

Università degli Studi di Pavia
Corso di Laurea in Biotecnologie
Anno Accademico 2011-2012

LABORATORIO DI CHIMICA ORGANICA

Esperienze di laboratorio

- 1) Cristallizzazione dell'acido benzoico da acqua e determinazione del punto di fusione
- 2) Distillazione frazionata dell'etanolo dal vino
- 3) Estrazione oli essenziali mediante distillazione in corrente di vapore
- 4) Sintesi dell'aspirina
- 5) Saponificazione di un grasso
- 6) Estrazione di pigmenti da foglie verdi e separazione mediante cromatografia su colonna

Gruppo A: Docente: Prof. Luigi Garlaschelli

luigi.garlaschelli@unipv.it

Gruppo B: Docente: Prof. Mariella Mella

mariella.mella@unipv.it

Dip. Chimica - università di Pavia

http://sites.google.com/site/luigigarlaschelli/lab_chimica_organica.pdf
http://sites.google.com/site/luigigarlaschelli/lab_chimica_biotecnol.pdf

1) CRISTALLIZZAZIONE ACIDO BENZOICO DA ACQUA

Scopo: apprendimento della tecnica di purificazione per composti solidi.

Solvente di ricristallizzazione: acqua.

Reagenti: Acido Benzoico 5.0 g
Acqua 120 mL

Procedura.

L'acido benzoico viene posto in una beuta grande da 250-300 mL aggiungendo 100-120 mL di acqua (rubinetto). Si aggiungono alcuni granelli di carborundum (ebollitori) e si porta a leggera ebollizione su piastra riscaldante elettrica **sotto cappa**. Se l'acido non si scioglie completamente, aggiungere poca acqua fino a completa dissoluzione a caldo. Preventivamente occorre preparare un filtro a pieghe che verrà posto all'interno di un imbuto posizionato su una seconda beuta da 250-300 mL e bagnato con poca acqua. In questa seconda beuta mettere un dito d'acqua. Il tutto sarà scaldato sulla piastra in modo che i vapori caldi riscaldino l'imbuto con il filtro.

Quando tutto l'acido benzoico è sciolto si procede rapidamente alla filtrazione a caldo versando la soluzione acquosa d'acido benzoico nella seconda beuta (preparata sulla piastra con l'imbuto e il filtro caldi). Terminata la filtrazione si toglie la beuta dalla piastra e si lascia raffreddare lentamente il filtrato. L'acido benzoico dovrebbe cristallizzare in cristalli bianchi aghiformi.

Raffreddare molto bene ponendo la beuta sotto il getto d'acqua del rubinetto del lavandino. Filtrare sotto vuoto su Buchner, lavando il solido con poca acqua fredda; premere bene il solido con una spatola lasciandolo per un po' alla pompa anche dopo che non gocciola più acqua. Quindi si pone il solido recuperato su carta da filtro e si lascia seccare all'aria nel cassetto o nell'armadietto fino al giorno seguente quando si peserà per calcolare la resa di cristallizzazione. Determinare il punto di fusione del prodotto ricristallizzato (p.f. (lett) : 122 °C)

2) Distillazione frazionata dell'etanolo dal vino

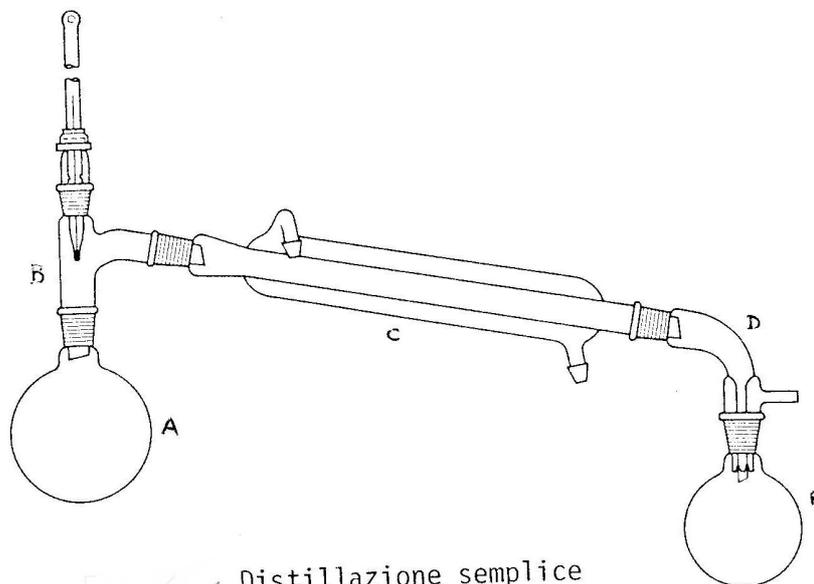
La **distillazione** è una tecnica di separazione che sfrutta la differenza dei punti di ebollizione delle diverse sostanze presenti in una miscela. È usata sia per separare miscele complesse che per purificare sostanze. A livello di laboratorio, una distillazione viene condotta utilizzando una *caldaia* in cui scaldare la miscela da separare, un *condensatore* in cui i vapori che si separano dalla miscela bollente vengono raffreddati e un contenitore che raccoglie i vapori condensati, arricchiti delle sostanze aventi punto di ebollizione inferiore.

Scopo dell'esperienza: purificazione di un composto liquido in soluzione

Reagenti: 100 ml di vino contenente il 10-12% in volume di etanolo.

Apparecchiatura:

- A) Pallone da almeno 250ml.
- B) Testa di distillazione semplice
Termometro, e raccordo porta-termometro
- C) Refrigerante a **canna liscia** di Liebig
- D) Raccordo angolare
- E) Due beute (50-100 ml) di raccolta.



Procedimento

Montare l'apparecchiatura come mostrato in figura dopo aver controllato la pulizia della stessa e fissando correttamente il tutto alla rastrelliera.

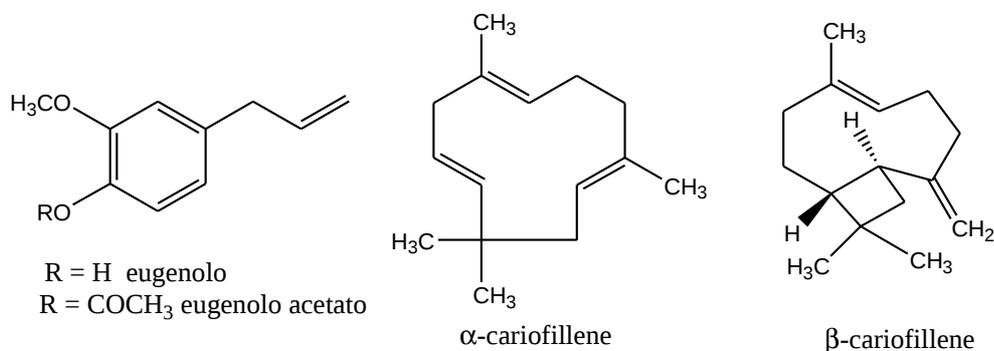
Mettere nell'ordine: piattaforma elevatore, termometro, pallone, testa di distillazione, refrigerante. Non tensionare l'apparecchiatura nello stringere le pinze di sostegno! L'entrata dell'acqua di raffreddamento è nel portagomma inferiore! Quindi smontare il pallone e caricare con un imbuto 100 ml di vino. Aggiungere gli ebollitori (palline di carborundum) e aprire l'acqua di raffreddamento lentamente. Basta fare scorrere un filo d'acqua! Iniziare il riscaldamento con mantello elettrico fino a portare il liquido a moderata ebollizione.

Le prime gocce di distillato costituiscono le *teste di distillazione* che vanno misurate in termini di volume, annotando la temperatura di distillazione, e poi scartate. Quando la temperatura è ritenuta costante, si raccoglie il cosiddetto "cuore" che contiene prevalentemente l'azeotropo etanolo/acqua (p.e.78 °C). Si prosegue la distillazione fino a che la temperatura non aumenta sensibilmente fino a superare gli 80 °C. Il distillato viene raccolto, si misura il volume, annotando l'intervallo di distillazione. Ciò che rimane nel pallone è la cosiddetta coda di distillazione. La somma dei volumi di *Testa+Cuore+Coda* deve dare il volume iniziale di vino sottoposto a distillazione.

3) ESTRAZIONE DEGLI OLI ESSENZIALI DA SPEZIE COMUNI ATTRAVERSO DISTILLAZIONE IN CORRENTE DI VAPORE

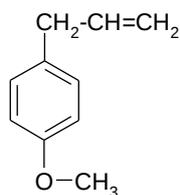
Gli oli essenziali (od oli eterei od oli volatili o essenze) sono definiti, secondo la Farmacopea Ufficiale Italiana, come "miscela complessa di sostanze organiche volatili di costituzione chimica diversa, contenute nelle piante dalle quali sono ricavate, ordinariamente, mediante distillazione in corrente di vapore, estrazione con solventi o per mezzo di procedimenti meccanici idonei alla purificazione di un composto liquido in soluzione"

Scopo dell'esperienza: estrarre gli oli essenziali contenuti nei chiodi di garofano mediante distillazione in corrente di vapore. La miscela ha come componente principale l'eugenolo (60-90%) accompagnato quantità di α e β -cariofillene e altri composti terpenici.

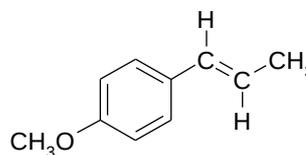


Si può effettuare l'esperienza anche con buccia di arancia o buccia di limone (solo le parti colorate delle bucce), semi di anice stellato, semi di cumino, stecche di cannella. In questi casi i composti organici isolati saranno differenti

Da semi di anice:

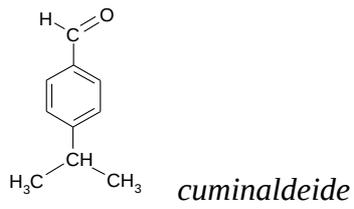


Anetolo (principale componente)

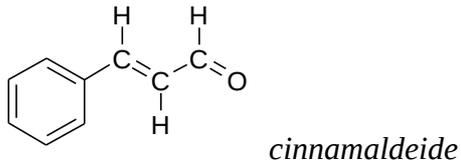


Estragolo (in modesta percentuale)

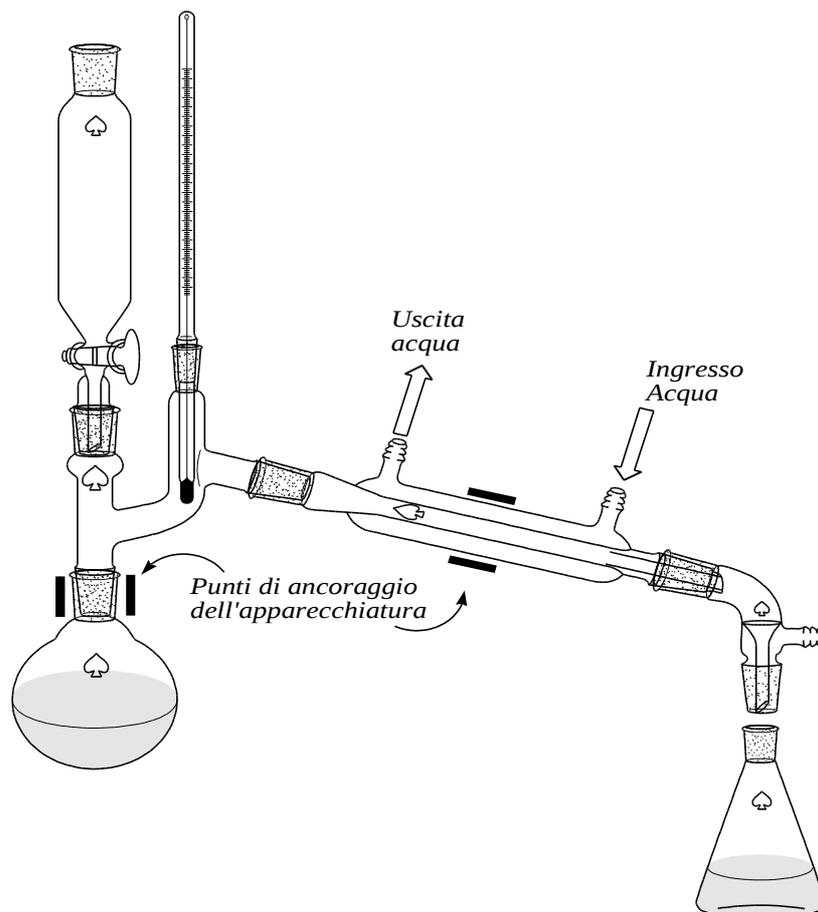
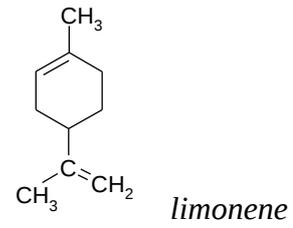
Da semi di cumino:



Da stecche di cannella:



Da bucce di arancia e limone:



Quantità:	Spezie macinate	2 g
	H ₂ O	150 mL
	Et ₂ O	2 x 25 mL

Na₂SO₄

Vetreteria:

n° 1 Pallone da 250 mL, Testa di distillazione di Claisen, termometro, Refrigerante a canna liscia, Imbutto gocciolatore, Beuta da 100 mL, Pallone da 100 mL, Imbutto separatore.

Macinare grossolanamente le spezie nel mortaio e pesarne la quantità richiesta; quindi porle nel pallone di distillazione unitamente a circa 150 mL di H₂O con qualche ebollitore.

Una volta montata l'apparecchiatura come illustrato nello schema, si scalda lentamente con mantello riscaldante fino ad ebollizione. Si raccoglie una miscela *torbida* di acqua e olio essenziale in una beuta continuando la raccolta fino a che condensino solo acqua.

Terminata la distillazione, nella beuta del distillato si aggiungono quindi 25 ml di Et₂O e si trasferisce il tutto in imbuto separatore in cui, dopo una leggera agitazione, si ha la separazione della fase acquosa dalla fase organica (superiore) . Quest'ultima viene separata e trasferita in una beuta; si ripete l'operazione una seconda volta sulla fase acquosa con altri 25 mL di etere. Le soluzioni eteriche unificate sono seccate aggiungendo Na₂SO₄ anidro (un cucchiaino da caffè). Dopo mezz'ora, la soluzione eterica è filtrata su filtro a pieghe per eliminare l'agente disidratante. Si concentra al rotavapor l'olio essenziale lasciando nel pallone ancora un po' di etere; Se l'estratto andasse completamente "a secco", aggiungere una pipettata di etere o acetone per diluire l'olio, che viene analizzato in TLC.

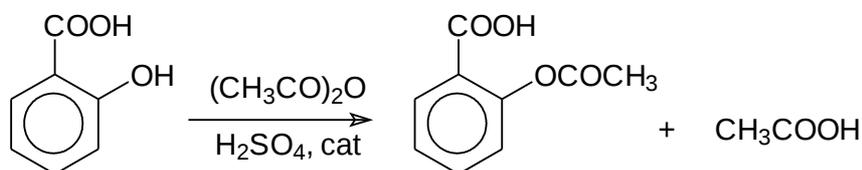
Eluire con cicloesano / acetato d'etile = 90:10

Esaminare la lastrina con luce UV

Segnare con matita: punto di deposizione, fronte del solvente, posizione delle macchie visibili. Riportare gli R_f delle macchie osservate.

4) ACETILAZIONE DELL'ACIDO SALICILICO (SINTESI DELL'ASPIRINA)

REAZIONE:



REAGENTI

- 1) Acido salicilico, 5 g (PM = 138.12)
- 2) Anidride acetica 7 ml
- 3) Acido solforico 98%, 7 gocce
- 4) 10 ml EtOH

APPARECCHIATURA.

- 1) Beuta da 100 o da 250 ml
- 2) Imbuto Buchner
- 3) Beuta codata da vuoto
- 4) Bagno ad acqua

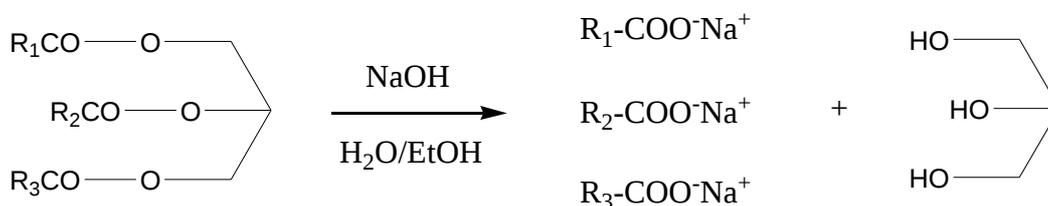
PRODEDIMENTO

Pesare circa 5 g di acido salicilico e porli in una beuta **asciutta** da 100 o da 250 ml. Aggiungere sotto cappa aspirante 7 ml di anidride acetica e poi 7 gocce di H₂SO₄ conc. Fissare la beuta ad un sostegno con una pinza e scaldare in un bagnomaria a circa 60-70 °C (non ad ebollizione) agitando saltuariamente, con una bacchetta di vetro. Dopo alcuni minuti la soluzione potrebbe diventare limpida e in seguito si può riseparare un solido bianco. Si continua in ogni caso a scaldare altri 15 minuti.

Staccare la beuta dal sostegno, far raffreddare brevemente ed aggiungere 75 ml di H₂O. Agitare bene il tutto e quindi filtrare alla pompa ad acqua su Buchner (pinzare la beuta da vuoto!), spremere bene il solido e lavarlo una volta con 10 ml di H₂O.

Trasferire il solido in una beuta da 50 ml aggiungendo 15 ml di etanolo e scaldare su piastra fino a che si scioglie. Contemporaneamente scaldare bene 35-40 ml di acqua in una seconda beuta; versare la soluzione alcolica calda nell'acqua calda (se la soluzione si intorbida scaldare un poco sulla piastra fino a limpideità), poi lasciare raffreddare. Dalla soluzione si separano cristalli bianchi di aspirina. Se non precipita, raffreddare molto bene e a lungo sotto il getto d'acqua del rubinetto, sfregando le pareti interne della beuta con una bacchetta di vetro o spatola. Filtrare su buchner e lasciare asciugare all'aria. Il giorno dopo determinare il p.f. pesarlo e calcolare la resa %.

6) SAPONIFICAZIONE DI UN GRASSO



Quantità:	Olio	10 g
	NaOH	5 g
	H ₂ O	20 mL
	EtOH 96°	20 mL
	NaCl	50 g

Vetreteria: n° 1 beker da 250 mL, n° 1 beker da 400 mL, bacchetta di vetro, Buchner e beuta per filtrazione.

10 g di Olio vengono posti in un beker da 250 mL.

5 g di NaOH vengono sciolti in una miscela costituita da 20 mL di acqua e 20 mL di etanolo e la soluzione così preparata viene aggiunta al grasso da saponificare; si procede al riscaldamento a *bagnomaria* per almeno 1 ora agitando bene e sempre con la bacchetta di vetro.

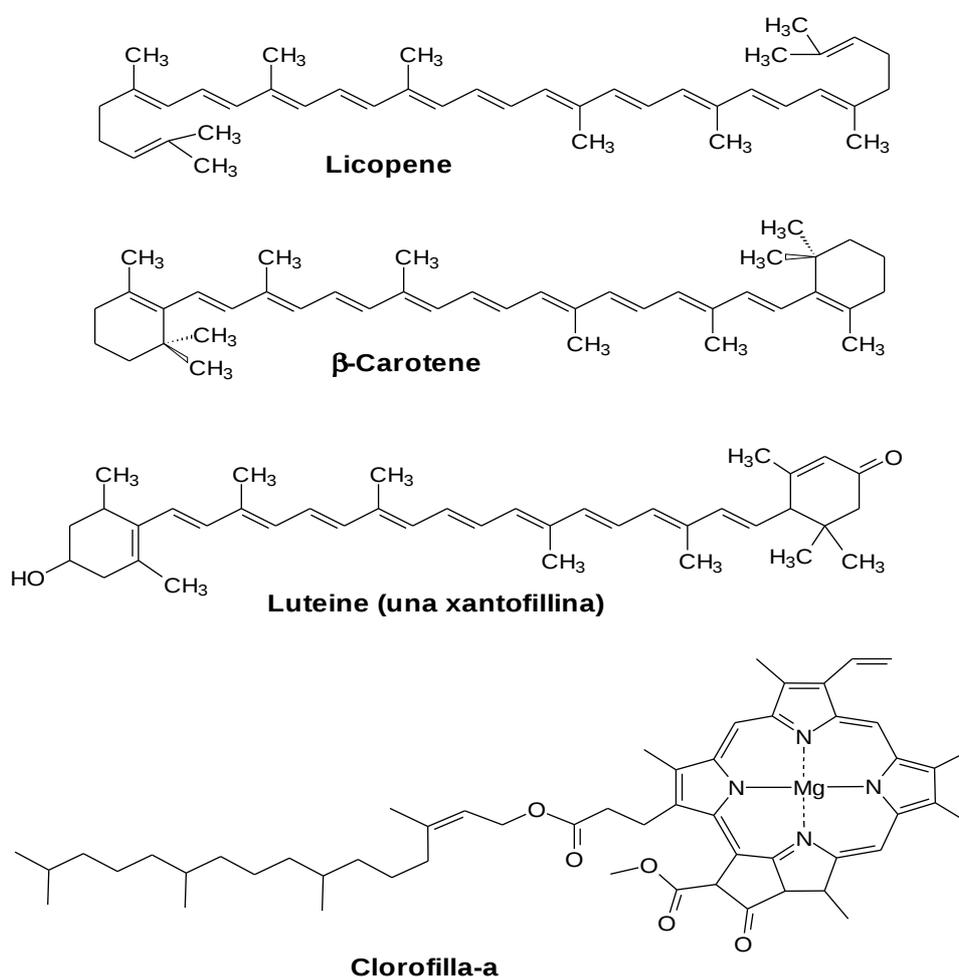
Vengono nel frattempo preparati altri 40 mL di soluzione acqua/etanolo 1/1 che vengono aggiunti poco alla volta durante il riscaldamento. La fase liquida (olio) dovrebbe sparire e si dovrebbe formare un solido biancastro pastoso.

Si prepara una soluzione costituita da 50 g di NaCl in 150 mL di acqua in un beker da 400 mL. Una volta ottenuta una soluzione limpida (scaldare se necessario e poi raffreddare di nuovo), la miscela di reazione viene versata rapidamente nella soluzione salina fredda. Agitare bene e poi raffreddare subito con bagno di ghiaccio. Il sapone precipitato viene filtrato sotto vuoto con Buchner (pinzare la bauta da vuoto!) e lavato con acqua ghiacciata. Si lascia asciugare bene sotto vuoto per lungo tempo e per una notte.

Pesare il sapone.

6) ESTRAZIONE DEI PIGMENTI DA FOGLIE VERDI E LORO ISOLAMENTO PER CROMATOGRAFIA.

INTRODUZIONE. Le foglie di piante verdi contengono in aggiunta alla clorofilla -a e -b altri pigmenti. Questi sono responsabili del colore giallo arancio delle foglie morte, e diventano visibili solo quando la foglia perde la clorofilla. Tra questi pigmenti i più diffusi sono: i carotenoidi che includono caroteni, ed i loro analoghi ossigenati detti xantofilline. Il β -catotene di colore arancio brillante (del quale sono ricche le carote) è importante perché è trasformato nel fegato a vitamina A, essenziale per la visione.



PARTE A- ESTRAZIONE DEI PIGMENTI

Reagenti: 20 ml EtOH
3 x 5 ml di CH_2Cl_2 .
Soluzione acquosa satura di NaCl.
Cicloesano 10 ml
Acetato di etile 10 ml

PROCEDURA.

In un becker piccolo, o in una beutina da 50 ml tagliare e sbriciolare per bene 2 g di foglie verdi. Facendo uso della spatola o di un pestello di vetro, schiacciare e spappolare le foglie in presenza di 20 ml di etanolo al fine di disidratare le foglie.

Rimuovere quindi con una pipetta l'etanolo.

Si procede quindi alla estrazione dei pigmenti dalle foglie macinate, **tre volte** con 3 mL di CH_2Cl_2 nel becker o nella beuta, unendo gli estratti in una provetta. La fase organica così costituita viene lavata con 5 ml di una soluzione satura di NaCl (tappare bene la provetta col pollice (guanti) e agitare) . Quindi lasciare che si separino le fasi (la fase organica è sotto) e rimuovere il più possibile la soluzione acquosa con una pipetta. Seccare la fase organica con una spatolata di MgSO_4 o Na_2SO_4 , lasciando riposare la soluzione per 15 minuti. Con una pipetta travasare la fase organica senza prelevare l'agente disidratante in un palloncino asciutto (capienza massima 50 ml). Concentrare la soluzione al rotavapor sino a ottenere circa 1 ml.

Depositare con un capillare fine di vetro il contenuto su TLC (lastrina di alluminio, ricoperta di uno strato sottile di silice) depositando in molti punti vicini in modo da ottenere una banda alla base della lastrina.

Eluire la deposizione con cicloesano : acetato = 1 : 1

Esaminare la lastrina con luce UV alle due lunghezze d'onda, segnando con la matita il punto di deposizione, le macchie visibili e il fronte del solvente

Descrivere i colori e calcolare gli R_f delle macchie osservate.

Tenere gli estratti nel palloncino per la separazione su colonna di silice

PARTE B. SEPARAZIONE MEDIANTE CROMATOGRAFIA SU COLONNA. (esperienza da svolgere in coppia. riunire gli estratti di due studenti)

Impaccamento della colonna. Riempire la colonna fino a circa un terzo con la miscela eluente, Cicloesano-Acetato d'Etile 90/10 ponendo una beuta (asciutta) sotto la colonna ed aprire il rubinetto in modo da bagnare il setto di vetro. Porre la quantità fornita di fase stazionaria in un beaker (asciutto) ed aggiungere un po' di miscela eluente, agitando con una bacchetta di vetro in modo da eliminare grumi e bolle d'aria. Sempre agitando, versare la sospensione così ottenuta nella colonna attraverso un imbuto. Aprire completamente il rubinetto e lasciare depositare il gel di silice facendo scorrere il solvente (riciclare il solvente che cola dal basso, se necessario). La colonna è "impaccata" quando il livello del gel di silice non scende più anche dopo aver battuto la colonna

con un tubo di gomma o con le mani. La colonna non deve essere mai lasciata a secco.

Caricamento della colonna. Si fa eluire il solvente fino al limite della fase stazionaria creando l'effetto "bagnasciuga". Chiudere il rubinetto e preparare una soluzione dell'estratto di foglie verdi con 1 mL di miscela eluente e con una pipetta (asciutta) cautamente e lentamente depositare la soluzione sul gel di silice facendola colare lungo le pareti della colonna. Aprire il rubinetto e riportare il livello del liquido a quello della superficie del gel. Chiudere il rubinetto e proseguire l'operazione fino ad esaurimento della soluzione da cromatografare. Con un paio di pipette di solvente fresco lavare le pareti della colonna; aprire il rubinetto e fare entrare in colonna anche questa soluzione. Completate le operazioni di lavaggio, si carica il solvente di eluizione (con cautela all'inizio) riempiendo la colonna fino in cima.

Cromatografia. Si eluisce il solvente in colonna raccogliendole frazioni in provette o beute pulite ed asciutte. Si osserverà la banda gialla (corrispondente ai carotenoidi) che mano a mano viene eluita mentre le clorofille colorate di verde restano al palo. Raccogliere le frazioni fino a quando la banda gialla è scesa completamente. A questo punto si procederà all'aumento di polarità dell'eluente aggiungendo la miscela Cicloesano/Acetato d'Etile 50/50. Si continua ad eluire fino a che sarà scesa la banda di colore verde corrispondente alle clorofille. (se necessario, aggiungere altro solvente alla colonna in modo che non vada a secco).

Il contenuto di ognuna delle frazioni raccolte viene controllato con TLC, verificandone il contenuto ed unendo fra di loro le frazioni omogenee. Sulla lastrina depositare più capillari della stessa frazione nello stesso punto in modo da avere una macchia già visibile ad occhio nudo. Copiare le lastrine.