż synteza laboratoryjna czy nawet przemysłowa. Najczęściej stosowane metody izolacji to destylacja z parą wodną i ekstrakcja w układzie ciało stałe – ciecz przy pomocy wody lub różnych rozpuszczalników organicznych.

W niniejszych instrukcjach opisane jest zastosowanie destylacji z parą wodną na przykładzie izolacji olejków eterycznych z popularnych roślin przyprawowych (A.6.1. i A.6.2.). Olejki eteryczne wyodrębniane z materiałów roślinnych stanowią zazwyczaj złożone mieszaniny różnorodnych substancji (węglowodorów, ketonów, aldehydów, alkoholi, estrów). Niektóre rośliny wytwarzają jednak olejki eteryczne szczególnie bogate w jeden określony składnik, który warunkuje charakterystyczny aromat przypraw takich jak np. goździki, kminek lub wanilia. Olejki eteryczne są wykorzystywane w przemyśle kosmetycznym, spożywczym, farmaceutycznym i innych.

Dalsze dwa ćwiczenia polegają na izolacji związków organicznych przy pomocy metod ekstrakcyjnych. Przy wydobyciu kofeiny z herbaty (A.6.3.) stosuje się w pierwszym etapie ekstrakcję liści herbaty gorącą wodą, a więc proces znany z codziennego życia jako „parzenie herbaty”. Bardziej skomplikowany proces ciągłej ekstrakcji w ekstraktorze jest podstawą drugiego ćwiczenia (A.6.4.). Gałka muszkatołowa świetnie znana z kuchni jako przyprawa o przyjemnym zapachu tym razem służy jako źródło tłuszczu.

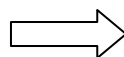
INSTRUKCJE:

[A.6.1. Olejek goździkowy](#)

[A.6.2. Olejek anyżowy](#)

[A.6.3. Kofeina z herbaty](#)

[A.6.4. Trigliceryd trimirystyna z gałki muszkatołowej](#)



[DO SPISU TREŚCI](#)

A.6.1. Olejek goździkowy

Celem niniejszego ćwiczenia jest wyodrębnienie olejku goździkowego z wysuszonych i sproszkowanych goździków (A.6.1.a lub A.6.1.b).

a. Destylacja z parą wodną z zastosowaniem łapacza kropel

Część doświadczalna

Odczynniki:

suszone goździki 10,0 g
[chlerek metylenu](#) 40 cm³
[siarczan\(VI\) magnezu](#)
płytko do TLC pokryta SiO₂
[chloroform](#)

Sprzęt laboratoryjny:

kolba okrągłodenna ze szlifem 500 cm³
łapacz kropel
chłodnica wodna
2 kolby stożkowe
rozdzielacz
lejek szklany
moździerz
komora chromatograficzna
kapilary

W kolbie o pojemności 500 cm³ połączonej poprzez łapacz kropel z chłodnicą destylacyjną umieszcza się 10 g starannie utartych w moździerzu goździków (*Eugenia caryophyllata*) i 300 cm³ wody. Zawartość kolby ogrzewa się energicznie, prowadząc destylację z parą wodną do momentu, aż destylat będzie całkowicie klarowną cieczą. Zazwyczaj proces można zakończyć po zebraniu ok. 200 cm³ destylatu.

b. Destylacja z parą wodną z zastosowaniem kociołka

Część doświadczalna

Odczynniki:

suszone goździki 10,0 g
[chlerek metylenu](#) 40 cm³
[siarczan\(VI\) magnezu](#)
płytko do TLC pokryta SiO₂
[chloroform](#)

Sprzęt laboratoryjny:

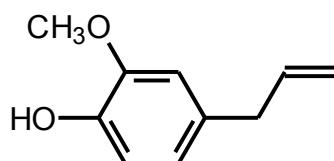
kolba okrągłodenna ze szlifem 500 cm³
kociołek do wytwarzania pary wodnej
nasadka do destylacji z parą wodną
chłodnica wodna
2 kolby stożkowe
rozdzielacz
lejek szklany
moździerz lub młynek elektryczny
komora chromatograficzna
kapilary

W kolbie o pojemności 500 cm³ połączonej poprzez nasadkę do destylacji z parą wodną z kociołkiem i z chłodnicą umieszcza się 10 g starannie utartych goździków (*Eugenia caryophyllata*) i 200 cm³ wody. Wodę w kociołku oraz zawartość kolby ogrzewa się energicznie, prowadząc destylację z parą wodną do momentu, aż destylat będzie całkowicie klarowną cieczą. Zazwyczaj proces można zakończyć po zebraniu ok. 200 cm³ destylatu.

Ekstrakcja

UWAGA: Praca z odczynnikami toksycznymi. Obowiązuje rękawice ochronne i praca pod wyciągiem!

Otrzymany metodą **A** lub **B** destylat przenosi się do rozdzielacza i ekstrahuje dwukrotnie chlorkiem metylenu (porcjami po ok. 20 cm³).¹ Zebrane frakcje organiczne suszy się nad bezwodnym siarczanem(VI) magnezu, a po jego odsączeniu lub zdekantowaniu cieczy znad osadu, przenosi się roztwór do uprzednio zważonej kolby kulistej o pojemności 100 cm³. Z roztworu pobiera się próbkę kapilarką do TLC i wykonuje chromatografię cienkowarstwową. Rozpuszczalnik oddestylowuje się na wyparce obrotowej.² W kolbie pozostaje olejek goździkowy. Kolbę wraz z olejkiem waży się, a następnie oblicza z różnicy mas ilość uzyskanego olejku i wydajność procesu. Głównym składnikiem olejku goździkowego jest [eugenol \[2-metoksy-4-\(prop-2-enylo\)fenol\]](#).



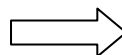
eugenol

TLC olejku goździkowego

Otrzymany w ćwiczeniu olejek goździkowy poddaje się próbie na obecność eugenolu z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej. Eugenol identyfikuje się stosując TLC w układzie SiO₂/CHCl₃ (opis wykonywania chromatografii cienkowarstwowej podany jest w instrukcji do ćwiczenia A.3. oraz w rozdziale V.5 CHROMATOGRAFIA zasadniczej części skryptu). Należy nanieść na płytkę próbkę roztworu otrzymanego olejku i roztwór wzorcowy eugenolu. Położenie plamek obserwuje się pod lampą UV i zaznacza na płytce ołówkiem. Na płytce mogą pojawić się także plamki odpowiadające innym składnikom olejku goździkowego.

Zadania:

1. Która wersja destylacji z parą wodną a) z kociołkiem, b) z wytwarzaniem pary wodnej w kolbie destylacyjnej jest bardziej wydajna i dlaczego?
2. Jakie inne rozpuszczalniki można zaproponować do ekstrakcji olejku goździkowego?



[Do początku rozdziału A.6](#)

¹ Fazę wodną wylewa się do zlewu pod dygestorium.

² Destylat umieszcza się w pojemniku **F**

A.6.2. Olejek anyżowy

Celem niniejszego ćwiczenia jest wyodrębnienie olejku anyżowego z wysuszonego i sproszkowanego anyżu (A.6.2.a lub A.6.2.b).

a. Destylacja z parą wodną z zastosowaniem łapacza kropel

Część doświadczalna

Odczynniki:

nasiona anyżu 10,0 g
[chlerek metylenu](#) 40 cm³
[siarczan\(VI\) magnezu](#)
płytko do TLC pokryta SiO₂
[chloroform](#)

Sprzęt laboratoryjny:

kolba okrągłodenna ze szlifem 500 cm³
łapacz kropel
chłodnica wodna
2 kolby stożkowe
rozdzielacz
lejek
moździerz
komora chromatograficzna
kapilary

W kolbie o pojemności 500 cm³ połączonej poprzez łapacz kropel z chłodnicą destylacyjną umieszcza się 10 g starannie utartego w moździerzu anyżu (*Pimpinella anisum*) i 300 cm³ wody. Zawartość kolby ogrzewa się energicznie, prowadząc destylację z parą wodną do momentu, aż destylat będzie całkowicie klarowną cieczą. Zazwyczaj proces można zakończyć po zebraniu ok. 200 cm³ destylatu.

b. Destylacja z parą wodną z zastosowaniem kociołka

Część doświadczalna

Odczynniki:

nasiona anyżu 10,0 g
[chlerek metylenu](#) 40 cm³
[siarczan\(VI\) magnezu](#)
płytko do TLC pokryta SiO₂
[chloroform](#)

Sprzęt laboratoryjny:

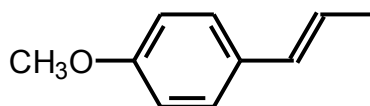
kolba okrągłodenna ze szlifem 500 cm³
kociołek do wytwarzania pary wodnej
nasadka do destylacji z parą wodną
chłodnica wodna
2 kolby stożkowe
rozdzielacz
lejek szklany
moździerz
komora chromatograficzna
kapilary

W kolbie o pojemności 500 cm³ połączonej poprzez nasadkę do destylacji z parą wodną z kociołkiem i z chłodnicą umieszcza się 10 g starannie utartego w moździerzu anyżu (*Pimpinella anisum*) i 200 cm³ wody. Wodę w kociołku oraz zawartość kolby ogrzewa się energicznie, prowadząc destylację z parą wodną do momentu, aż destylat będzie całkowicie klarowną cieczą. Zazwyczaj proces można zakończyć po zebraniu ok. 200 cm³ destylatu.

Ekstrakcja

UWAGA: Praca z odczynnikami toksycznymi. Obowiązują rękawice ochronne i praca pod wyciągiem!

Otrzymany metodą **a.** lub **b.** destylat przenosi się do rozdzielacza i ekstrahuje dwukrotnie chlorkiem metylenu (porcjami po ok. 20 cm³).¹ Zebrane frakcje organiczne suszy się nad bezwodnym siarczanem(VI) magnezu, a po jego odsączeniu oddestylowuje rozpuszczalnik na wyparce obrotowej.² W kolbie pozostaje tzw. olejek anyżowy, którego głównym składnikiem jest [anetol \[\(E\)-1-metoksy-4-\(prop-1-enylo\)benzen\]](#).



anetol

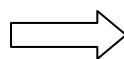
Olejek waży się i poddaje identyfikacji przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej.

TLC olejku anyżowego

Otrzymany w ćwiczeniu olejek anyżowy poddaje się próbie na obecność anetolu z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej. Anetol identyfikuje się stosując TLC w układzie SiO₂/CHCl₃ (opis wykonywania chromatografii cienkowarstwowej podany jest w instrukcji do ćwiczenia A.3. oraz w rozdziale V.5 CHROMATOGRAFIA zasadniczej części skryptu). Na płytkę należy nanieść próbkę otrzymanego olejku rozpuszczonego w chloroformie (**Uwaga:** roztwór ten musi być bardzo rozcieńczony) i roztwór wzorcowy anetolu. Położenie plamek obserwuje się pod lampą UV i zaznacza na płytce ołówkiem.

Zadania:

1. Dlaczego w aparaturze do destylacji z parą wodną brak jest termometru?
2. Dlaczego kilkakrotna ekstrakcja małymi porcjami jest bardziej skuteczna niż pojedyncza ekstrakcja dużą ilością rozpuszczalnika?



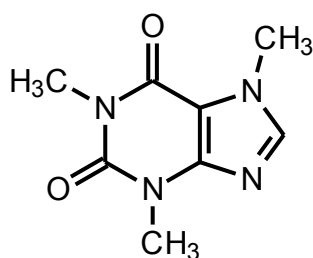
[Do początku rozdziału A.6](#)

¹ Fazę wodną wylewa się do zlewu pod dygestorium.

² Destylat umieszcza się w pojemniku **F**.

A.6.3. Kofeina z herbaty

Celem ćwiczenia jest wyodrębnienie kofeiny z herbaty (*Camellia sinensis* lub *Camellia assanica*). [Kofeina](#) (1,3,7-trimetyloksantyna), alkaloid z grupy puryn występuje w liściach herbaty, nasionach kawy (*Coffea arabica*) oraz nasionach kakaowca (*Theobroma cacao*). W pierwszym etapie zastosowano ekstrakcję w układzie ciało stałe - ciecz (herbata - woda), w drugim ekstrakcję w układzie ciecz - ciecz (roztwór wodny-rozpuszczalnik organiczny).



kofeina

Część doświadczalna

Odczynniki:

herbata w torebkach (10 sztuk) lub 15 g
[chloroform](#) 60 cm³
[węglan sodu](#) 20 g
[chlorek metylenu](#)
[siarczan\(VI\) magnezu](#)
płytką do TLC pokrytą SiO₂
[octan etylu](#)

Sprzęt laboratoryjny:

kolba okrągłodenna ze szlifem 50 cm³
chłodnica zwrotna wodna
kolba stożkowa z szeroką szyją 500 cm³
lejek Büchnera
kolba ssawkowa
łaznia lodowa
komora chromatograficzna
kapilary
pęseta
lejek szklany

UWAGA: Praca z odczynnikami toksycznymi. Obowiązują rękawice ochronne i praca pod wyciągiem!

W kolbie stożkowej z szeroką szyją o poj. 500 cm³ umieszcza się 15 g herbaty i ogrzewa się do wrzenia przez 20 minut z 150 cm³ wody zawierającej 20 g węglanu sodu. Po przesączeniu na gorąco przez lejek Büchnera (sączenie może być bardzo uciążliwe, pomocne jest użycie podwójnej warstwy ręcznika jednorazowego zamiast bibuły), przemyciu osadu gorącą wodą i **ochłodzeniu** dodaje się do przesączu 60 cm³ chloroformu. Obie warstwy miesza się delikatnie (w celu uniknięcia powstania emulsji) przez 15 minut, stosując mieszadło magnetyczne. Ekstrakt chloroformowy oddziela się w rozdzielaczu,¹ suszy bezwodnym siarczanem(VI) magnezu i oddestylowuje na wyparce obrotowej.² Surowy produkt krystalizuje się z niewielkiej ilości wody. Alternatywny sposób oczyszczania polega na rozpuszczeniu kofeiny na gorąco w 5 cm³ bezwodnego acetonu, dodaniu po kropli eteru naftowego (40 – 60 °C) do zmętnienia i ochłodzeniu mieszaniny.³ Temperatura topnienia

¹ Fazę wodną wylewa się do zlewu pod dygestorium.

² Destylat umieszcza się w pojemniku **F**.

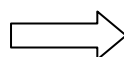
³ Przesącz umieszcza się w pojemniku **O**.

bezwodnej kofeiny wynosi 225 – 228 °C. Kofeina wykazuje tendencję do tworzenia hydratu (z jedną cząsteczką wody), który topi się w temperaturze 234 – 236,5 °C

Kofeinę identyfikuje się stosując TLC w układzie SiO_2 /chlorek metylenu-octan etylu (1:1). Położenie plamek obserwuje się pod lampą UV i zaznacza na płytce ołówkiem.

Zadania:

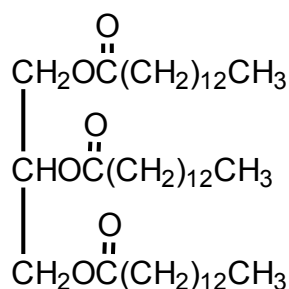
1. Puryny stanowią ważną biologicznie klasę związków ze skondensowanymi pierścieniami heterocyklicznymi. Narysuj wzór puryny.
2. Porównaj wzór kofeiny ze wzorami adeniny i guaniny, zasadami azotowymi występującymi w kwasach nukleinowych, i odpowiedz na pytanie, czy kofeina może tworzyć *N*-glikozydy z cukrami.



[Do początku rozdziału A.6](#)

A.6.4. Trigliceryd trimirystyna z gałki muskatołowej

Gałka muskatołowa jest owocem tropikalnego drzewa muskatołowego, rodzącego do 2000 owoców. Jest używana w małych ilościach jako ceniona przyprawa o delikatnym smaku. Jednym ze składników występujących w gałce muskatołowej w znacznych ilościach jest tłuszcz – [trimirystyna \(trimirystynian glicerylu\)](#). Inne tłuszcze występują w gałce muskatołowej tylko w niewielkich ilościach, możliwa jest więc efektywna izolacja tego triglicerydu we względnie czystej postaci. Ekstrakcję tłuszczu można przeprowadzić na drodze jednokrotnej ekstrakcji materiału roślinnego odpowiednim rozpuszczalnikiem organicznym lub, znacznie efektywniej, w wyniku procesu ekstrakcji ciągłej z użyciem aparatu Soxhleta. Celem ćwiczenia jest praktyczne zapoznanie się z funkcjonowaniem ekstraktora Soxhleta



trimirystyna

Część doświadczalna

Odczynniki:

gałka muskatołowa mielona 10 g
[aceton cz.](#) 5 cm³
[chlorek metylenu](#) 180 cm³

Sprzęt laboratoryjny:

aparat Soxhleta z gilzą
kolba okrągłodenna o poj. 250 cm³
szklana fiolka z korkiem
lejek Büchnera
kolba ssawkowa
płaszcz grzejny

UWAGA: Praca z odczynnikami toksycznymi. Obowiązuje rękawice ochronne i praca pod wyciągiem!

Zmieloną gałkę muskatołową (10 g) wsypuje się do gilzy, zatyka kłębkami waty i umieszcza w aparacie Soxhleta o pojemności 100 cm³. W suchej kolbie okrągłodennej o pojemności 250 cm³ umieszcza się 180 cm³ chlorku metylenu. Aparat Soxhleta wraz z chłodnicą mocuje się w szyjce tej kolby i jej zawartość doprowadza się do łagodnego wrzenia za pomocą płaszcza grzejnego. Ekstrakcję prowadzi się przez ~1,5 godziny – w tym czasie ekstraktor powinien napełnić się i opróżnić kilkanaście razy. Po ostudzeniu, roztwór zawarty w kolbie należy zagęścić na wyparce obrotowej, usuwając całkowicie chlorek metylenu¹. Pozostały po oddestylowaniu chlorku metylenu żółtawy olej rozpuszcza się na ciepło w kilku cm³ czystego acetonu i przelewa do szklanej fiolki z plastikowym korkiem. Fiolkę wraz z zawartością chłodzi się intensywnie w lodzie. Wydzielony, praktycznie bezbarwny osad trimirystynianu glicerylu odsącza się na lejku Büchnera, przemywa 1 - 2 cm³ zimnego acetonu² i pozostawia do wysuszenia na powietrzu (nie wolno pod lampą!). Następnie waży się otrzymany produkt i oznacza jego temperaturę topnienia. Czysty tłuszcz

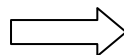
¹ Destylat umieszcza się w pojemniku **F**

² Przesącz umieszcza się w pojemniku **O**

topi się w temperaturze 55 - 56 °C. Czystość produktu można potwierdzić za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (SiO₂, CHCl₃, obserwacja w świetle UV).

Zadania:

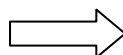
1. Zaproponuj sposób otrzymywania kwasu mirystynowego z trimirystyny.
2. Napisz wzory kilku innych tłuszczów.



[Do początku rozdziału A.6](#)

Sprawozdanie z ĆWICZEŃ A.6.1., A.6.2., A.6.3. i A.6.4 powinno zawierać:

1. Cel ćwiczenia
2. Krótki opis wykonanych operacji (patrz wzór sprawozdania do SYNTEZY),
3. Informacja o ilości otrzymanego produktu,
4. Informacja o temperaturze topnienia związku, jeżeli produkt jest ciałem stałym,
5. Chromatogram wraz z komentarzem (o ile jego wykonanie było zalecone)
6. Odpowiedzi do zadań umieszczonych na końcu ćwiczenia:



[DO SPISU TREŚCI](#)