

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
Wydział Chemii



Chemia produktów naturalnych – – wybór ćwiczeń

Opracowanie: Joanna Kurek, Anna K. Przybył i Maria Chrzanowska

Wydanie II rozszerzone

Poznań 2016

ISBN 978-83-62783-07-6

Spis treści	<i>strona</i>
Wstęp	4
1. Izolacja aldehydu cynamonowego z kory cynamonowca	5
2. Izolacja kwasu cytrynowego z cytryny	10
3. Fenyloalanina (kwas 2-amino-3-fenylopropanowy)	14
4. Lipidy	18
4.1. Kwas oleinowy z oleju roślinnego	18
4.2. Izolacja trimirystyny z gałki muszkatołowej i określanie liczby estrowej	22
4.3. Kwas mirystynowy z trimirystyny	26
4.4. Mirystynian metylu (mirystynian etylu) z kwasu mirystynowego	29
4.5. Alkohol mirystynowy	32
4.6. Izolacja kwasów tłuszczowych z migdałów i oznaczanie liczby jodowej	35
4.7. Izolacja kwasów tłuszczowych z wiórków kokosowych i oznaczanie liczby jodowej	38
4.8. Izolacja masła kakaowego z gorzkiej czekolady	40
4.9. Otrzymywanie mydeł sodowych i potasowych	43
5. Ergosterol z drożdży piekarskich	47
6. Węglowodany	50
6.1. Laktoza z mleka	50
6.2. D-Galaktoza z laktozy	53
6.3. Kwas śluzowy z galaktozy	56
6.4. 1,2,3,4,6-Penta-O-acetylo- α -D-glukopiranoza	58
6.5. Łączenie zapachów i kolorów – formowanie alginianowych kuleczek/mikrokapsułek	60
7. Alkaloidy purynowe	63
7.1. Izolacja teobrominy z kakao	63
7.2. Metylowanie teobrominy do kofeiny	67
8. Terpeny	70
8.1. (S)-(+)-Karwon z nasion kminku	70
8.2. Mentol oraz (R)-(-)-karwon z mięty ogrodowej (pieprzowej)	73
8.3. Pozyskiwanie olejku rozmarynowego	76
8.4. Otrzymywanie olejku imbirowego i jego zastosowanie do preparatów pielęgnacyjnych	80
9. Olejek kawowy – destylacja zmielonych ziaren kawy Arabica z parą wodną	83
10. Otrzymywanie olejku lawendowego z kwiatów lawendy	87

11. Benzylidenoacetofenon (Chalkon)	90
12.1. Synteza flawonu	93
12.1.1. o-Benzoiloksoacetofenon	93
12.1.2. o-Hydroksydibenzoilometan	97
12.1.3. Flawon	100
12.2. Izolacja flawonoidów i reakcje barwne	103
13. Antocyjany	109
13.1. Reakcje barwne antocyjanów izolowanych z owoców dzikiej róży i głogu, kwiatów hibiskusa i malwy czarnej	109
13.2. Izolacja i badanie wpływu odczynu roztworu na barwę antocyjanów zawartych w owocach dzikiej róży i głogu, kwiatach hibiskusa i malwy czarnej	111
13.3. Izolacja i identyfikacja antocyjanów zawartych w czerwonych owocach	112
14. Literatura	116

Fotografie: Joanna Kurek

Wstęp

Chemia produktów naturalnych związana jest z naturą i jej zjawiskami, roślinami, zwierzętami, żywnością, chorobami, truciznami, itp. Całe nasze otoczenie, z wyjątkiem minerałów i materiałów syntetycznych, składa się z produktów pochodzenia naturalnego. Studia „chemiczne” w obszarze produktów naturalnych, w tym pozyskiwania substancji aktywnych biologicznie, rozpoczęto tysiące lat temu. Tradycyjna chemia produktów naturalnych obejmuje wyizolowanie składnika aktywnego z materiału roślinnego czy też zwierzęcego a następnie określenie jego struktury i potwierdzenie jej na drodze syntezy całkowitej. Kolejny krok to zbadanie jego aktywności biologicznej. Zainteresowanie związkami pochodzenia naturalnego przyczyniło się w znacznym stopniu do rozwoju całej chemii organicznej – metod izolacji i identyfikacji związków a także metod syntezy. Przykładowo, izolowanie olejków eterycznych z roślin, stosowanych m. in. jako perfumy, przyczyniło się do udoskonalenia technik destylacji. Rozwój chemii produktów naturalnych związany jest też w dużym stopniu z rozwojem medycyny naturalnej, a w szczególności z roślinami leczniczymi, które ludzkość stosowała od bardzo dawna i kierunek ten jest nadal kontynuowany. Można zaryzykować stwierdzenie, iż chemia produktów naturalnych stanowiła i nadal stanowi siłę napędową rozwoju chemii organicznej.

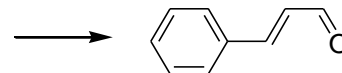
Zajęcia z chemii produktów naturalnych zostały wprowadzone do programu studiów na Wydziale Chemii UAM w roku akademickim 2005/2006. Początkowo odbywały się w formie wykładów, później wzbogacone zostały o ćwiczenia laboratoryjne. Pierwsze materiały do ćwiczeń laboratoryjnych zostały umieszczone w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej w 2010 roku. Niniejszy skrypt jest drugim rozszerzonym wydaniem i zawiera wybór ćwiczeń dotyczących m. in. takich grup produktów naturalnych jak aminokwasy, lipidy, terpeny, steroidy, węglowodany, czy też alkaloidy. Część ćwiczeń obejmuje izolację substancji aktywnych z materiału roślinnego, pozostałe – syntezę konkretnych związków. Do opisów ćwiczeń dołączone są dane spektroskopowe. Skrypt przeznaczony jest dla studentów studiów stacjonarnych I stopnia specjalności chemia biologiczna, kosmetyczna i ogólna oraz studentów studiów stacjonarnych II stopnia specjalności chemia kosmetyczna Wydziału Chemii UAM a także wszystkich zainteresowanych chemią produktów naturalnych.



1. Izolacja aldehydu cynamonowego z kory cynamonowca



SPROSKOWANA KORA CYNAMONOWCA



ALDEHYD CYNAMONOWY

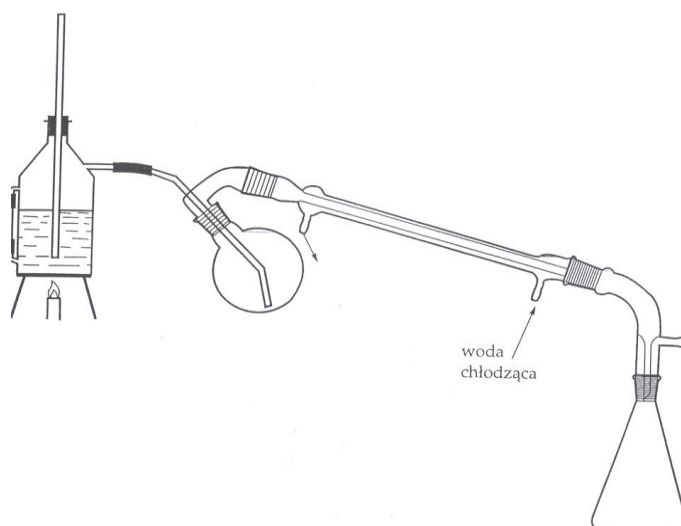
Odczynniki:

kora cynamonowca	30 g
octan etylu lub chloroform	250 mL
KOH	28 g
chlorowodorek hydroksyloaminy	4 g
bezw. Na ₂ SO ₄	
alkohol etylowy	580 mL
błękit bromofenolowy	0,4 g
NaOH	2 g
0.5 M HCl	

Aparatura i szkło:

zestaw do destylacji z parą wodną
rozdzielacz poj. 250 mL
kolba okrągłodenna poj. 250 mL
zlewka poj. 250 mL
biureta 50 mL
chłodnica zwrotna

Zestaw do destylacji z parą wodną



Olejek cynamonowy – olejkodajne są liście, korzenie i kora drzewa. Olejek cynamonowy pozyskiwany jest głównie z dwóch gatunków drzew: cynamonowca cejlońskiego *Cinnamomum zeylanicum* Blume i cynamonowca wonnego *Cinnamomum cassia* Blume (oba gatunki należą do rodziny wawrzynowatych *Lauraceae*). Zawartość olejku w korze wynosi 1-1,5%, a w liściach 1,5-2%. W olejku cynamonowym najwięcej jest aldehydu cynamonowego (75-90%) i eugenolu (5-10%) oraz w nieznacznym ilościach obecne są: aldehyd benzoesowy, aldehyd dihydrocynamonowy, octan cynamylu i kuminol. Olejek otrzymany z kory zawiera zdecydowanie więcej aldehydu cynamonowego niż olejek otrzymany z liści. Natomiast w olejku z liści jest znacznie większa zawartość eugenolu niż w olejku z kory.

Właściwy olejek uzyskuje się z kory. Destylacja z parą wodną nie jest łatwa, bo aldehyd cynamonowy ulega szybkiemu utlenieniu do kwasu; wydajność ok. 0,2%. O jakości olejku cynamonowego nie decyduje zawartość aldehydu cynamonowego, lecz składniki niealdehydowe. Zapach olejku jest przyjemny cynamonowy, korzenny, słodki. Charakteryzuje się palącym smakiem. Ma duże znaczenie w przemyśle spożywczym do aromatyzowania wyrobów cukierniczych, napojów orzeźwiających, sosów, w perfumerii i kosmetyce natomiast ma ograniczone zastosowanie do wyrobu perfum typu orientalnego i aromatyzowania środków do pielęgnacji jamy ustnej. Olejek analizuje się za pomocą metody hydroksyloaminowej.

Celem ćwiczenia jest pozyskanie olejku, ze sproszkowanej kory cynamonowca, którego głównym składnikiem jest aldehyd cynamonowy oraz oznaczenie liczby karbonylowej w otrzymanym olejku i wykonanie analizy TLC.

Zmontować zestaw do destylacji z parą wodną tak, jak jest to pokazane na rysunku na str. 5. W kolbie umieścić 30 g kory cynamonowca i dodać 100-150 mL wody destylowanej. Destylację prowadzić do momentu uzyskania 300 mL destylatu. Proces prowadzić pod sprawnie działającym wyciągiem. Destylat przenieść do rozdzielacza i ekstrahować chloroformem lub octanem etylu (5 x 50 mL). Otrzymane ekstrakty połączyć i suszyć nad bezwodnym siarczanem sodu (ok. 30 min, mieszając za pomocą mieszadła magnetycznego). Następnie zatężyć pod zmniejszonym ciśnieniem. Obliczyć wydajność otrzymanego olejku. Aldehyd cynamonowy – żółta ciecz o t.wrz. 248 °C.

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

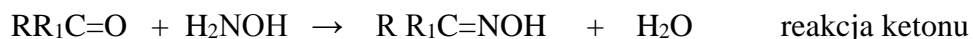
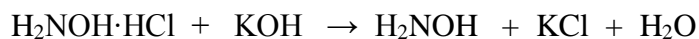
Eluent: chlorek metylenu.

Na płytkę TLC nanieść wzorce: kwas benzoesowy, aldehyd benzoesowy, kwas cynamonowy. Po wysuszeniu płytki sprawdzić rezultat pod lampą UV. Na podstawie analizy TLC określić, który ze składników (kwas benzoesowy, aldehyd benzoesowy, kwas cynamonowy) jest obecny w badanym olejku.

OZNACZANIE LICZBY KARBONYLOWEJ

Oznaczeniu podlegają grupy karbonylowe aldehydów i ketonów znajdujące się w danym olejku. Liczba karbonylowa została wprowadzona do analizy olejków eterycznych przez Stillmana i Reeda w 1934 roku.

Liczba karbonylowa (L.karb.) jest to ilość miligramów wodorotlenku potasowego równoważna takiej ilości hydroksyloaminy, która jest potrzebna do przeprowadzenia w oksymy aldehydów i ketonów znajdujących się w 1 g olejku.



Otrzymanie roztworu do wykonania oznaczenia liczby karbonylowej.

Najpierw przygotować roztwór indykatora (błękitu bromofenolowego), który w kolejnym etapie zostanie dodany do roztworu chlorowodoru hydroksyloaminy.

Roztwór indykatora sporządzić rozcierając w moździerzu 0,4 g błękitu bromofenolowego z 12 mL 0,05 M wodorotlenku sodu. Mieszaninę rozcieńczyć wodą do objętości 100 mL.

4 g Chlorowodoru hydroksyloaminy (cz.d.a.) rozpuścić w 8 mL wody i dodać 80 mL alkoholu etylowego. Następnie mieszając wprowadzić 60 mL 0,5 M alkoholowego roztworu wodorotlenku potasu i 10 mL otrzymanego wcześniej roztworu błękitu bromofenolowego, a potem ewentualnie szybko sączyć na zwykłym lejku w celu usunięcia nierozpuszczonych składników. Tak przygotowany roztwór stosuje się do oznaczania liczby karbonylowej w badanym olejku.

Na wykonanie oznaczenia 1 g badanego olejku potrzeba 74 mL końcowego roztworu, więc podane ilości odczynników należy odpowiednio pomniejszyć.

WYKONANIE OZNACZENIA LICZBY KARBONYLOWEJ

Do 1 g olejku dodać 37 mL roztworu indykatora i hydroksyloaminy (wg procedury podanej powyżej) i gotować na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną przez 1 godzinę. Następnie po oziębieniu odmiareczkować nadmiar nieprzereagowanej zasady (wodorotlenek potasu, hydroksyloamina) 0,5 M kwasem solnym (zmiana barwy z fioletowej na żółtą). Równocześnie przeprowadzić oznaczenie kontrolne dla samego roztworu indykatora i hydroksyloaminy (37 mL).

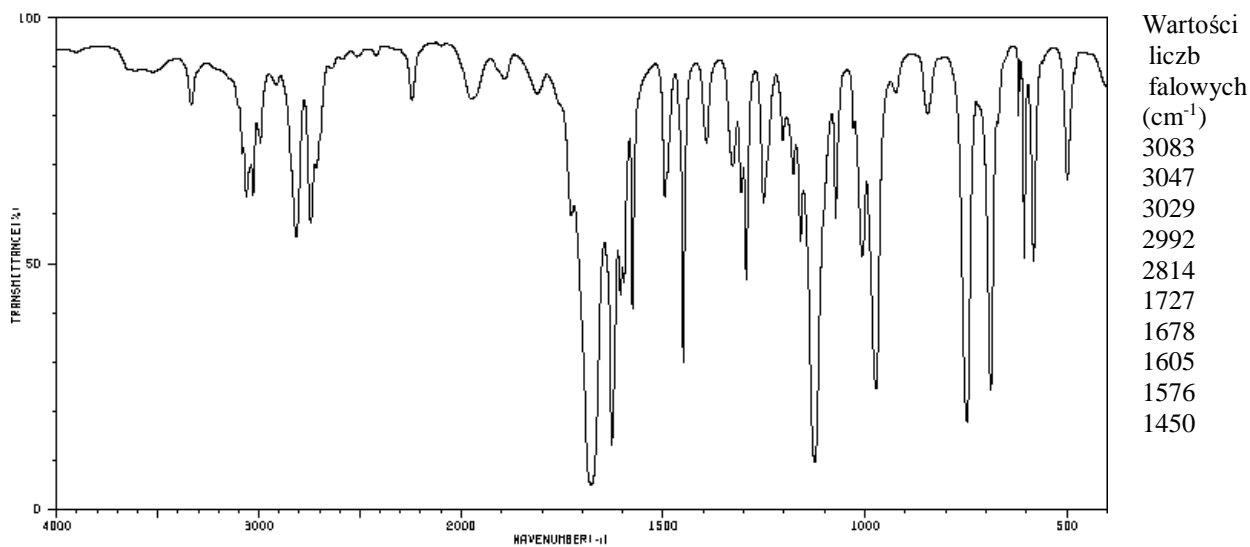
Przy założeniu, że 1 cząsteczka wodorotlenku potasu odpowiada 1 cząsteczce hydroksyloaminy, **liczbę karbonylową** oblicza się ze wzoru:

$$L.\text{karb.} = \frac{(B - A) \cdot 28}{S}$$

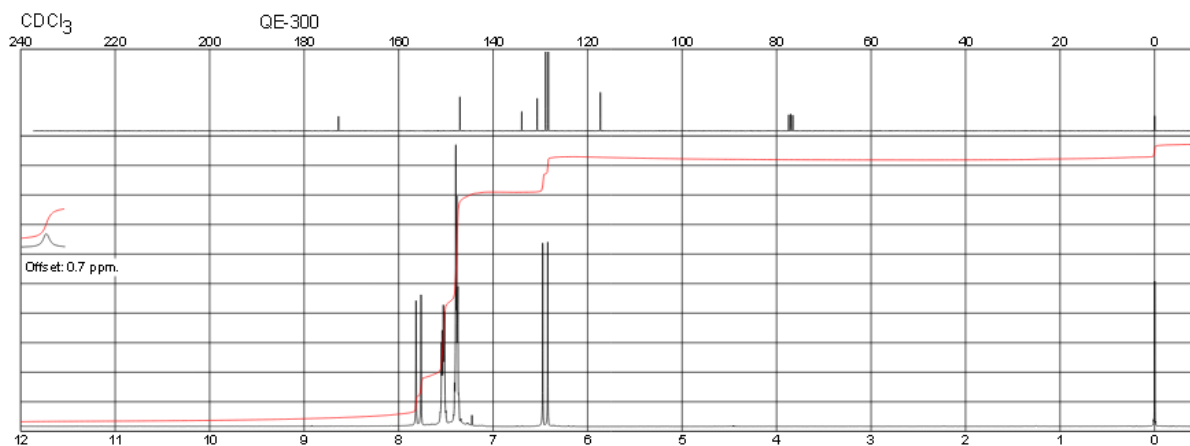
A – liczba mL 0,5 M roztworu kwasu solnego zużytego do miareczkowania badanej próbki
B – liczba mL 0,5 M roztworu kwasu solnego zużytego w próbie kontrolnej
S – ilość olejku w gramach

Dane spektroskopowe aldehydu cynamonowego

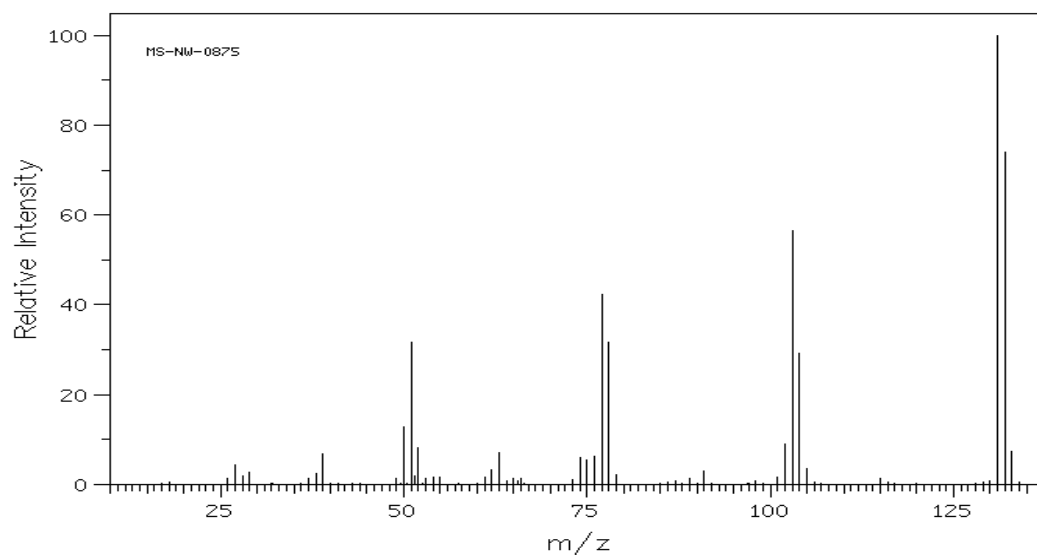
Widmo IR (film)



Widma ¹H NMR i ¹³C NMR w CDCl₃ (katalog Sigma Aldrich)



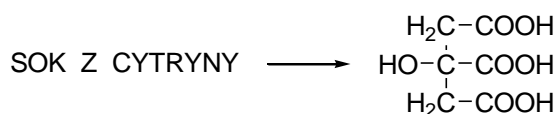
Widmo EI-MS (M=132,2 g/mol)



Zagadnienia

- Metody wyodrębniania składników z surowców roślinnych
- Destylacja z parą wodną (zasada działania)
- Aldehydy (reaktywność)
- Reaktywność związków zawierających wiązanie podwójne C=C
- Analiza widm produktu

2. Izolacja kwasu cytrynowego z cytryny



Odczynniki:

sok z cytryny (3 cytryny - ok. 100 mL)
chlorek wapnia 5 g
10% CaCl_2
2 M H_2SO_4
2 M HCl
2 M NaOH

Aparatura i szkło:

mieszadło magnetyczne
zlewka poj. 250 mL (3 szt.)
cylinder miarowy (2 szt.)
zestaw do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem
kolba poj. 100 mL
pipety (2 szt.)
pipetki Pasteura
zlewka poj. 50 mL
bagietka szklana

Sok z cytryny, 100 mL, (odmierzony bez pestek i miąższu) wlać do zlewki (poj. 250 mL) i postawić na mieszadle magnetycznym. Do mieszanego roztworu ostrożnie dodawać 2 M NaOH , aż do odczynu lekko alkalicznego. Rozpoznanie tego momentu ułatwia zmiana zabarwienia roztworu z żółtej na lekko pomarańczową ($\text{pH} = 8$).

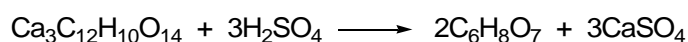
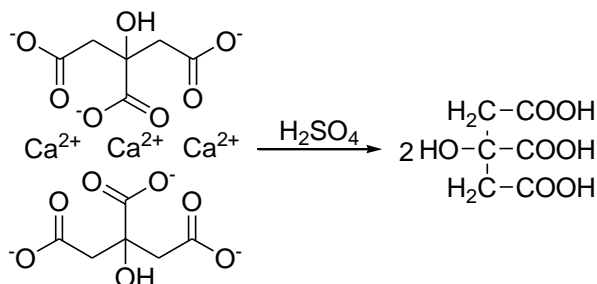
Otrzymaną mieszaninę przesączyć na lejku Büchnera z Celitem (ziemia krzemkowa). Do lejka włożyć sączonek i warstwę ziemi krzemkowej, którą należy dokładnie ubić na grubość 0,5 cm i na wierzch położyć kolejny sączonek. Na tak przygotowany lejek wylać przygotowaną mieszaninę. Klarowny przesącz przelać do zlewki i dodawać, cały czas mieszając na mieszadle magnetycznym, 50 mL 10% roztworu CaCl_2 .

Roztwór ogrzać do wrzenia i na gorąco odsączyć osad cytrynianu wapnia ($\text{Ca}_3\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_{14}$) na lejku Büchnera. Osad przemyć niewielką ilością wrzącej wody.

Surowy produkt rozpuścić na zimno w minimalnej ilości 2 M HCl , następnie do roztworu powoli wkropić 2 M NaOH do $\text{pH} = 7,5$ i całość ogrzać do wrzenia. Odsączyć wydzielony osad na lejku Büchnera i wysuszyć na powietrzu.

Zważyć i obliczyć zawartość procentową cytrynianu wapnia w soku z cytryny.

Otrzymywanie kwasu cytrynowego z cytrynianu wapnia



W celu przekształcenia soli w kwas, należy do otrzymanego cytrynianu wapnia dodać kwas siarkowy, w ilości wynikającej ze stechiometrii reakcji z uwzględnieniem stężenia roztworu kwasu siarkowego (2 M roztwór H_2SO_4), aż do uzyskania klarownego roztworu (maksymalna objętość około 100 mL).

Dokładnie wymieszać szklaną bagietką i odstawić mieszaninę na kilka minut. Następnie odsączyć wytrącony osad CaSO_4 i przesączyć zateżyc przez odparowanie wody na wyparce, do małej objętości (ok. 10 mL). Zateżony gorący roztwór przesączyć raz jeszcze przez lejek z watką i przesączyć przenieść do małej zlewki. Ochłodzić i pozostawić do krystalizacji.

Otrzymane kryształki kwasu cytrynowego odsączyć, wysuszyć na powietrzu i zważyć. Przesączyć pozostawić w celu otrzymania drugiej porcji kryształów. Obliczyć zawartość kwasu cytrynowego w soku z cytryny. Zmierzyć temperaturę topnienia (lit. t.t. 152-154 °C).

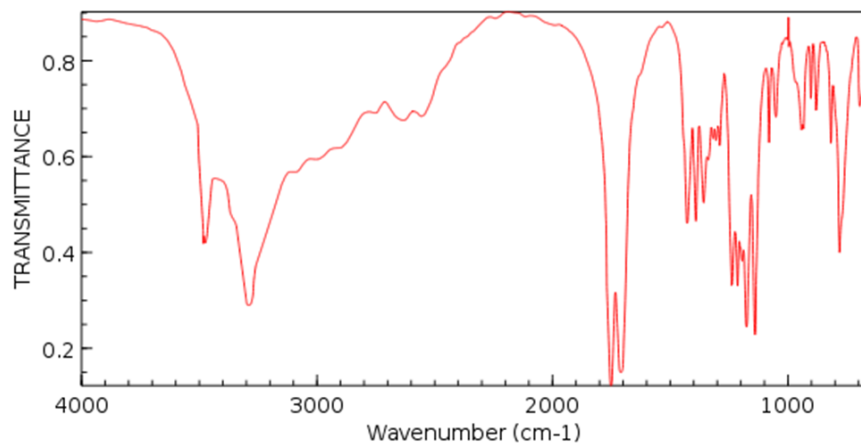
Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Eluenty: metanol-amoniak (5:2, v/v); heksan-octan etylu-etanol (3:3:1, v/v).

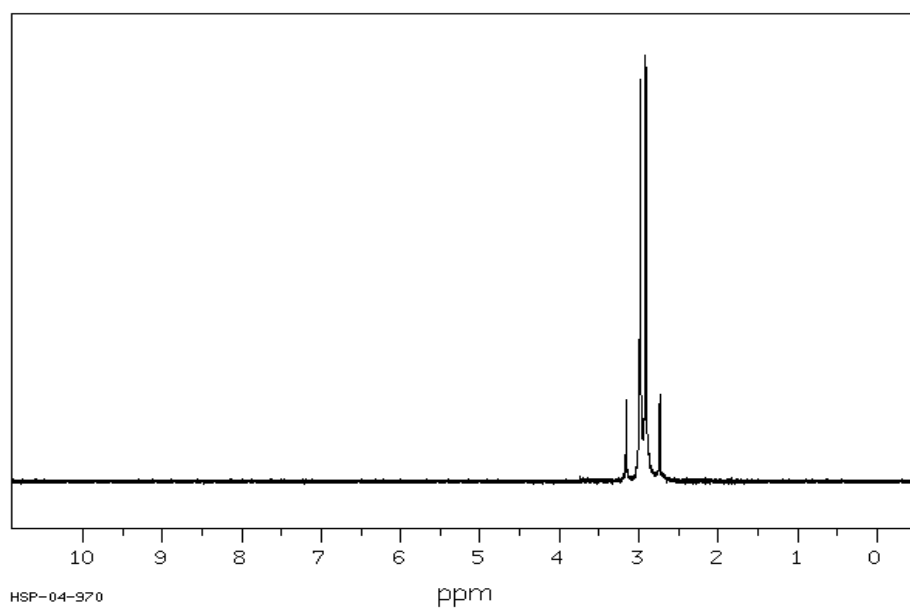
Na płytkę TLC nanieść wzorzec kwasu cytrynowego, otrzymany produkt oraz kroplę przesączu pozostawionego do krystalizacji. Po wysuszeniu płytkę TLC wywołać termicznie poprzez lekkie podgrzanie na płytce elektrycznej.

Dane spektroskopowe kwasu cytrynowego

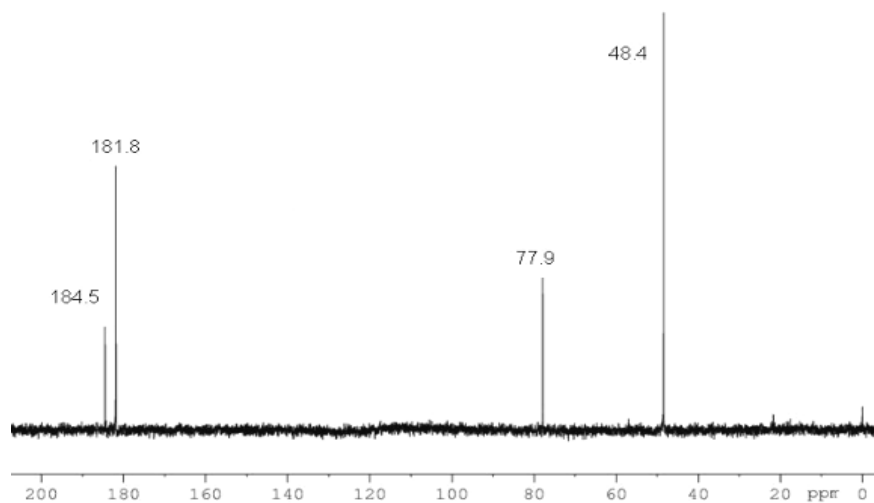
Widmo IR (KBr)



Widmo ^1H NMR w D_2O (90 MHz)



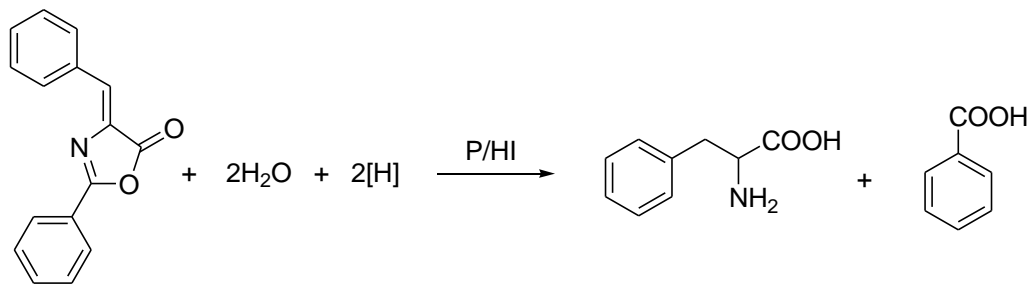
Widmo ^{13}C NMR w D_2O (100 MHz)



Zagadnienia

- Metody wyodrębniania składników z surowców roślinnych
- Kwasy karboksylowe: metody otrzymywania i reaktywność
- Cykl Krebsa
- Analiza widm produktu

3. Fenyloalanina (kwas 2-amino-3-fenylopropanowy)



Odczynniki:

4-benzylideno-2-fenylo-5-oksazolon	1 g
fosfor czerwony	0,8 g
bezwodnik octowy	5 mL
kwas jodowodorowy, 50% ($d=1,65 \text{ g/cm}^3$)	5 mL
lodowaty kwas octowy	10 mL
eter dietylowy	40 mL
siarczan(IV) sodu	
etanol	
amoniak stęż.	2 mL
węgiel aktywny	0,5 g

Aparatura i szkło:

kolba trójszyjna okrągłodenna poj. 50 mL
chłodnica zwrotna
mieszadło magnetyczne
wkraplacz
zestaw do sączenia pod zmniejsz. ciśnieniem
zestaw do destylacji prostej
rozdzielacz

W trójszyjnej kolbie okrągłodennej o pojemności 50 mL zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, mieszadło magnetyczne i wkraplacz umieszcza się 1 g 4-benzylideno-2-fenylo-5-oksazolonu, 5 mL bezwodnika octowego i 0,8 g oczyszczonego fosforu czerwonego. Do mieszaniny dodaje się powoli kroplami, przez cały czas mieszając, roztwór 5 mL kwasu jodowodorowego. Mieszaninę reakcyjną ogrzewa się do wrzenia przez 3 godziny, a następnie oziębia i sączy. Nieprzereagowany fosfor czerwony przemyć na sączku dwoma porcjami lodowatego kwasu octowego (po 5 mL). Oba przesącze (po przesączeniu mieszaniny reakcyjnej i przemyciu nieprzereagowanego fosforu) należy połączyć i przeprowadzić destylację. Destylat (który można użyć do kolejnej redukcji) zbiera się w kolbie ochłodzonej lodem, natomiast do suchej pozostałości dodaje się 5 mL wody i roztwór ponownie odparowuje do sucha na wyparce. Pozostałości po odparowaniu zadaje się 6 mL wody i 6 mL eteru dietylowego i dobrze wytrząsa do rozpuszczenia substancji stałych. Warstwę wodną oddziela się i ekstrahuje się trzy razy porcjami eteru dietylowego (po 10 mL). Ekstrakty eterowe odrzuca się. W celu usunięcia zabarwienia i zanieczyszczeń do warstwy wodnej dodać niewielką ilość węgla aktywnego (0,5 g) i siarczanu(IV) sodu i kolbkę z roztworem

ogrzewa na łaźni wodnej i odsącza osad. Przesącz następnie ogrzać do wrzenia i zobojętnić wobec papierka uniwersalnego dodając stężonego roztworu amoniaku (zużywa się około 2 mL). Po oziębieniu, bezbarwny produkt – DL-feniloalaninę odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i przemywa dwukrotnie porcjami zimnej wody, a na koniec niewielką ilością zimnego etanolu.

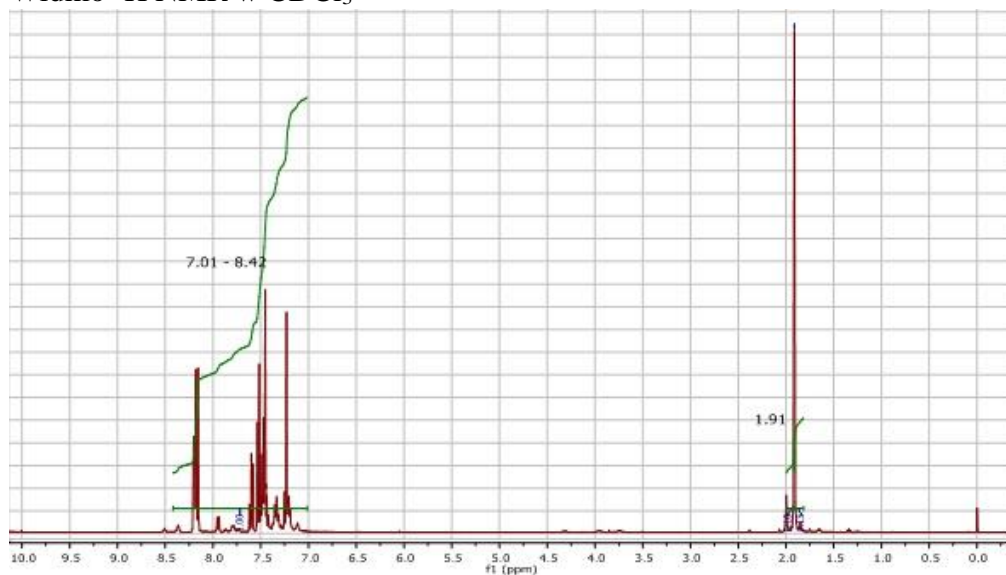
DL-Feniloalaninę o t.t. 284-288 °C (rozkład) otrzymuje się z 67% wydajnością.

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

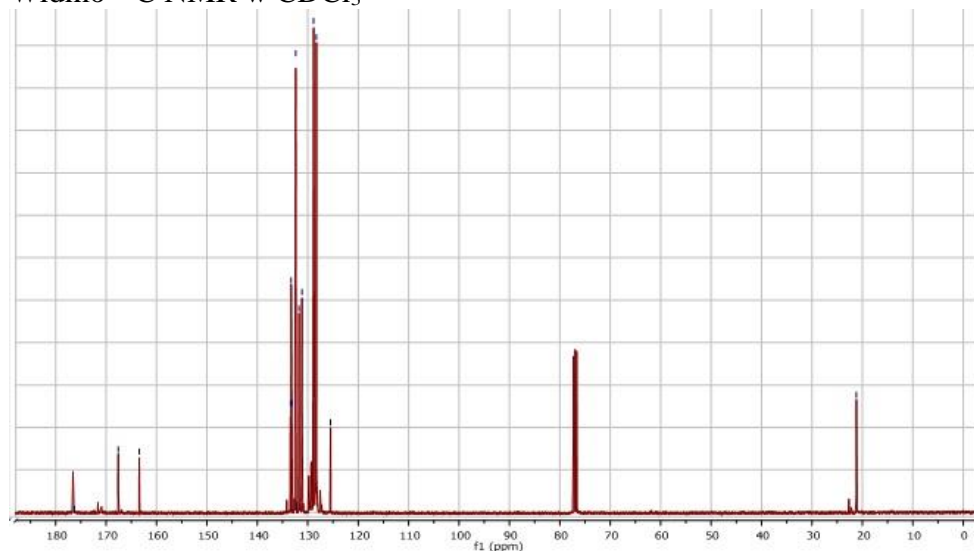
Na płytkę SiO₂ nanieść rozcieńczone w metanolu substraty oraz otrzymany produkt. Wsuszyć i płytkę wstawić do kuwety z eluentem: chlorek metylenu-etanol-heksan (6:1:3, v/v/v). Po wysuszeniu płytki rezultat odczytać pod lampą UV, a następnie płytkę wywołać w komorze z jodem.

Dane spektroskopowe 4-benzylideno-2-fenilo-5-oksazolonu

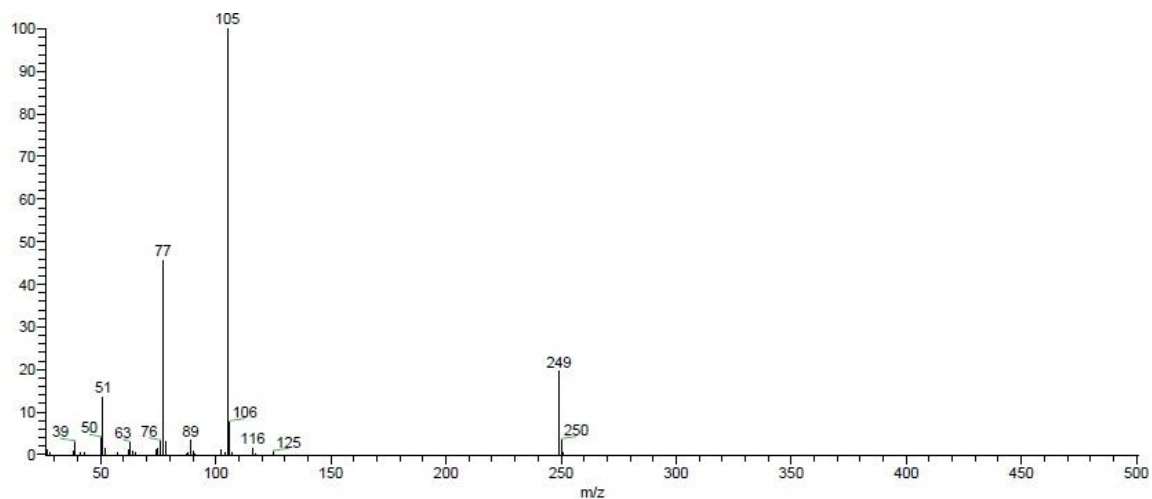
Widmo ¹H NMR w CDCl₃



Widmo ¹³C NMR w CDCl₃

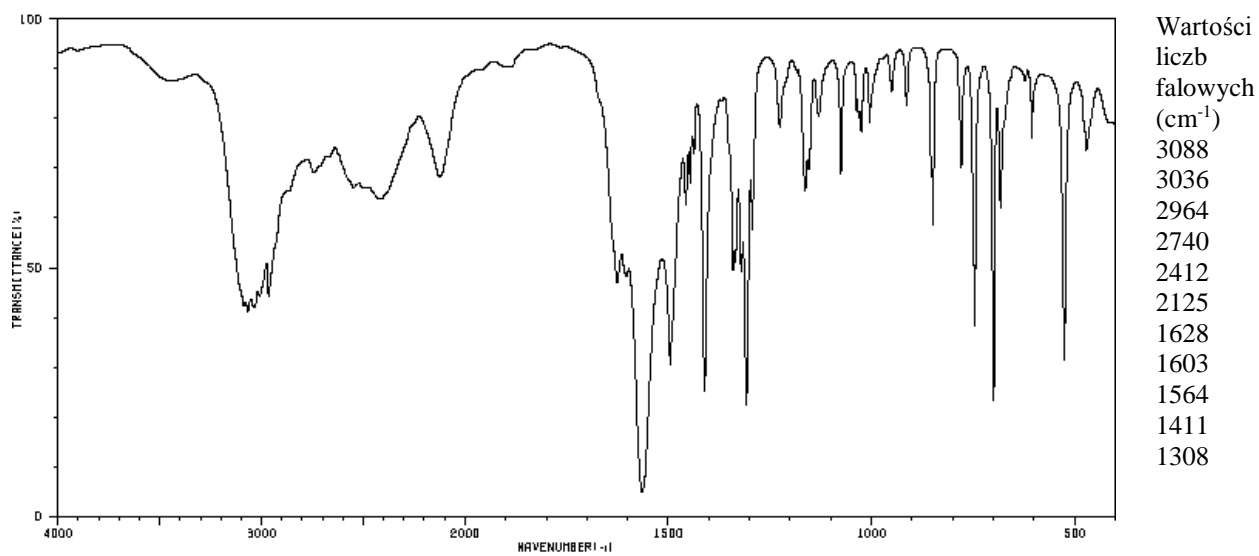


Widmo MS (M=249 g/mol)

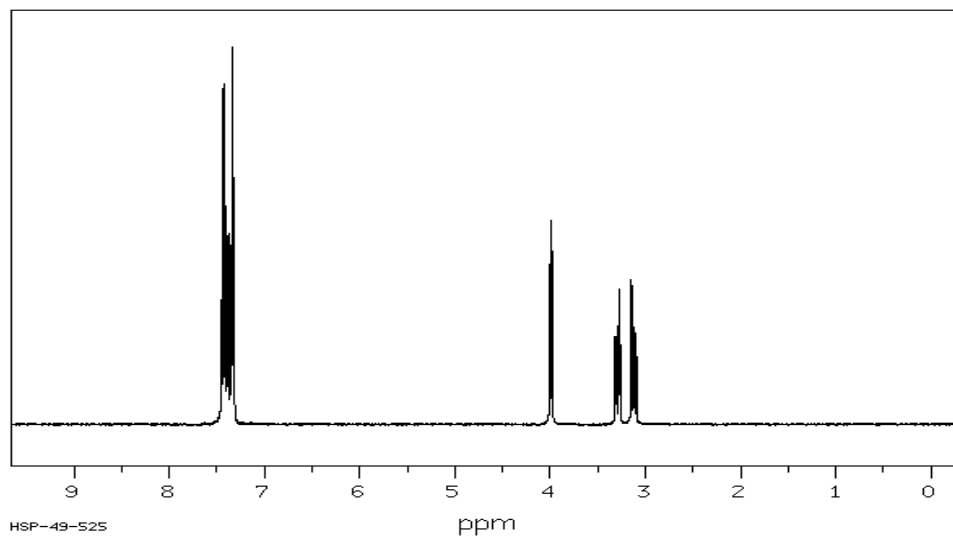


Dane spektroskopowe fenyloalaniny

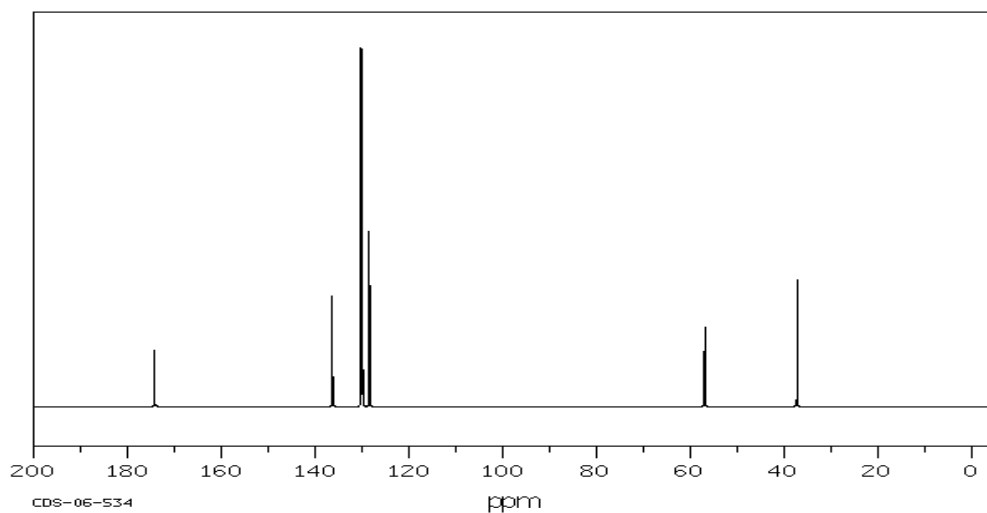
Widmo IR (KBr)



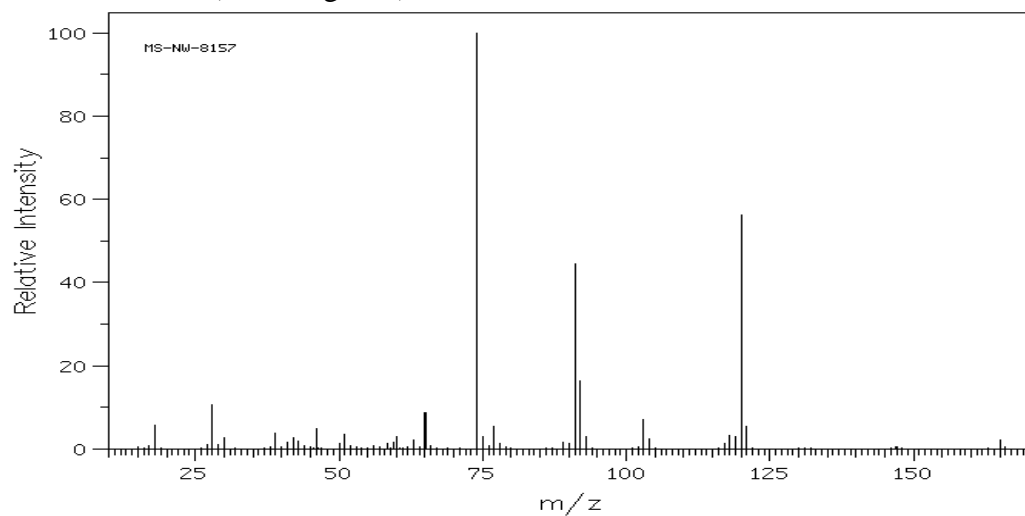
Widmo ¹H NMR w D₂O



Widmo ^{13}C NMR w D_2O



Widmo EI-MS ($M=165$ g/mol)

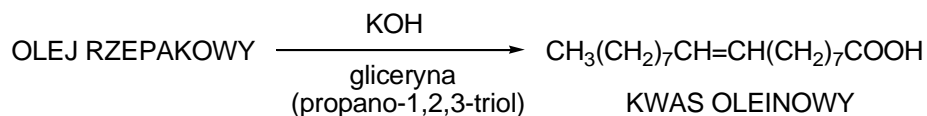


Zagadnienia

- Aminokwasy (budowa, właściwości, reaktywność)
- Reakcje blokowania grup karboksylowej i aminowej
- Analiza widm substratu i produktu

4. Lipidy

4.1. Kwas oleinowy z oleju roślinnego



Odczynniki:

olej rzepakowy	15 g
gliceryna	30 mL
KOH	3,45 g
eter dietylowy	90 mL
stęż. HCl	15 mL
NaCl	
bezw. Na ₂ SO ₄	
stały CO ₂ - aceton	
mocznik - metanol	
eter naftowy	

Aparatura i szkło:

mieszadło magnetyczne, mieszadełko
kolba kulista poj. 250 mL
łaźnia olejowa
cylinder miarowy
kolba kulista poj. 100 mL
lejek
kolba stożkowa poj. 250 mL
krystalizator
biureta

Hydroliza oleju roślinnego

W kolbie okrągłodennej o poj. 250 mL umieścić olej roślinny (15 g), wodorotlenek potasu (3,45 g) i glicerynę (30 mL). Kolbę zanurzyć w łaźni olejowej i doprowadzić do temperatury 160 °C. Zawartość kolby mieszać w tej temperaturze za pomocą mieszadła magnetycznego przez 5 minut, po czym ochłodzić do temperatury pokojowej (mieszanina w kolbie zaczyna krzepnąć). Do mieszaniny dodać 90 mL roztworu: 75 mL wody i 15 mL stężonego HCl, doprowadzając do pH = 1 (w kolbie wypada biały osad, nierozpuszczalny w wodzie; rozpuszczalny w eterze dietylowym). Całość przelać do rozdzielacza. Kolbę dodatkowo przemyć eterem dietylowym. Otrzymaną mieszaninę ekstrahować w rozdzielaczu eterem dietylowym 3 x 30 mL (mocno wytrząsać!). Połączone ekstrakty eterowe przemyć nasyconym roztworem NaCl i suszyć nad bezw. siarczanem sodu. Odsączyć środek suszący. Osad przemyć dodatkowo niewielką ilością eteru. Rozpuszczalnik usunąć pod zmniejszonym ciśnieniem i zważyć uzyskany surowy kwas oleinowy zanieczyszczony kwasami wielonienasyconymi m. in. linolowym i linolenowym.

Izolacja kwasów tłuszczowych

W celu uzyskania nasyconych kwasów tłuszczowych w postaci krystalicznej, surowy kwas oleinowy należy rozpuścić w 112,5 mL acetonu i schłodzić do temperatury $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ w łaźni stały CO_2 – aceton. Po pojawieniu się pierwszych kryształów mieszaninę chłodzić jeszcze przez 10 minut, ciągle mieszając. Otrzymane kryształy odsączyć **bardzo szybko**, na zimno, na lejku Büchnera (masa krystaliczna topi się nawet przy niewielkim ogrzaniu mieszaniny).

UWAGA! Mieszanina chłodząca: stały CO_2 – aceton daje temp. minimalną $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Założyć rękawice ochronne!

Otrzymuje się ok. 8 g frakcji (w postaci białych kryształów), zawierającej mieszaninę kwasów tłuszczowych: oleinowego, palmitynowego i stearynowego oraz przesącz, w którym pozostała jeszcze część kwasu oleinowego oraz inne kwasy tłuszczowe (nienasycone).

Wyodrębnienie czystego kwasu oleinowego

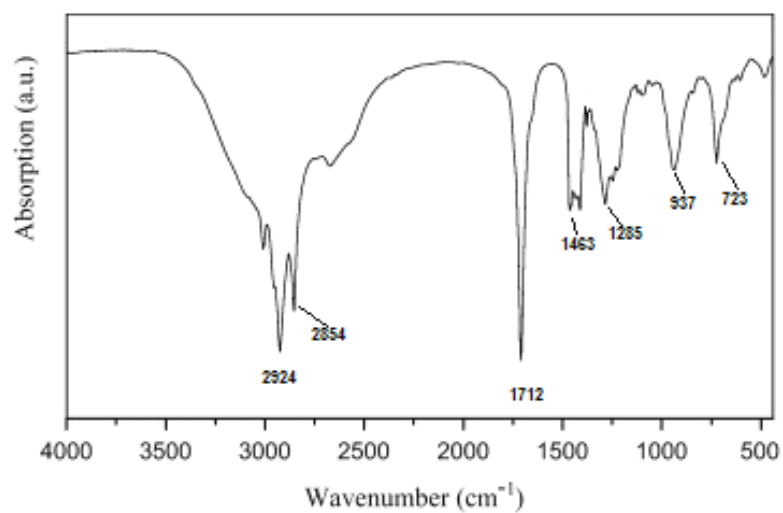
W celu wyodrębnienia z mieszaniny tłuszczu kwasu oleinowego, należy umieścić otrzymane kryształy (ok. 8 g) w kolbie o poj 100 mL, dodać 16,5 g mocznika* i całość rozpuścić w 75 mL metanolu. Mieszaninę ogrzać do rozpuszczenia oleju i przesączyć (osad na lejku zawiera zanieczyszczenia oraz nieprzereagowany mocznik). Klarowny przesącz pozostawić do krystalizacji. Otrzymane kryształy, ok. 4 g, kompleksu kwasu oleinowego z mocznikiem, odsączyć i wysuszyć na powietrzu. Zważyć i obliczyć wydajność procesu. Zmierzyć temperaturę topnienia (lit. t.t. $130\text{-}134\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Czysty kwas oleinowy (w postaci wolnej) można otrzymać przez rozpuszczenie otrzymanego kompleksu w 35 mL wody i ekstrakcję eterem naftowym (3 x 20 mL). Surowy ekstrakt przemyć nasyconym roztworem NaCl i suszyć nad bezwodnym Na_2SO_4 . Przesączyć roztwór do wytarowanej kolbki. Rozpuszczalnik odparować pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymuje się kwas oleinowy w postaci gęstniejącego oleju o t.t. $16\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zważyć produkt i obliczyć wydajność procesu.

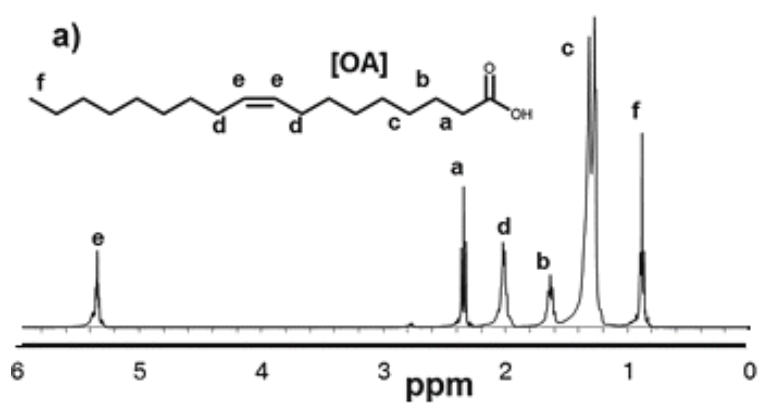
*Cząsteczki mocznika mają zdolność do wychwytywania związków posiadających długi łańcuch alkilowy. Ta zdolność „trzymania” cząsteczek alkilowych wiąże się z powstawaniem kanalików utworzonych przez wiązania wodorowe cząsteczek mocznika.

Dane spektroskopowe kwasu oleinowego

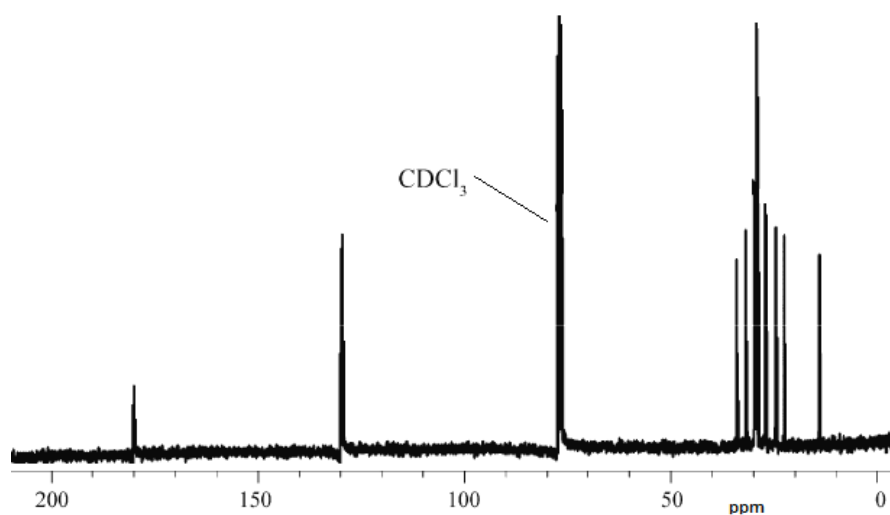
Widmo IR (film)



Widmo ¹H NMR w CDCl₃ (100 MHz)



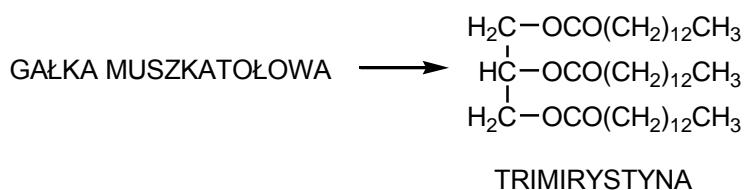
Widmo ¹³C NMR w CDCl₃ (100 MHz)



Zagadnienia

- Metody wyodrębniania składników z surowców roślinnych
- Lipidy (budowa, właściwości, reaktywność)
- Reakcje estryfikacji
- Reakcje zmydlania
- Analiza widm produktu

4.2. Izolacja trimirystyny z gałki muszkatołowej i określanie liczby estrowej



Odczynniki:

gałka muszkatołowa	40 g
eter dietylowy	100 mL
aceton	50 mL
fenoloftaleina	
KOH	0,28 g
metanol (do mianowanego roztworu KOH)	0,5 L
etanol	150 mL

Aparatura i szkło:

kolba okrągłodenna poj. 250 mL
 chłodnica zwrotna
 czasza grzejna na kolbę poj. 250 mL
 biureta 50 mL
 kolba miarowa poj. 500 mL
 kolby stożkowe poj. 250 mL (3 szt.)
 łopatką, bagietką
 zestaw do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem
 zlewki poj. 200 mL i 400 mL

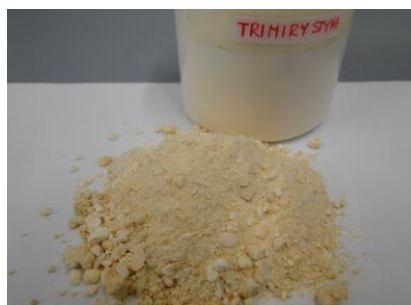
Olejek muszkatołowy – pozyskiwany jest z jądra nasiennego (gałki), drzewa muszkatołowca (*Myristica fragrans*), i osnówki pokrywającej jądro nasienne. Olejki z obu tych części są praktycznie nierozróżnialne, pod względem zapachu, smaku i składu chemicznego. Gałki rozdrabnia się i wytlóki destyluje z parą wodną. Wydajność procesu to ok. 6-16% wagowych olejku. Wydestylowanie całej ilości olejku wymaga 12-godzinnego procesu. Skład olejku: pinen, kamfen, *p*-cymen, borneol, geraniol, safrol, mirystycyna (jeden z najważniejszych składników olejku).

Mirystycyna jest toksyczna i ma działanie narkotyczne, w większych ilościach powoduje tłuszczową degenerację wątroby. W zmydlającej się części olejku stwierdzono obecność kwasów karboksylowych: mrówkowego, octowego, masłowego, mirystynowego (występuje zarówno jako wolny kwas, jak i w postaci estru). Olejek muszkatołowy znalazł zastosowanie w przemyśle spożywczym do aromatyzowania ciast, puddingów, pikli, do wyrobu likierów, wódek ziołowych, sztucznych aromatów owocowych i aromatyzowania czekolady. W perfumerii stosowany jest jako składnik kompozycji typu chypre, lawenda i goździk.

Celem ćwiczenia jest wyizolowanie lipidu – **trimirystyny**, zawartego w gałce muszkatołowej. W celu scharakteryzowania otrzymanego lipidu należy także określić wartość liczby estrowej trimirystyny.

W kolbie okrągłodennej o pojemności 250 mL umieścić zawiesinę 40 g zmielonej gałki muszkatołowej w 100 mL eteru dietylowego i ogrzewać łągodnie do wrzenia pod

chłodnicą zwrotną przez 1 godzinę. Następnie kolbę należy ochłodzić, ekstrakt odsączyć od nierozpuszczalnych pozostałości, eter odparować pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce obrotowej, a pozostałość krystalizować z 50 mL acetonu. Mieszaninę oziębic do temperatury pokojowej i wstawić na 1 godzinę do lodówki. Czysty związek, w postaci ciała stałego, o kremowej barwie odsączyć i suszyć na powietrzu. Zważyć i obliczyć wydajność. Średnio otrzymuje się 6-8 g związku. Zmierzyć temperaturę topnienia (lit. t.t. 59-60 °C).



OZNACZANIE LICZBY ESTROWEJ I LICZBY ZMYDLANIA

Liczba estrowa (L.estr.) to liczba mg wodorotlenku potasu potrzebnego do zmydlenia estrów znajdujących się w 1 g tłuszczu (olejku).

Liczba ta ma szczególną wartość w badaniu tłuszczów (olejków) i jest ich cechą charakterystyczną.

Liczbę estrową oznacza się gotując olejek pod chłodnicą zwrotną z mianowanym roztworem 0,5 M alkoholowego roztworu wodorotlenku potasu lub sodu, aż do osiągnięcia całkowitego zmydlenia i następnie odmiareczkuje się nadmiar wodorotlenku mianowanym roztworem kwasu.

Gdy olejek zawiera znaczną ilość aldehydów wówczas oznaczenie nie jest precyzyjne.

WYKONANIE OZNACZENIA

Do 1 g tłuszczu/olejku (odważonego z dokładnością do 0,01g) umieszczonego w kolbie o pojemności 100 mL dodać 5 mL alkoholu etylowego, a następnie 5 kropli 1% alkoholowego roztworu fenoloftaleiny (sporządzonego z 0,5 g fenoloftaleiny i 48 mL EtOH). Następnie dodać 20 mL 0,5 M alkoholowego roztworu wodorotlenku potasu, aż do różowego zabarwienia roztworu. W przypadku zastosowania do oznaczenia mniejszej ilości olejku należy odpowiednio zmniejszyć ilości dodawanych składników (alkoholu i alkoholowego roztworu wodorotlenku potasu). Roztwór ogrzewać pod chłodnicą zwrotną przez 1 godzinę na łaźni wodnej. Po oziębieniu zawartości kolby do temperatury pokojowej odmiareczkować

nadmiar nieprzereagowanego wodorotlenku 0,5 M roztworem kwasu solnego lub siarkowego. Odczytać z biurety objętość zużytego do miareczkowania roztworu kwasu.

OBLICZENIA

1 g Tłuszczu (olejku) reaguje z 20 mL 0,5 M alkoholowego roztworu wodorotlenku potasu lub sodu w wyniku czego dochodzi do zmydlenia lipidu/estru i wytworzenia soli sodowej lub potasowej (mydła). Miareczkowanie wykonuje się w celu przeprowadzenia w siarczan lub chlorek nadmiaru (nieprzereagowanego z olejkiem) wodorotlenku potasu lub sodu i na tej podstawie wyznacza się liczbę estrową.

Liczbę estrową oblicza się ze wzoru:

$$L.\text{estr.} = \frac{28 \cdot A}{S}$$

A – liczba mL 0,5 M alkoholowego roztworu wodorotlenku zużytego do miareczkowania

28 – masa 0,5 mola wodorotlenku potasu

S – ilość użytego tłuszczu/olejku w gramach

Jeżeli do oznaczenia stosuje się 0,5 M alkoholowy roztwór wodorotlenku sodu, to należy podstawić do wzoru liczbę 20 odpowiadającą masie 0,5 mola NaOH.

Jeżeli wzór chemiczny estru jest znany, to wynik oznaczenia można podać w % :

$$L.\text{estr.} = \frac{M \cdot A}{20 \cdot S} \%$$

M – ciężar cząsteczkowy kwasu

A – liczba mL 0,5 M alkoholowego roztworu wodorotlenku

S – ilość użytego tłuszczu/olejku w gramach

Liczbę estrową można przeliczyć na zawartość procentową estru w olejku i odwrotnie.

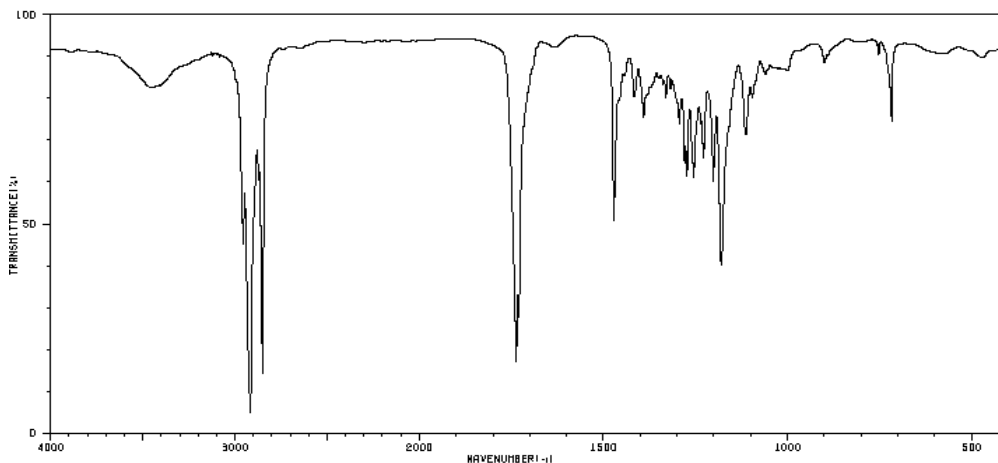
$$\text{Zaw. estru } \% = \frac{M \cdot l.\text{estr.}}{560}$$

$$L.\text{estr.} = \frac{\text{zaw. estru } \% \cdot 560}{M}$$

W pracach naukowych dotyczących olejków podawana jest także **liczba zmydlenia** będąca sumą **liczby kwasowej** (por. ćwiczenie 4.3.) i **liczby estrowej**.

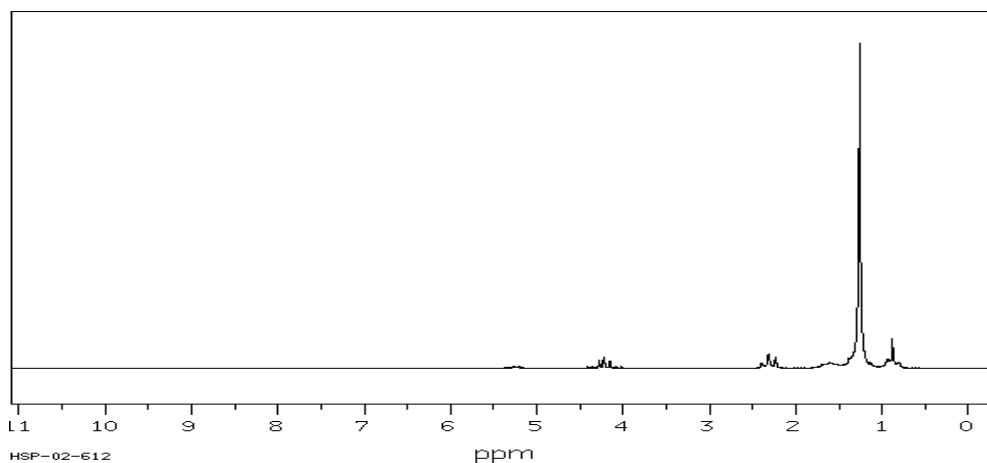
Dane spektroskopowe trimirystyny

Widmo IR (KBr)

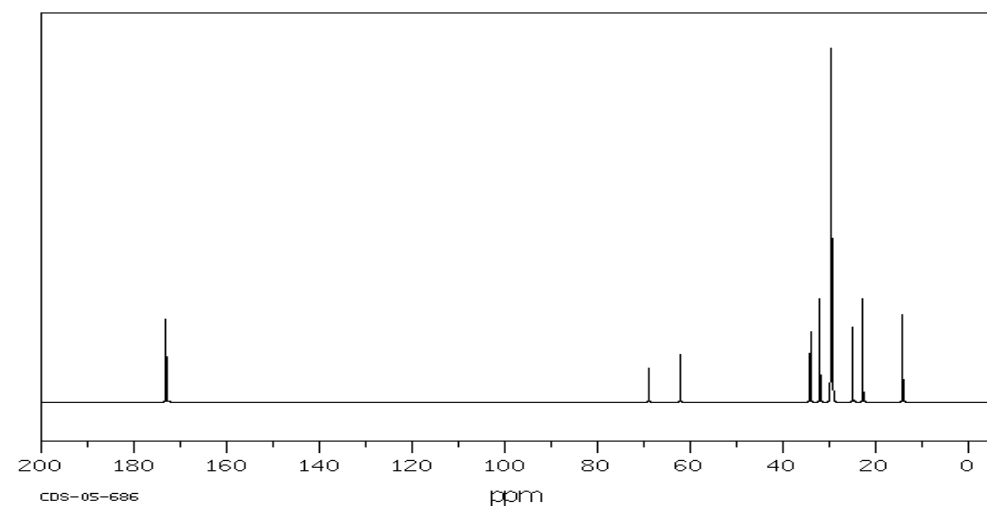


Wartości liczb
falowych
(cm⁻¹)
2964
2872
2860
1737
1729
1471
1468
1418
1384
1280
1229
1113

Widmo ¹H NMR w CDCl₃



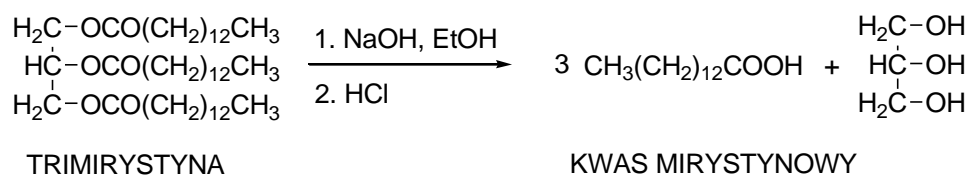
Widmo ¹³C NMR w CDCl₃



Zagadnienia

- Metody wyodrębniania składników z surowców roślinnych
- Lipidy (budowa, właściwości, reaktywność)
- Reakcje estryfikacji
- Reakcje zmydlania
- Analiza widm produktu

4.3. Kwas mirystynowy z trimirystyny



Odczynniki:

trimirystyna	3,5 g
alkohol etylowy	75 mL
NaOH	0,5 g
stęż. HCl	
KOH	
fenoloftaleina (1% roztwór etanolowy)	
etanol 0,5 L	
0,5 M HCl	

Aparatura i szkło:

kolba kulista poj. 250 mL
 chłodnica zwrotna
 rurka na środek suszący (bezw. CaCl₂)
 czasza grzejna na kolbę poj. 250 mL
 zlewki poj. 200 mL i 400 mL
 łopatka
 zestaw do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem
 bagietka
 biureta 50 mL

W ćwiczeniu otrzymuje się w pierwszym etapie mydło – mirystynian sodu z trimirystyny (wyizolowanej wcześniej ze zmielonej gałki muskatołowej), a w kolejnym etapie w wyniku hydrolizy mydła – kwas mirystynowy. Następnie oznacza się liczbę kwasową trimirystyny.

Do roztworu 2 g trimirystyny w 33 mL alkoholu etylowego umieszczonego w kolbie kulistej o poj. 250 mL dodać 45 mL roztworu, zawierającego 0,5 g NaOH w mieszaninie woda-etanol (9:1, v/v). Otrzymaną mieszaninę ogrzewać do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 2 godziny. Po ochłodzeniu uzyskane mydło przenieść łopatką do 110-150 mL mieszaniny pokruszonego lodu z wodą, zawierającej kilka mililitrów stężonego kwasu solnego.

Po wytrąceniu się osadu kwasu mirystynowego odsączyć produkt na lejku Büchnera i suszyć. Zważyć i obliczyć wydajność procesu. Zmierzyć temperaturę topnienia (lit. t.t. 54-55 °C, t.wrz. 199-202 °C/16 mmHg, t.wrz. 174-176 °C/4 mmHg).

OZNACZANIE LICZBY KWASOWEJ

Liczbę kwasową (L.kw.) oznacza się miareczkując na zimno roztwór lipidu/olejku **rozcieńczonym** mianowanym roztworem wodorotlenku sodu lub potasu, co pozwala określić zawartość wolnych kwasów tłuszczowych. Użycie stężonego roztworu nie jest wskazane,

ponieważ niektóre estry w takich warunkach ulegają zmydleniu np. mrówczany, przez co dokładność oznaczenia jest mniejsza.

WYKONANIE OZNACZENIA

Należy odważyć 1,5 g trimirystyny (z dokładnością do 0,01 g), rozpuścić w 150 mL etanolu w kolbie o pojemności 250 mL i dodać 5 kropli 1% alkoholowego roztworu fenoloftaleiny i podzielić na trzy równe porcje. Sporządzić 0,1 M etanolowy roztwór KOH i napełnić biuretę. Miareczkować każdy z trzech etanolowych roztworów trimirystyny wobec fenoloftaleiny. Mieszać przez cały czas miareczkowany roztwór, do momentu pierwszego zauważalnego odbarwienia roztworu (różowe zabarwienie) niezanikającego przez 10 sekund. Odczytać objętość zużytego roztworu KOH i uzupełnić biuretę, czynność powtórzyć trzykrotnie. Określić, na podstawie odpowiednich obliczeń, wartość liczby kwasowej – uśredniając wyniki z trzech pomiarów.

OBLICZENIA

Normalnie **L.kw.** oblicza się ze wzoru:

$$\text{L.kw.} = \frac{5,6 \cdot B}{S}$$

B – liczba mL 0,1 M alkoholowego roztworu wodorotlenku

S – ilość użytego olejku w gramach

Wartość 5,6 we wzorze odpowiada ilości 0,1 mola KOH

Gdy olejki zawierają większe ilości kwasów, np. ambretowy, irysowy, miareczkowanie wykonuje się 0,5 M roztworem wodorotlenku:

$$\text{L.kw.} = \frac{28 \cdot A}{S}$$

A – liczba mL 0,5 M alkoholowego roztworu wodorotlenku

S – ilość użytego olejku w gramach

Wartość 28 we wzorze odpowiada masie 0,5 mola KOH

Gdy wynik wyrażony ma być w % stosuje się wzór:

$$\text{L.kw.} = \frac{M \cdot A \cdot 100}{2000 \cdot S} = \frac{M \cdot A}{20 \cdot S} \%$$

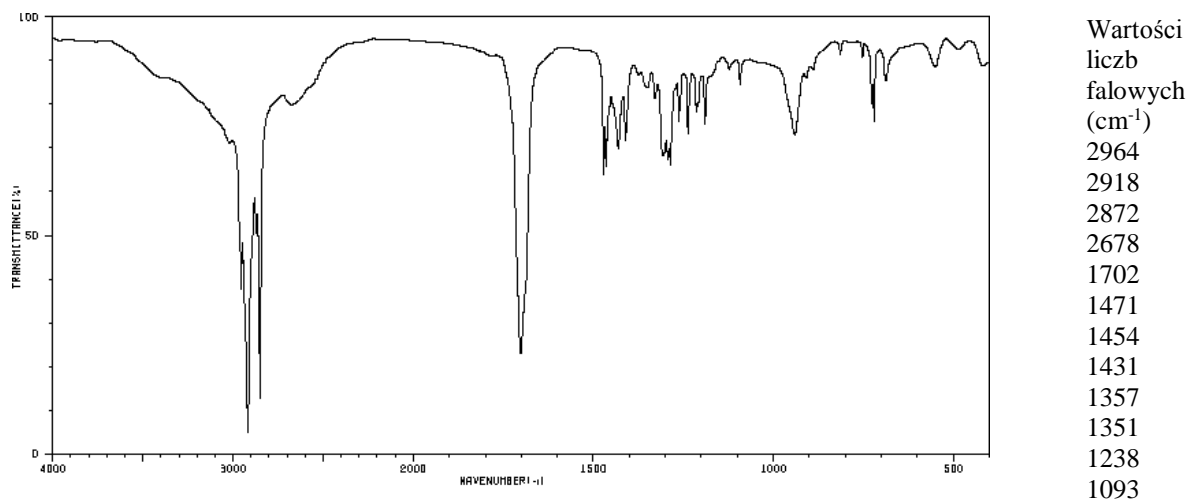
M – ciężar cząsteczkowy kwasu

A – liczba mL 0,5 M alkoholowego roztworu wodorotlenku

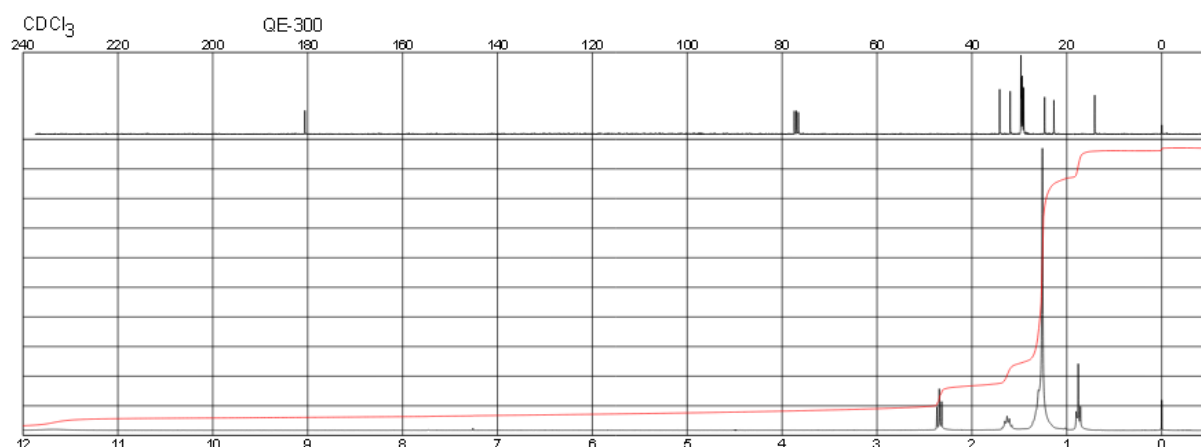
S – ilość użytego olejku w gramach

Dane spektroskopowe kwasu mirystynowego

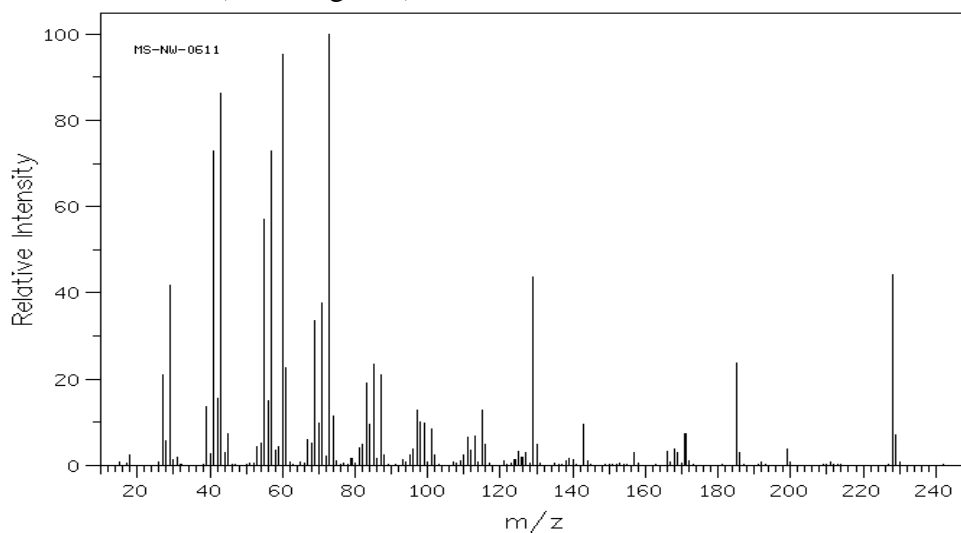
Widmo IR (KBr)



Widma ¹H NMR i ¹³C NMR w CDCl₃ (katalog Sigma Aldrich)



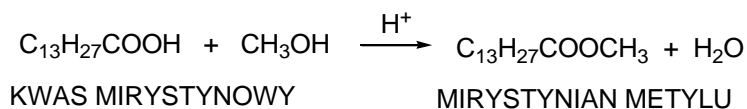
Widmo EI-MS (M=228 g/mol)



Zagadnienia

- Wyższe kwasy tłuszczowe (przykłady, podział, budowa)
- Reakcje zmydlania lipidów
- Analiza widm – porównanie właściwości substratu i produktu

4.4. Mirystynian metylu z kwasu mirystynowego Mirystynian etylu z kwasu mirystynowego



Odczynniki:

kwas mirystynowy	1,8 g
bezw. metanol	2,4 mL
eter dietylowy	30 mL
stęż. kwas siarkowy(VI)	0,36 g (0,2 mL)
bezw. Na ₂ SO ₄	
Na ₂ CO ₃ (około 10 g)	
NaCl (około 5 g)	

Aparatura i szkło:

kolba kulista poj. 50 mL
chłodnica zwrotna
rurka na środek suszący (bezw. CaCl ₂)
rozdzielacz poj. 250 mL
kolba stożkowa poj. 100 mL
zlewka poj. 200 mL

W kolbie kulistej o poj. 50 mL, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną zabezpieczoną rurką z bezw. CaCl₂, umieścić 1,8 g kwasu mirystynowego, 2,4 mL bezwodnego metanolu oraz 0,2 mL stężonego kwasu siarkowego(VI). Całość ogrzewać przez 4 godziny do wrzenia, a następnie oddestylować nadmiar alkoholu metylowego. Pozostałość przenieść do rozdzielacza zawierającego 10 mL wody destylowanej i ekstrahować 3 razy porcjami po 10 mL eteru dietylowego. Połączone ekstrakty eterowe przemywać 10 mL wodnego roztworu węglanu sodu do uzyskania odczynu zasadowego, a następnie 10 mL nasyconego roztworu chlorku sodu. Suszyć bezwodnym siarczanem sodu (ok. 30 min, mieszając za pomocą mieszadła magnetycznego). Po odsączeniu środka suszącego eter odparować pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce próżniowej. Otrzymuje się 1,5 g (80 %) mirystynianu metylu o t.t. 17-19 °C i o charakterystycznym zapachu.

W analogiczny sposób otrzymać można **mirystynian etylu** z 1,8 g kwasu mirystynowego i 5 mL bezwodnego etanolu. Mirystynian etylu: t.t. 12-13 °C, t.wrz. 295 °C.

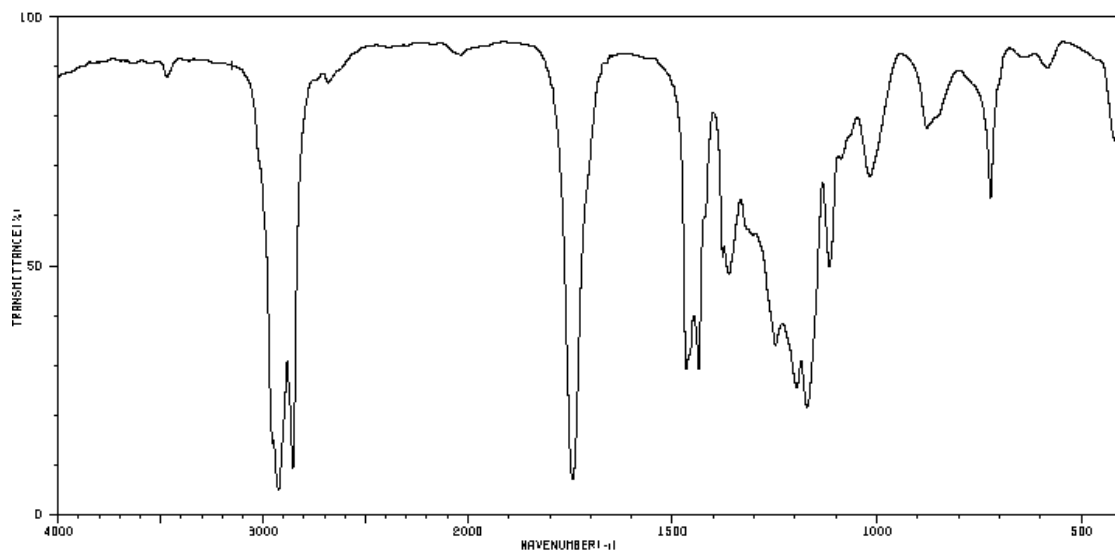
Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Eluent: chlorek metylenu – metanol (1:1, v/v)

Na płytkę TLC nanieść roztwory: kwasu mirystynowego i mirystynianu metylu (etylu). Po wysuszeniu płytkę wywołuje się w oparach jodu. Wyznaczyć wartości współczynników R_f.

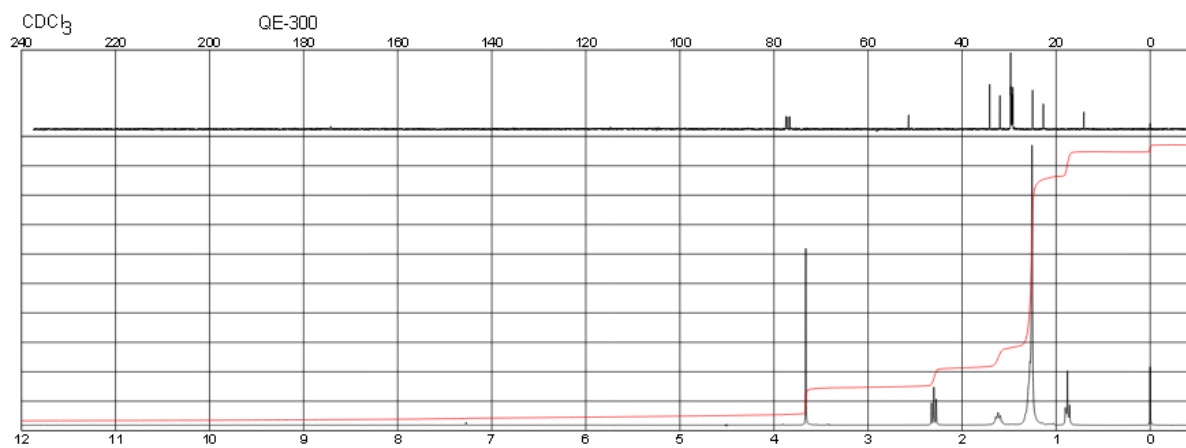
Dane spektroskopowe mirystynianu metylu

Widmo IR (film)

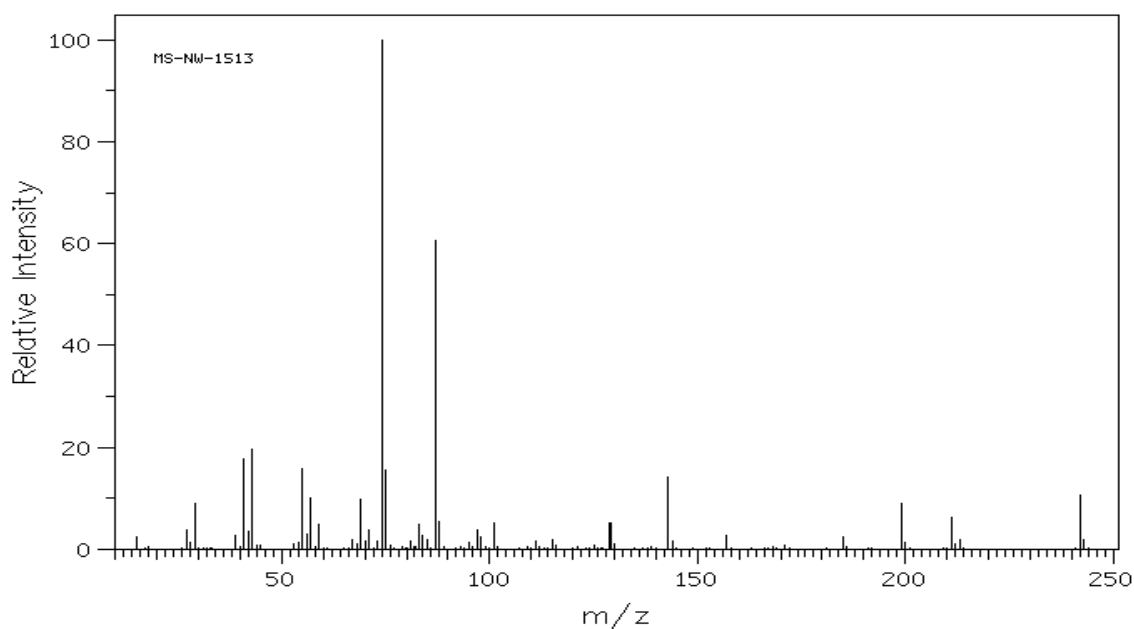


Wartości
liczb
falowych
(cm⁻¹)
3469
2953
2925
2686
1744
1467
1436
1378
1116
1010
879

Widma ¹H NMR i ¹³C NMR w CDCl₃ (katalog Sigma Aldrich)

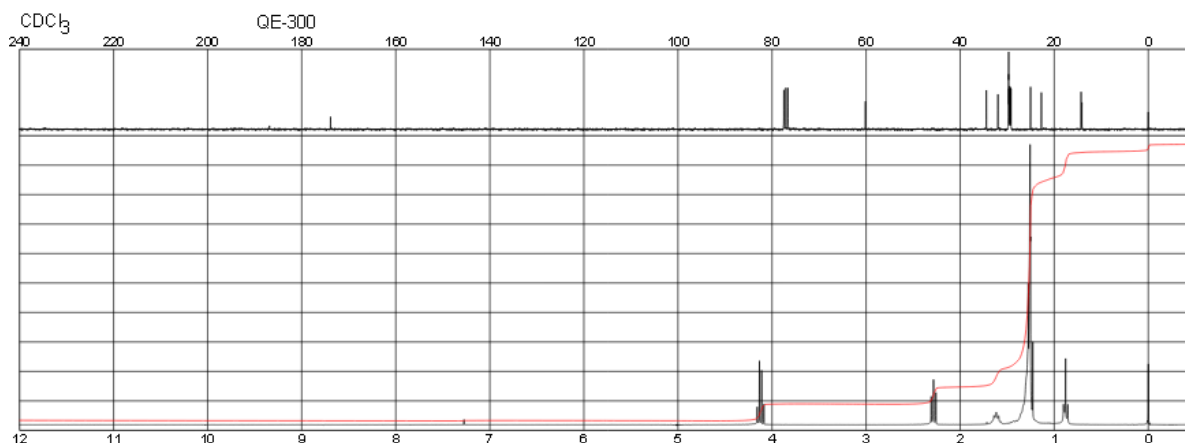


Widmo EI-MS (M=242,4 g/mol)



Dane spektroskopowe mirystynianu etylu

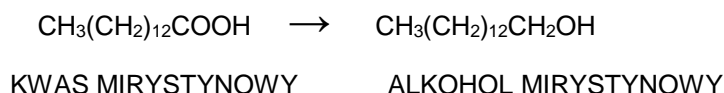
Widma ^1H NMR i ^{13}C NMR w CDCl_3 (katalog Sigma Aldrich)



Zagadnienia

- Wyższe kwasy tłuszczowe (nazewnictwo, przykłady, budowa, właściwości)
- Reakcja estryfikacji (mechanizm)
- Reakcje hydrolizy estrów
- Analiza widm – porównanie właściwości substratu i produktu

4.5. Alkohol mirystynowy



Odczynniki:

Metoda A

kwas mirystynowy	0,5 g
NaBH ₄	1 g
propan-2-ol	25 mL
metanol	

Aparatura i szkło:

kolba okrągłodenna poj. 50 mL
chłodnica zwrotna
 rurka na środek suszący (bezw. CaCl₂)
czasza grzejna

Metoda B

kwas mirystynowy	0,5 g
LiAlH ₄	1 g
THF bezw.	25 mL
octan etylu	

kolba okrągłodenna poj. 50 mL
chłodnica zwrotna
 rurka na środek suszący (bezw. CaCl₂)
czasza grzejna

Celem ćwiczenia jest redukcja kwasu mirystynowego do alkoholu mirystynowego (n-tetradekanolu), który może posłużyć jako substrat w reakcji otrzymywania mirystynianu mirystylu.

Metoda A

W kolbie o pojemności 50 mL, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne i chłodnicę zwrotną, umieścić kwas mirystynowy (0,5 g) i rozpuścić w 50 mL propan-2-olu, całość umieścić na mieszadle magnetycznym. Do tak przygotowanego roztworu dodawać porcjami NaBH₄ i mieszaninę ogrzewać w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Reakcję prowadzić przez około 3 godziny, a jej postęp należy monitorować za pomocą analizy TLC co pół godziny. Po zakończeniu reakcji usunąć czaszę grzejną i możliwie szybko rozpocząć sączenie ciepłego roztworu w celu oddzielenia nieprzereagowanego NaBH₄. W celu rozłożenia nieprzereagowanego czynnika redukującego, NaBH₄ wraz z sączkiem umieścić w zlewce z metanolem. Otrzymany po sączeniu produkt zagęścić pod zmniejszonym ciśnieniem, zważyć i obliczyć wydajność reakcji. Produkt otrzymuje się w postaci kremowego osadu o temperaturze topnienia 38-39 °C.

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC):

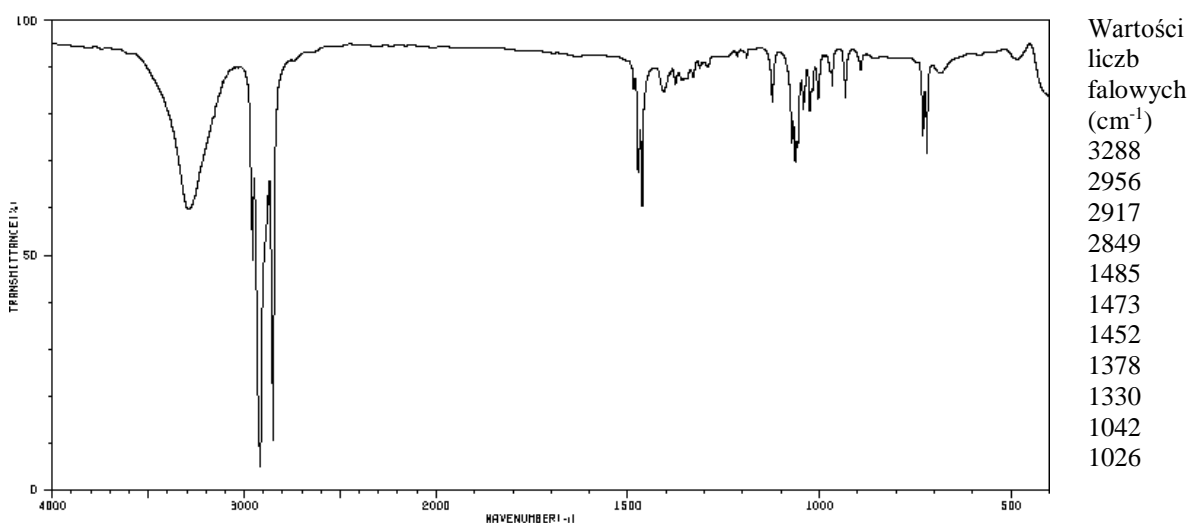
Eluenty: heksan-toluen-metanol (1:1: kilka kropli, v/v); octan etylu-aceton (1:1, v/v),
Płytkę wywoływać w oparach jodu. Wyznaczyć wartości R_f dla substratu i produktu dla podanych zestawów eluentów.

Metoda B

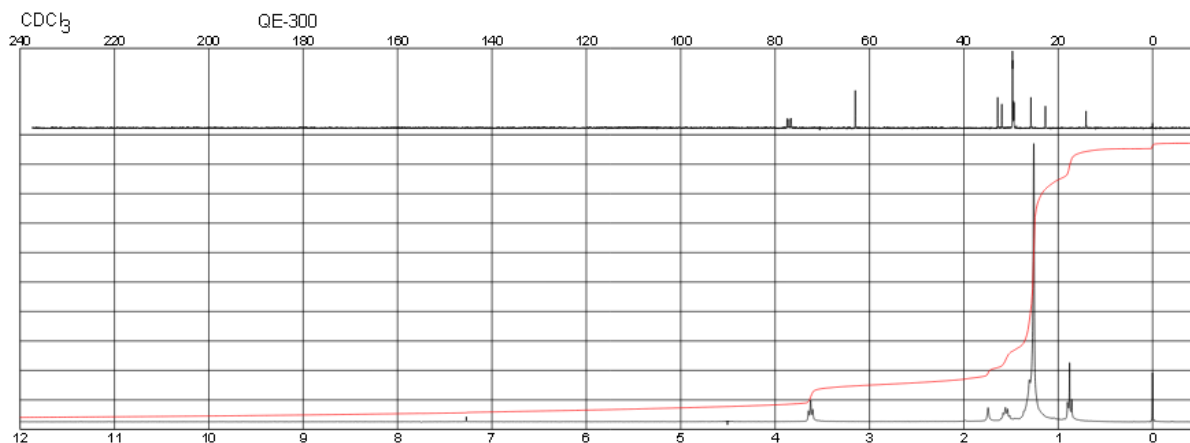
W kolbie o pojemności 50 mL, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne i chłodnicę z rurką ze środkiem suszącym, umieścić 0,5 g kwasu mirystynowego i rozpuścić w 50 mL bezw. THF, całość umieścić na mieszadle magnetycznym. Do tak przygotowanego roztworu dodawać porcjami LiAlH_4 i mieszaninę ogrzewać w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Reakcję prowadzić przez około 3 godziny, a jej postęp należy monitorować za pomocą analizy TLC, co pół godziny wg procedury opisanej dla metody A. Po zakończeniu reakcji usunąć czasę grzejną i możliwie szybko rozpocząć sączenie ciepłego roztworu w celu oddzielania nieprzereagowanego LiAlH_4 . W celu rozłożenia nieprzereagowanego czynnika redukującego sączone z LiAlH_4 przenieść do zlewki, zalać octanem etylu, a także opłukać wszystkie elementy szklane używane przy sączeniu. Otrzymany po przesączeniu produkt zagęścić pod zmniejszonym ciśnieniem, zważyć i obliczyć wydajność reakcji. Otrzymuje się kremowy osad o temperaturze topnienia 38-39 °C i temperaturze wrzenia 289-290 °C. We wnioskach należy porównać czystość produktu oraz wydajności obu metod.

Dane spektroskopowe alkoholu mirystynowego

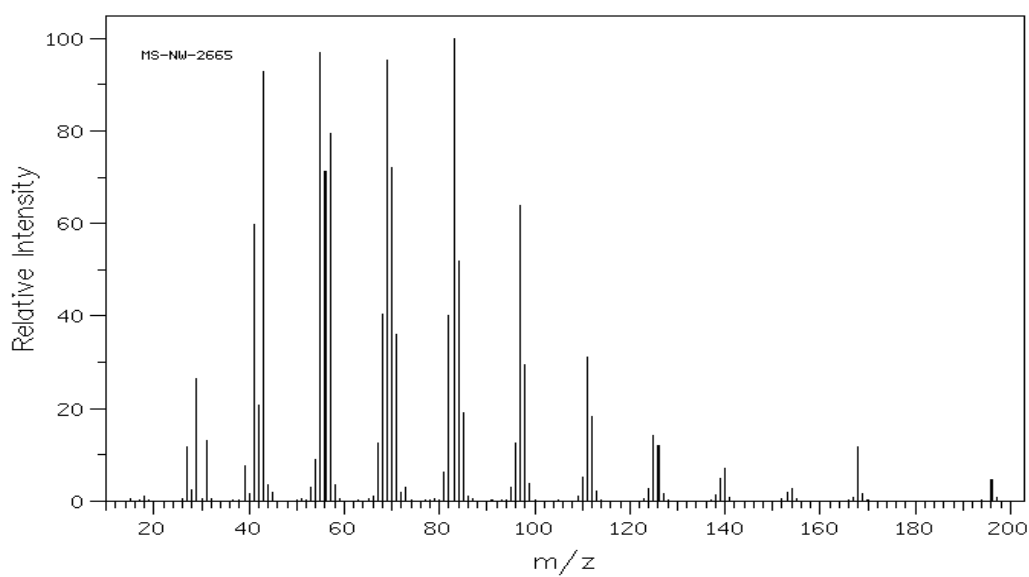
Widmo IR (KBr)



Widma ^1H NMR i ^{13}C NMR w CDCl_3 (katalog Sigma Aldrich)



Widmo EI-MS ($M=214$ g/mol)



Zagadnienia

- Alkohole, metody otrzymywania
- Odczynniki redukujące selektywnie (np. grupę karboksylową)
- Analiza widm – porównanie właściwości substratu i produktu

4.6. Izolacja kwasów tłuszczowych z migdałów i oznaczanie liczby jodowej

PŁATKI MIGDAŁÓW → OLEJ MIGDAŁOWY



$C_{17}H_{33}COOH$ KWAS OLEINOWY (65–68%)

$C_{17}H_{31}COOH$ KWAS LINOLOWY (24–26%)

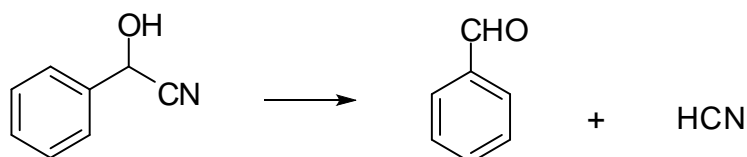
Odczynniki:

migdały (np. płatki) 15g
0,1 M $Na_2S_2O_3$
MeOH
EtOH
jod
skrobia
octan etylu

Aparatura i szkło:

kolby okrągłodenne poj. 250 mL (2 szt.)
zlewki poj. 250 mL (2 szt.)
chłodnica zwrotna
biureta 50 mL

Olejek migdałowy – z migdałów gorzkich (pierwotna nazwa olejek gorzkich migdałów), kiedyś pozyskiwany z wyciżczyn migdałów gorzkich jest też składnikiem wielu owoców. Obecnie olejek ten produkuje się prawie wyłącznie z nasion – pestek moreli (*Armeniaca vulgaris*). Można go także produkować z pestek brzoskwiń, śliwek, wiśni. Nasiona migdałowca zawierają 45-60% oleju, w skład którego wchodzi glicerydy kwasów oleinowego (83%) i linolowego (16%), oprócz tego ok. 20% substancji białkowych, śluzu, witamina B₂ i sacharoza. Oprócz oleju nasiona zawierają również glikozyd - amigdalinę, który należy do glikozydów cyjanohydrynowych, jest to β-gencjobiozyd nitylu kwasu D-(-)-migdałowego. Kwasowa hydroliza amigdaliny prowadzi do uzyskania dwóch cząsteczek D-glukozy, cyjanowodoru i aldehydu benzoowego. Benzaldehyd jest lotny z parą wodną i posiada charakterystyczny zapach gorzkich migdałów. W słodkich migdałach cyjanowodor nie jest obecny.



Aldehyd benzoowy stosowany jest jako surowiec do produkcji barwników (półprodukt do syntezy barwnika – zieleni malachitowej) i pochodnych aromatycznych, jako środek zapachowy w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym, jako rozpuszczalnik olejów, żywic i niektórych estrów celulozy.

Celem ćwiczenia jest pozyskanie olejku migdałowego z rozdrobnionych migdałów na drodze ekstrakcji eterem naftowym.

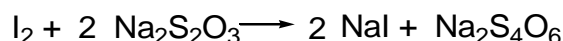
Rozdrobnione owoce migdałowca 15 g, np. w postaci płatków, umieścić w kolbie okrągłodennej o pojemności 250 mL zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i kamyczki wrzenne. Następnie wlać 100 mL eteru naftowego i zawartość kolby doprowadzić do wrzenia. Proces prowadzić przez 0,5-1 godzinę. Po zakończeniu kolbę ochłodzić. Przesączyć, kolbę przepłukać octanem etylu i/lub metanolem w celu wymycia wszystkich tłuszczowych pozostałości ze ścianek naczynia i tak otrzymany roztwór zagęścić pod zmniejszonym ciśnieniem, zważyć i obliczyć wydajność.

Otrzymany olejek z zawartością wyższych nienasyconych kwasów tłuszczowych poddać oznaczeniu liczby jodowej w sposób podany poniżej.

OZNACZANIA LICZBY JODOWEJ metodą Morgoschesa

Liczba jodowa (Lj) stanowi ilość gramów jodu, którą mogą przyłączyć nienasycone kwasy tłuszczowe zawarte w 100 g tłuszczu. Jej wartość jest miarą zawartości w tłuszczu nienasyconych kwasów tłuszczowych. Im wyższa wartość liczby jodowej, tym większa zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych.

Nadmiar nieprzereagowanego jodu usuwa się poprzez odmiareczkowanie roztworu kwasów tłuszczowych roztworem tiosiarczanu sodu wg równania:



WYKONANIE OZNACZENIA

Przeprowadzić miareczkowanie próby kontrolnej i próby z badanym kwasem tłuszczowym. Próba kontrolna: w kolbie umieścić 10 mL 0,2 M roztworu jodu w etanolu i dodać 100 mL H₂O. Wymieszać i odstawić na 5 minut. Następnie nieprzereagowany jod odmiareczkować za pomocą 0,1 M Na₂S₂O₃ wobec 2 mL nasyconego roztworu skrobi, którą należy dodać pod koniec miareczkowania (gdy roztwór uzyska jasnożółtą barwę). Zakończyć miareczkowanie, gdy roztwór uzyska mleczną barwę.

Próbkę badanego tłuszczu o znanej masie rozpuścić w 15 mL alkoholu metylowego i umieścić w zlewce o pojemności 100 mL. Do roztworu dodać 10 mL 0,2 M roztworu jodu. w etanolu. Roztwór dokładnie wymieszać i natychmiast dodać 100 mL wody destylowanej i odstawić pod przykryciem na 4-5 min. (nie dłużej!). Po tym czasie nieprzereagowany jod odmiareczkować 0,1 M Na₂S₂O₃ wobec 2 mL roztworu skrobi, podobnie jak w próbie kontrolnej.

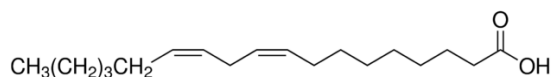
Liczbę jodową Lj oblicza się stosując niżej podany wzór – z uwzględnieniem wartości gramorównoważnika jodu (126,92 g) w odniesieniu do 100 g tłuszczu:

$$L_j = 1,269 \frac{a - b}{c}$$

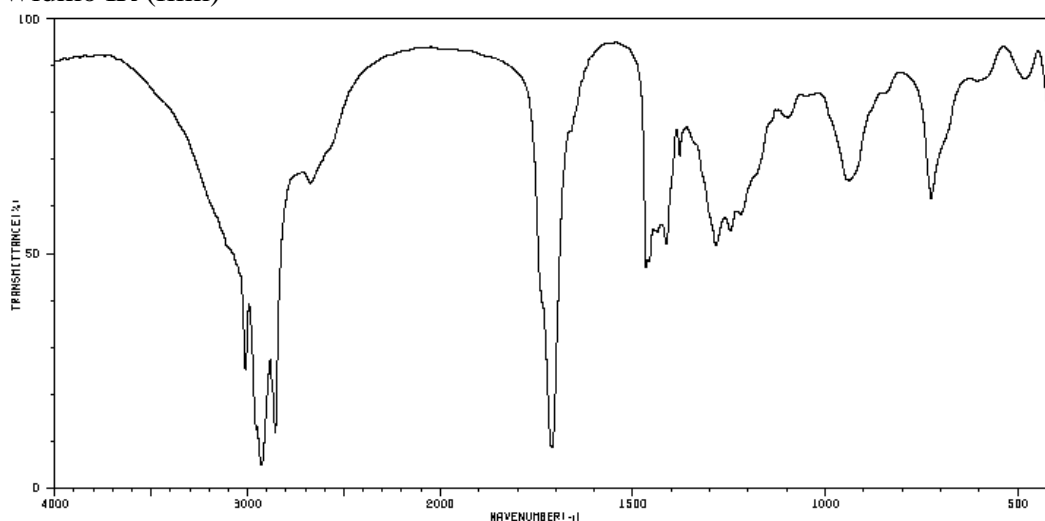
gdzie: a – liczba mL 0,1 M Na₂S₂O₃ zużyta w próbie kontrolnej
 b – liczba mL 0,1 M Na₂S₂O₃ zużyta w oznaczeniu właściwym
 c – waga tłuszczu (w gramach) zawartego w badanej próbce.

Dane spektroskopowe kwasu oleinowego str. 20

Dane spektroskopowe kwasu linolowego [kwas (9Z,12Z)-oktadekadienowy]

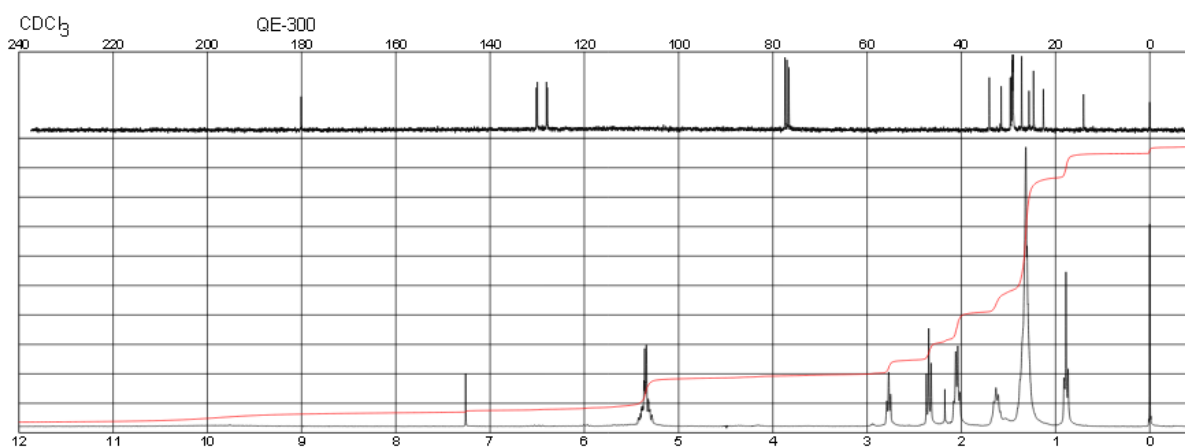


Widmo IR (film)



Wartości
 liczb
 falowych
 (cm⁻¹)
 3010
 2954
 2857
 2673
 1710
 1467
 1458
 1414
 1378
 1285
 1246
 1108
 939
 481

Widma ¹H NMR i ¹³C NMR w CDCl₃ (katalog Sigma Aldrich)



Zagadnienia

- Metody wyodrębniania składników z surowca roślinnego
- Lipidy i wyższe kwasy tłuszczowe (budowa, nazewnictwo, podział, reaktywność)
- Zastosowanie wyższych kwasów tłuszczowych, kwasy ω-3 i ω-6; ich działanie na organizm człowieka
- Analiza widm produktów

4.7. Izolacja kwasów tłuszczowych z wiórków kokosowych i oznaczanie liczby jodowej

WIÓRKI KOKOSOWE



OLEJ KOKOSOWY



$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$ (ok. 44%)

KWAS LAURYNOWY

Odczynniki:

wiórki kokosowe	15 g
eter naftowy	100 mL
0,1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	
MeOH	15 mL
0,2 M etanolowy roztwór I_2	
EtOH	25 mL
skrobia	
octan etylu	

Aparatura i szkło:

kolby okrągłodenne poj. 250 mL (2 szt.)
zlewki poj. 250 mL (2 szt.)
chłodnica zwrotna
biureta 50 mL

Kokos w postaci orzecha, soku, mleka i oleju jest źródłem wielu witamin i dostarcza mnóstwo składników odżywczych. Od pokoleń z powodzeniem spożywany jest na całym świecie. Na wielu wyspach kokos jest podstawowym komponentem diety dostarczającym większości składników, których potrzebuje nasz organizm. **Olejek kokosowy** – olej kokosowy zawiera ok. 44% kwasu laurynowego. Olej kokosowy w swoim czystym i naturalnym stanie ma w temperaturze pokojowej konsystencję stałą i bardzo przyjemny zapach. Po lekkim ogrzaniu jest zupełnie płynny. Dzięki swoim właściwościom między innymi uelastyczniającym i nawilżającym skórę stanowi składnik wielu preparatów kosmetycznych.

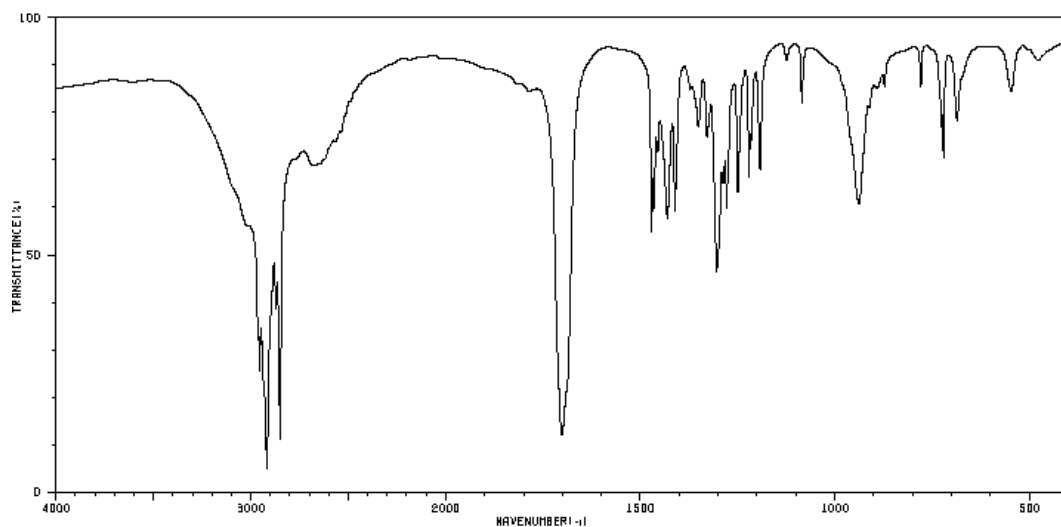
Celem ćwiczenia jest pozyskanie olejku kokosowego z wiórków kokosowych na drodze ekstrakcji eterem naftowym.

Wiórki kokosowe (15 g) umieścić w kolbie okrągłodennej o pojemności 250 mL zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i kamyczki wrzenne. Następnie wlać 100 mL eteru naftowego i tak otrzymany roztwór doprowadzić do wrzenia. Proces prowadzić przez 0,5 – 1 godzinę. Po zakończeniu kolbę ochłodzić. Przesączyć, kolbę przepłukać octanem etylu i/lub metanolem w celu wymycia wszystkich tłuszczowych pozostałości ze ścianek naczynia i tak otrzymany roztwór zagęścić pod zmniejszonym ciśnieniem, zważyć i obliczyć wydajność.

Otrzymany olejek zawierający wyższe nienasycone kwasy tłuszczowe poddać oznaczaniu liczby jodowej metodą Morgoschesa w sposób podany w ćwiczeniu 4.6. (str. 36).

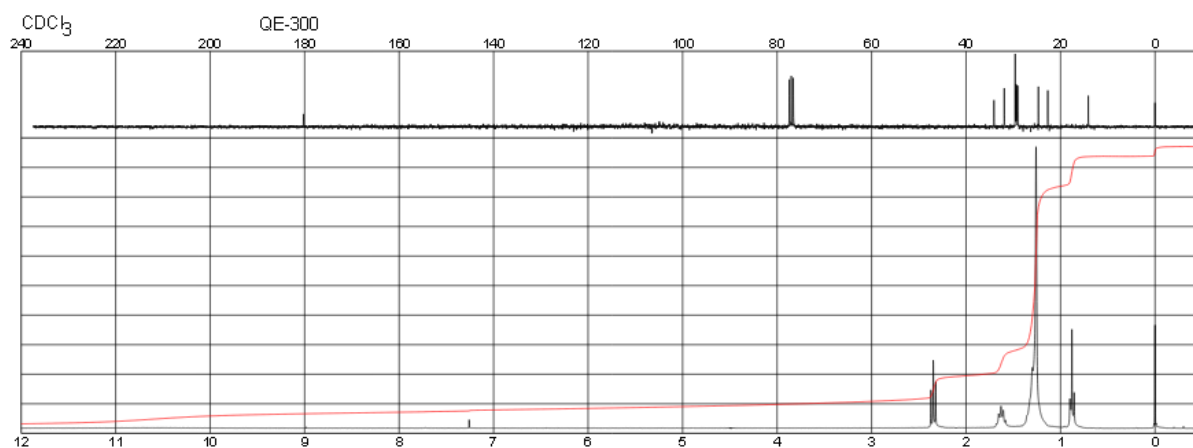
Dane spektroskopowe kwasu laurynowego

Widmo IR (KBr)



Wartości
liczb
falowych
(cm^{-1})
2954
2918
2872
2678
2662
1701
1471
1465
1411
1392
1216
1086

Widma ^1H NMR i ^{13}C NMR w CDCl_3 (katalog Sigma Aldrich)



Zagadnienia

- Metody wyodrębniania składników z surowca roślinnego
- Lipidy i wyższe kwasy tłuszczowe (budowa, nazewnictwo, podział, reaktywność)
- Zastosowanie wyższych kwasów tłuszczowych, kwasy ω -3 i ω -6; ich działanie na organizm człowieka
- Analiza widm produktu

4.8. Izolacja masła kakaowego z gorzkiej czekolady

GORZKA CZEKOLADA

≥ 70% KAKAO



→ MASŁO KAKAOWE

$C_{15}H_{31}COOH$ KWAS PALMITYNOWY (ok. 24-26%)

$C_{17}H_{35}COOH$ KWAS STEARYNOWY (ok. 34-35%)

$C_{17}H_{33}COOH$ KWAS OLEINOWY (ok. 37-38%)

$C_{17}H_{31}COOH$ KWAS LINOŁOWY (ok. 2%)

Odczynniki:

Metoda A

gorzka czekolada (70% i więcej kakao, rozdrobniona) 10 g
eter naftowy 100 mL

Metoda B

gorzka czekolada (70% i więcej kakao, rozdrobniona) 10 g
eter naftowy 100 mL

Aparatura i szkło:

kolba okrągłodenna poj. 250 mL
czasza grzejna
chłodnica zwrotna
aparat Soxhleta
lejek zwykły

Celem ćwiczenia jest wyizolowanie z gorzkiej czekolady masła kakaowego (mieszaniny lipidów) popularnego w ostatnich latach składnika preparatów kosmetycznych. W obu częściach ćwiczenia bada się zawartość mieszaniny lipidów w tego samego rodzaju czekoladzie.

Metoda A

W kolbie o pojemności 250 mL umieścić 10 g rozdrobnionej gorzkiej czekolady (zawierającej powyżej 70% kakao) i 100 mL eteru naftowego pamiętając o dodaniu kilku kamyczków wrzennych. Zawartość kolby ogrzewać przez godzinę w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Następnie usunąć czaszę i możliwie szybko rozpocząć sączenie gorącego roztworu w celu oddzielania kakao i pozostałych składników od masła kakaowego, można także sączyć przez Celit. Otrzymane masło (mieszanina lipidów) dość szybko ulega zestaleniu. Następnie zważyć otrzymane masło i obliczyć zawartość procentową sumy składników lipidowych w badanej gorzkiej czekoladzie.

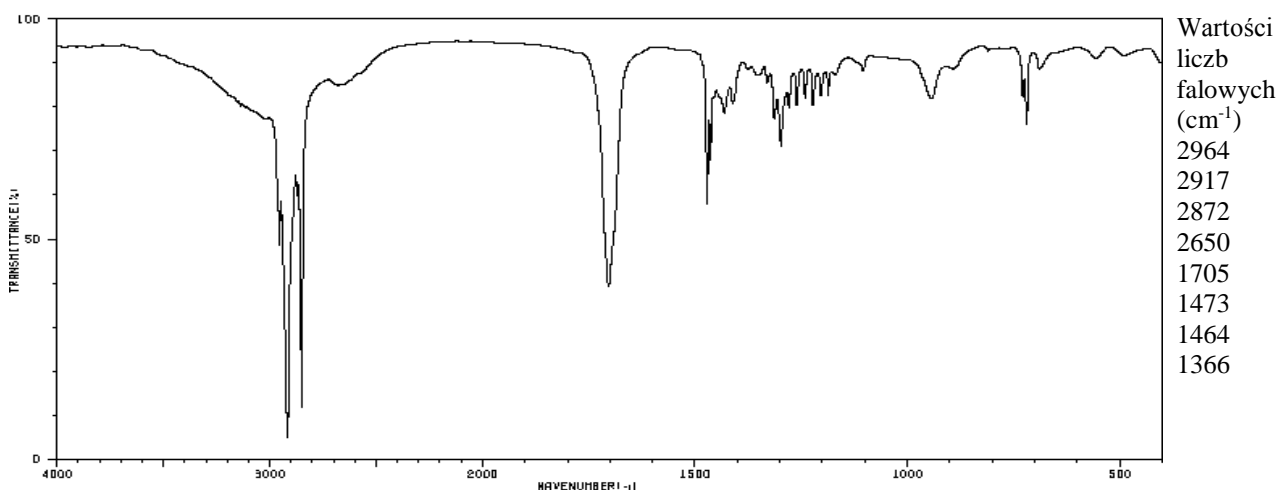
Metoda B

Zmontować aparat Soxhleta (porównaj rysunek w pkt. 7.1., str. 64, izolacja teobrominy metoda B). W kolbie o pojemności 250 mL umieścić 100 mL eteru naftowego pamiętając o dodaniu kilku kamyczków wrzennych. W gilzie umieścić 10 g rozdrobnionej gorzkiej czekolady (zawierającej powyżej 70% kakao). Ekstrakcję prowadzić przez około 2 godziny. Następnie zawartość kolby okrągłodennej (bez kamyczków wrzennych) – eterowy roztwór mieszaniny lipidów zagęścić pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymane masło kakaowe (mieszanina lipidów) dość szybko zacznie ulegać zestaleniu. Następnie zważyć otrzymane masło i obliczyć procentową zawartość składników lipidowych w badanej gorzkiej czekoladzie.

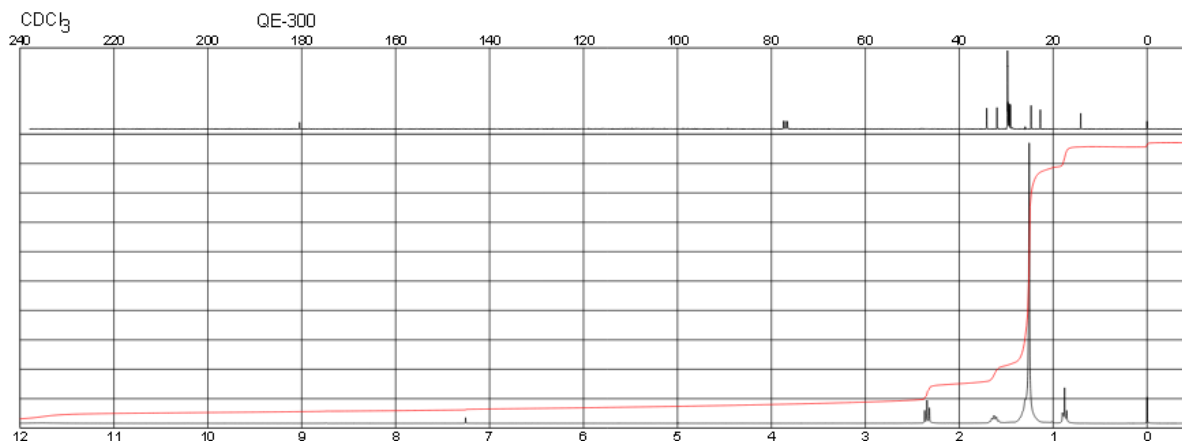
We wnioskach porównać wydajność izolacji masła kakaowego z zastosowaniem poszczególnych metod.

Dane spektroskopowe kwasu stearynowego

Widmo IR (KBr)

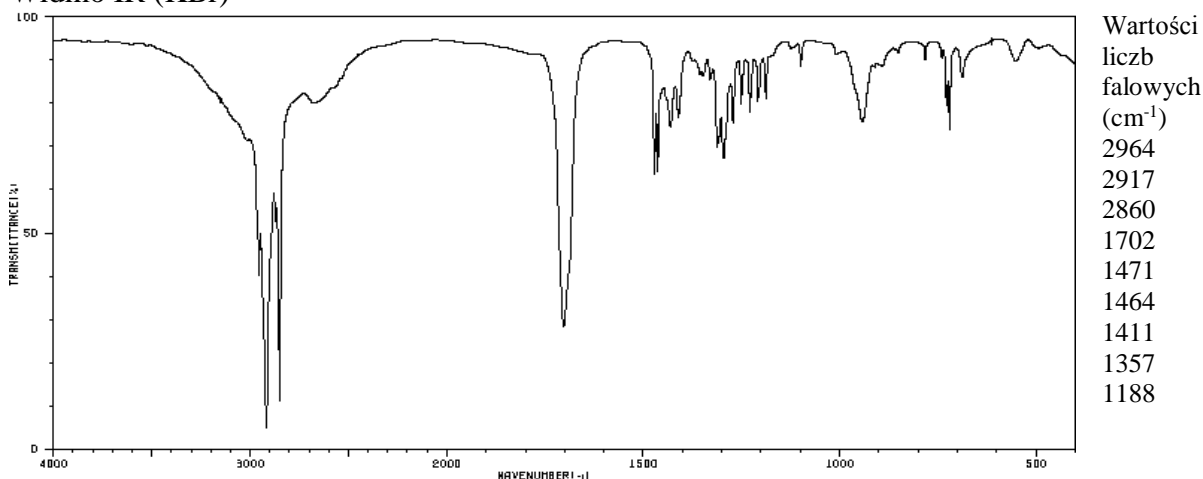


Widma ^1H NMR i ^{13}C NMR w CDCl_3 (katalog Sigma Aldrich)

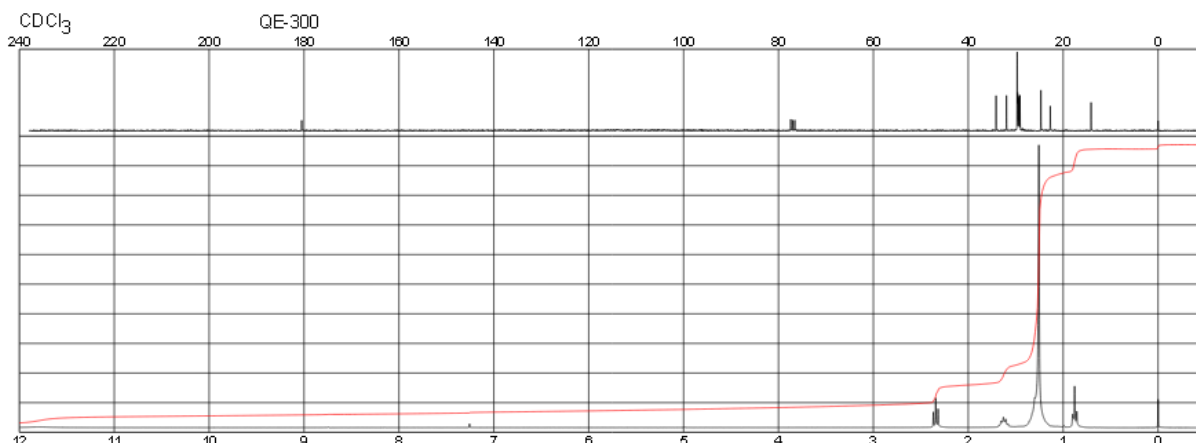


Dane spektroskopowe kwasu palmitynowego

Widmo IR (KBr)



Widma ^1H NMR i ^{13}C NMR w CDCl_3 (katalog Sigma Aldrich)



Zagadnienia

- Metody wyodrębniania składników z surowca roślinnego
- Lipidy i wyższe kwasy tłuszczowe (budowa, nazewnictwo, podział, reaktywność)
- Zastosowanie wyższych kwasów tłuszczowych, kwasy ω -3 i ω -6; ich działanie na organizm człowieka
- Analiza widm produktów

4.9. Otrzymywanie mydeł sodowych i potasowych

Odczynniki:

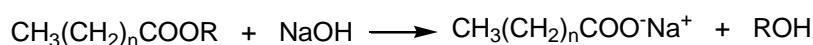
wodorotlenek sodu	0,22 - 0,50 g
wodorotlenek potasu	0,28 - 0,70 g
wyższy kwas tłuszczowy	1 g
lipid	2 g
ester wyższego kwasu tłuszczowego	1 g
EtOH	ok. 40 mL

Aparatura i szkło:

kolba okrągłodenna poj. 250 mL
chłodnica zwrotna
zlewka

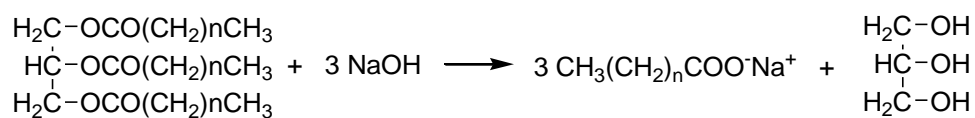
Metody otrzymywania mydeł:

1) zasadowa hydroliza estrów wyższych kwasów tłuszczowych np. mirystynianu metylu



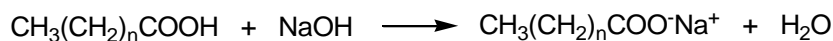
gdzie: $n = 12, 14, 16$
 $\text{R} = \text{CH}_3$

2) zasadowa hydroliza lipidów (trójglicerydów)



gdzie: $n = 10, 12, 14, 16$

3) reakcja wyższego kwasu tłuszczowego z wodorotlenkiem sodu lub potasu



gdzie: $n = 12, 14, 16$



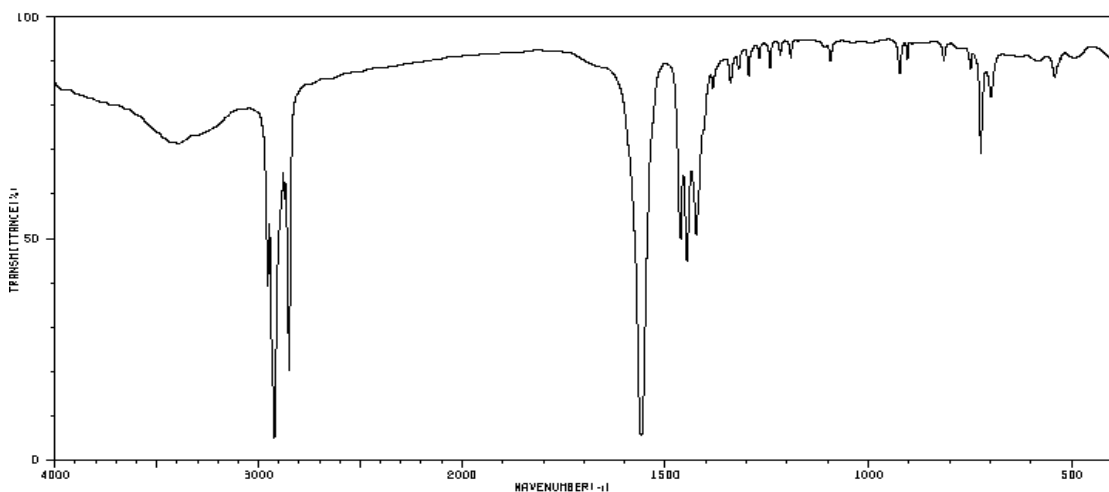
W kolbie okrągłodennej o pojemności 250 mL umieścić odpowiednie ilości substratów zestawione w poniższej tabeli:

1.	Mydło z estru: - mirystynian metylu	1 g mirystynianu metylu 0,22 g wodorotlenku sodu lub 0,28 g wodorotlenku potasu
2.	Mydło z lipidu: - olejek migdałowy - olejek kokosowy	2 g olejku migdałowego lub kokosowego 0,5 g wodorotlenku sodu lub 0,7 g wodorotlenku potasu
3.	Mydło z kwasu mirystynowego	1 g kwasu mirystynowego 0,24 g wodorotlenku sodu lub 0,30 g wodorotlenku potasu

Należy sporządzić roztwór poprzez rozpuszczenie jednej z substancji tłuszczowych z wymienionych powyżej w 30 mL alkoholu etylowego w kolbie kulistej o poj. 250 mL i następnie dodać 45 mL roztworu zawierającego odpowiednią ilość wodorotlenku sodu lub potasu (masy podane w tabeli) w mieszaninie woda-etanol (9:1 v/v). Otrzymaną mieszaninę należy ogrzewać do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 2 godziny. Po ochłodzeniu uzyskane mydło przenosi się łopatką do zlewki zawierającej 110-150 mL mieszaniny pokruszonego lodu z wodą. Następnie przesączyć, osuszyć i zważyć otrzymane mydło oraz obliczyć wydajność przeprowadzonej reakcji.

Dane spektroskopowe mirystynianu sodu

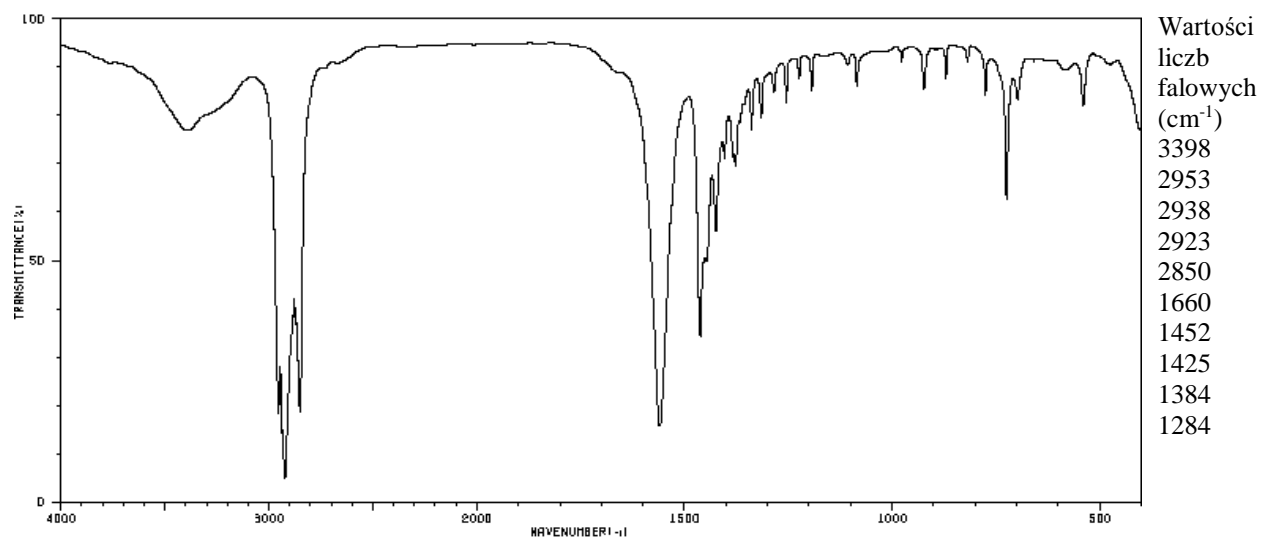
Widmo IR (KBr)



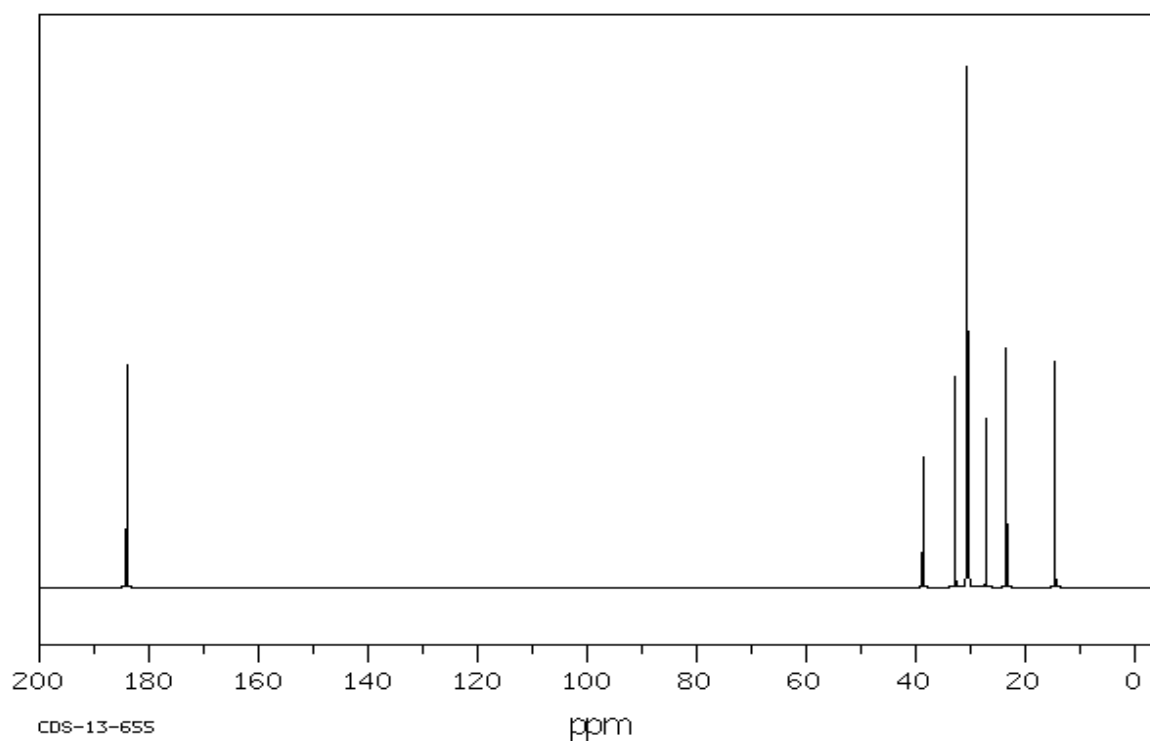
Wartości
liczb
falowych
(cm^{-1})
2963
2923
2373
2860
1559
1424
1383
1295
1243

Dane spektroskopowe laurynianu sodu

Widmo IR (nujol)

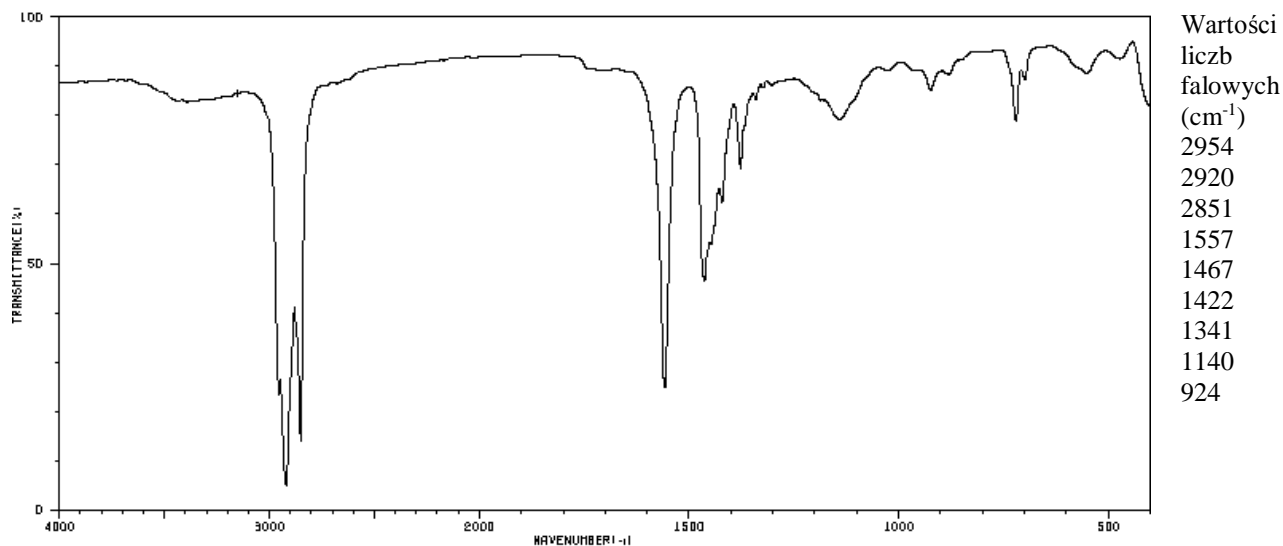


Widmo ¹³C NMR w D₂O



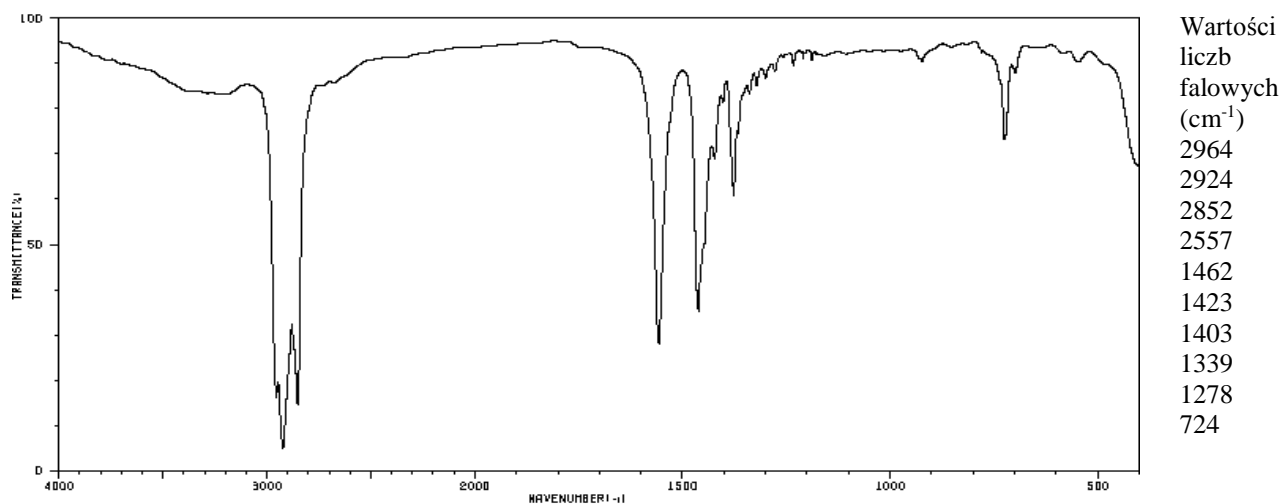
Dane spektroskopowe stearynianu sodu

Widmo IR (nujol)



Dane spektroskopowe palmitynianu sodu

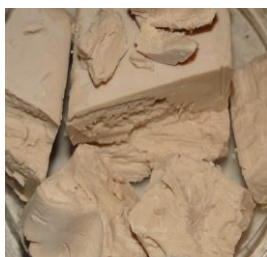
Widmo IR (nujol)



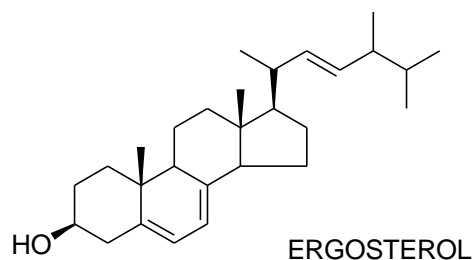
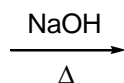
Zagadnienia

- Lipidy i wyższe kwasy tłuszczowe (budowa, nazewnictwo, podział, reaktywność)
- Metody otrzymywania mydeł
- Właściwości piorące mydeł
- Analiza widm – porównanie właściwości substratów i produktów

5. Ergosterol z drożdży piekarskich



DROŻDŻE PIEKARSKIE



Odczynniki:

drożdże piekarskie	25 g
50% NaOH	6 mL
toluen	60 mL
etanol	6 mL
bezw. Na ₂ SO ₄	

Aparatura i szkło:

kolba okrągłodenna poj. 250 mL
chłodnica
cylinder miarowy poj. 50 mL
rozdzielacz poj. 250 mL
kolba stożkowa poj. 100 mL
kolba stożkowa poj. 250 mL
szklany lejek
zlewka poj. 100 mL
zestaw do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem

W kolbie okrągłodennej o poj. 250 mL umieścić 25 g świeżych drożdży piekarskich i ogrzewać na łaźni wodnej w temperaturze 50-60 °C do utworzenia zawiesistej masy. Do tej masy, ciągle mieszając, dodać 6 mL 50% roztworu wodorotlenku sodu. Następnie mieszaninę ogrzewać pod chłodnicą zwrotną przez 3 godz. Całość ochłodzić i pozostawić do następnych ćwiczeń.

Zimną mieszaninę poreakcyjną przenieść do rozdzielacza o poj 250 mL i ekstrahować toluenem (4 x 15 mL), a następnie CHCl₃ (4 x 25 mL). Roztwory suszyć nad bezw. siarczanem sodu (ok. 30 min, mieszając za pomocą mieszadła magnetycznego), odsączyć środek suszący. Rozpuszczalniki odparować pod zmniejszonym ciśnieniem (wyparka). Surowy produkt rozpuścić w 5 mL gorącego etanolu i po przesączeniu na gorąco pozostawić do pojawienia się osadu. Produkt odsączyć i następnie krystalizować mieszaniny 1 mL etanolu i 1 mL toluenu.

Wydzielone kryształy suszyć na powietrzu. Zważyć i obliczyć wydajność procesu. Zmierzyć temperaturę topnienia (lit. t.t. 160-162 °C).

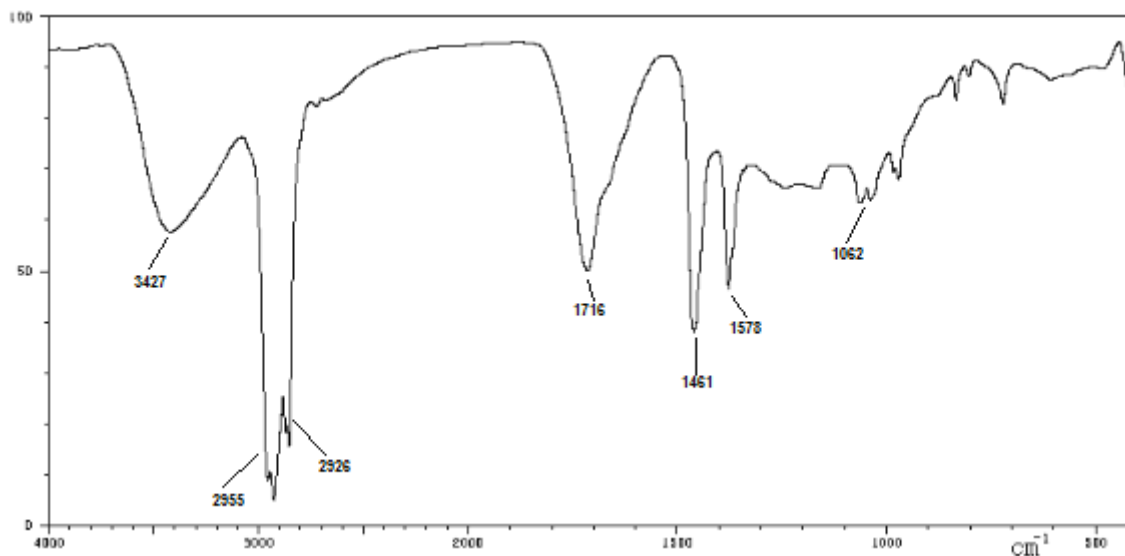
Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Eluent: toluen-octan etylu (5:1, v/v)

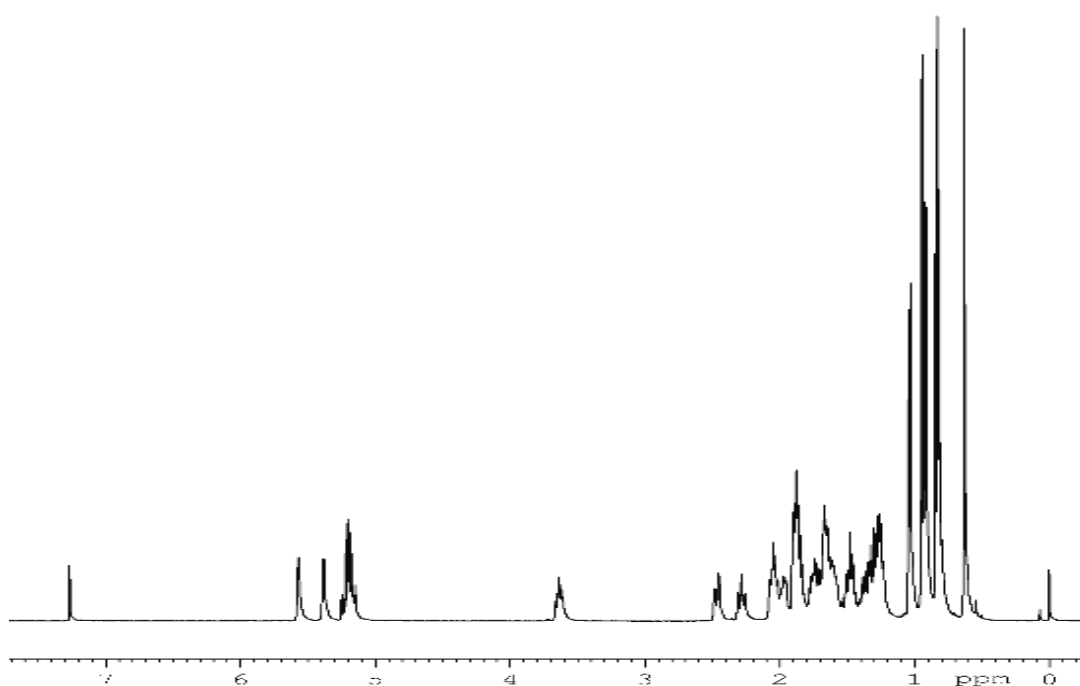
Po wysuszeniu zanurzyć płytkę w 10% H₂SO₄ – podsuszyć za pomocą suszarki. Następnie płytkę wywołuje się termicznie poprzez delikatne podgrzanie na płycie elektrycznej.

Dane spektroskopowe ergosterolu

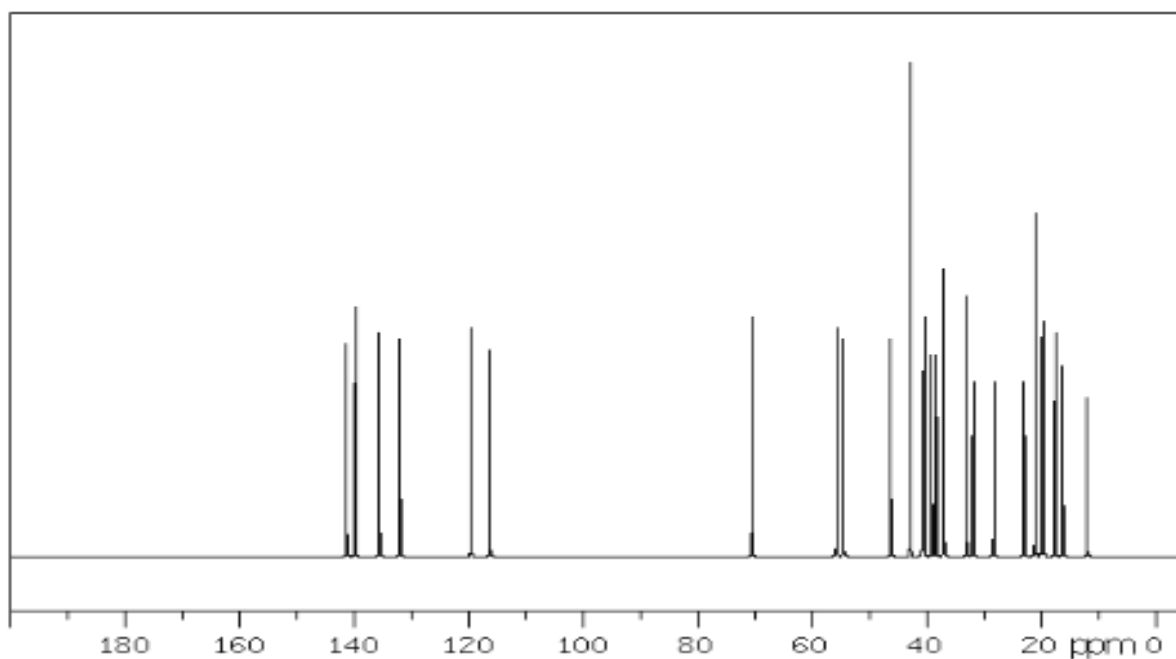
Widmo IR (film)



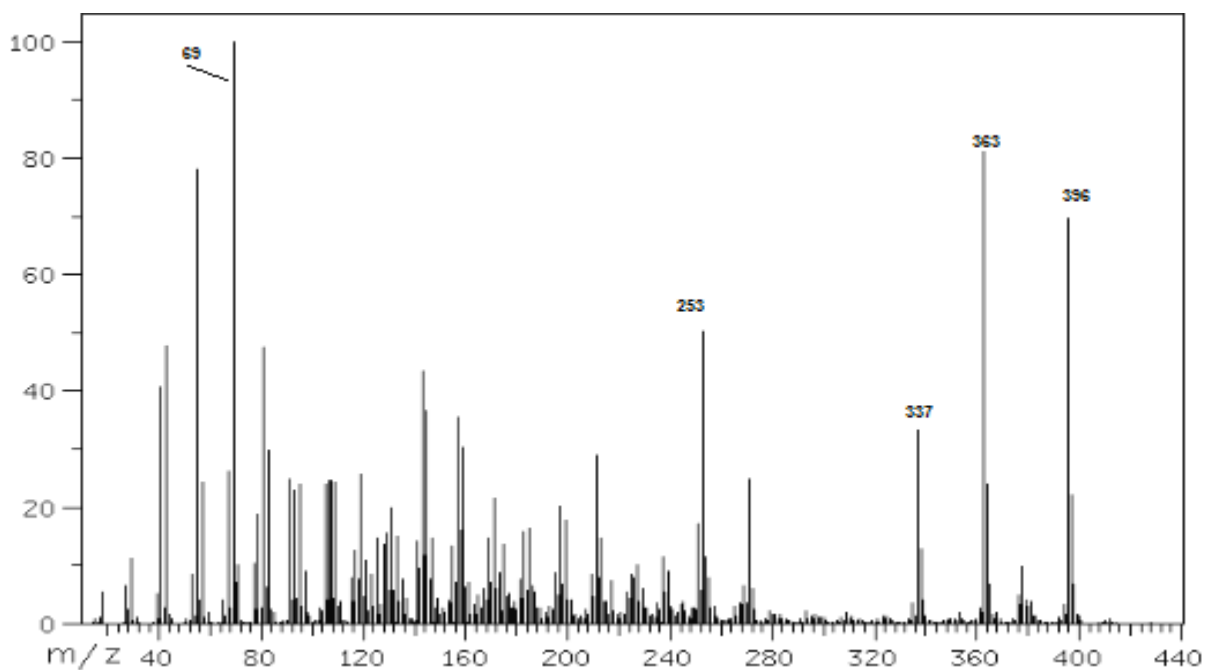
Widmo ¹H NMR w CDCl₃, (500 MHz)



Widmo ^{13}C NMR w CDCl_3 (500 MHz)



Widmo EI-MS ($M=396$ g/mol)

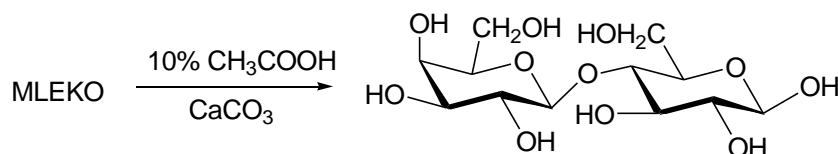


Zagadnienia

- Steroidy (budowa, podział)
- Modyfikacja grup funkcyjnych w steroidach
- Stereochemia
- Analiza widm produktu

6. Węglowodany

6.1. Laktoza z mleka



Odczynniki:

mleko w proszku	30 g
10% kwas octowy	18 mL
węglan wapnia	2,4 g
etanol	150 mL

Aparatura i szkło:

zlewka poj. 300 mL
cylinder miarowy
zestaw do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem
kolba okrągłodenna poj. 250 mL

W zlewce przygotować zawiesinę 30 g odtłuszczonego mleka w proszku w 60 mL ciepłej wody o temperaturze 40-50 °C.

Następnie do zawiesiny wlać, ciągle mieszając za pomocą mieszadła magnetycznego, ok. 18 mL 10% roztworu kwasu octowego. Podczas mieszania zawiesiny następuje koagulacja kazeiny. Kazeinę odsączyć na lejku Büchnera. Można użyć do tego celu tetry lub gazy.

W celu wyklarowania otrzymanego przesączu należy przelać go do zlewki, dodać 2,4 g węglanu wapnia, mieszać i ogrzać do wrzenia przez 10 min. (Uwaga! Roztwór się pieni!). Do gorącego roztworu dodać odrobinę węgla aktywnego, w celu usunięcia wydzielonych albumin i pozostałości CaCO₃. Mieszaninę przesączyć przez warstwę ziemi okrzemkowej w następujący sposób: Przygotować zestaw do sączenia z lejkiem Büchnera. Do lejka włożyć sączonek i warstwę ziemi okrzemkowej (Celit), którą należy dokładnie ubić i nałożyć sączonek. Na tak przygotowany lejek wylać gorący roztwór z węglem aktywnym. Otrzymany klarowny przesącz zatężyć do ok. 30 mL przez odparowanie wody na wyparce. **UWAGA! Nie przegrzewać**, aby produkt nie uległ karmelizacji!

Stężony roztwór przelać do małej zlewki dodać 10 mL etanolu i pozostawić do krystalizacji. Laktozę odsączyć na lejku Büchnera i przemyć niewielką ilością zimnego etanolu. Zważyć i obliczyć wydajność procesu. Temperatura topnienia monohydratu α-D-laktozy wynosi 219 °C (rozkład).

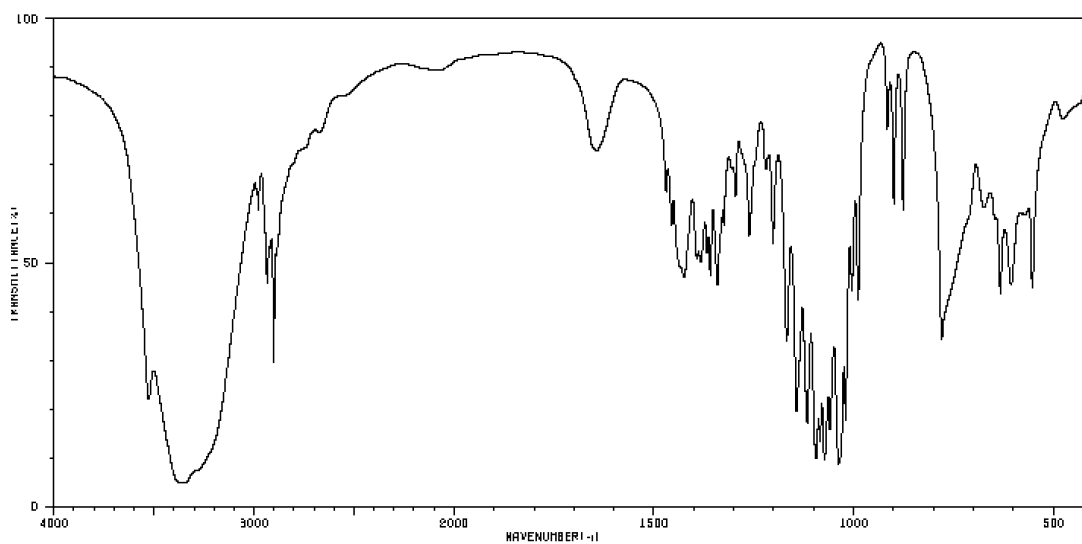
Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Eluent: toluen-lodowaty kwas octowy-metanol (2:2:6, v/v/v). Po wysuszeniu płytkę wywołuje się termicznie poprzez lekkie podgrzanie na płytce elektrycznej.

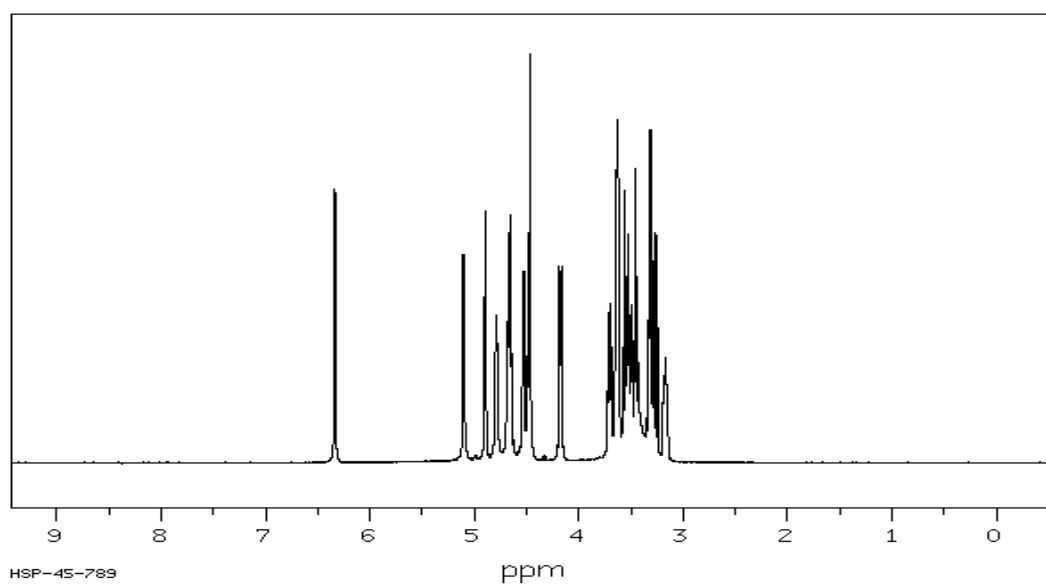
Próba Wohlkego: W czasie ogrzewania roztworu laktozy w obecności KOH powstaje żółte zabarwienie, natomiast w obecności glukozy i galaktozy pojawia się czerwone zabarwienie.

Dane spektroskopowe laktozy

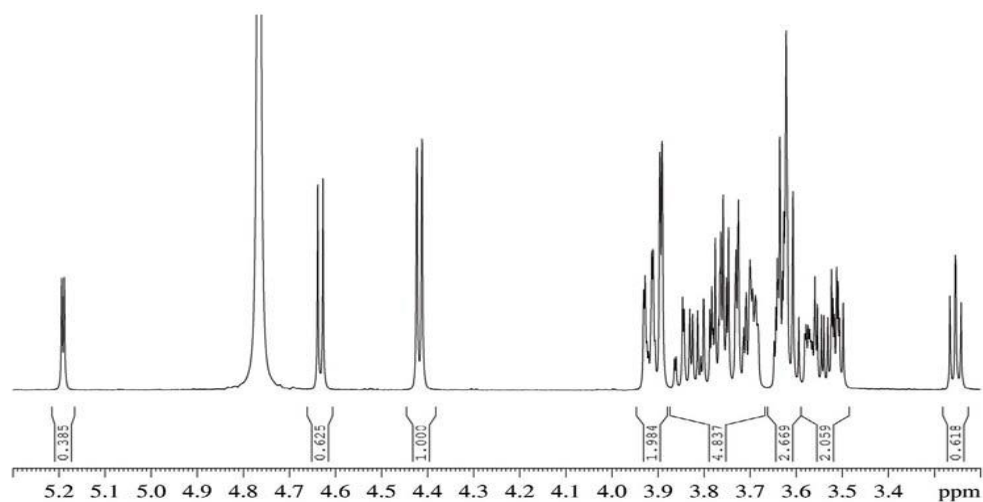
Widmo IR (KBr)



Widmo ¹H NMR w DMSO-d₆ (400 MHz)



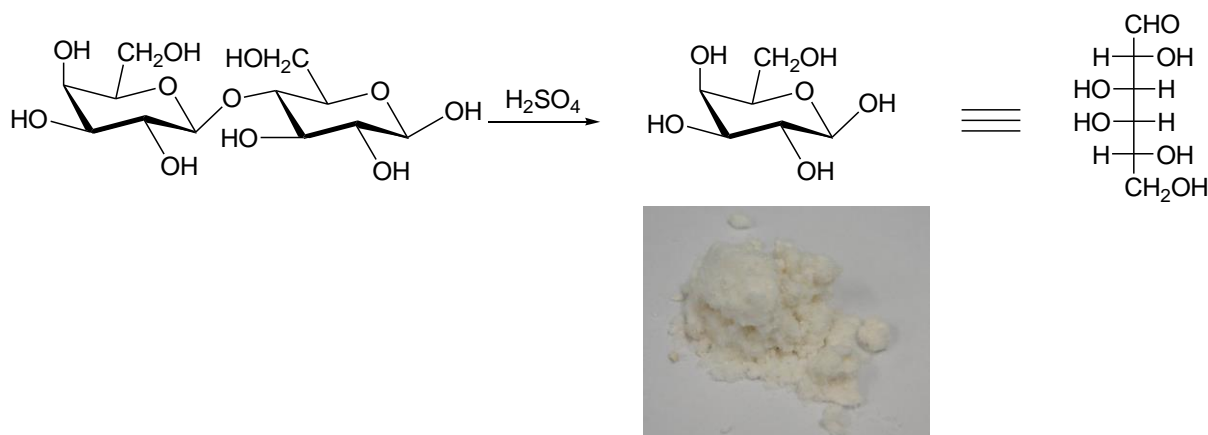
Widmo ^1H NMR w D_2O (700 MHz)



Zagadnienia

- Węglowodany; monosacharydy i disacharydy (budowa, nazewnictwo, podział)
- Reakcje: estryfikacji, hydrolizy sacharydów, degradacja Wohla, synteza Kilianiego-Fishera
- Stereochemia
- Anomery monosacharydów
- Wiązanie glikozydowe
- Rozróżnienie laktozy od galaktozy na podstawie reakcji barwnych oraz widm IR i NMR

6.2. D-Galaktoza z laktozy



Odczynniki:

laktoza	10 g
stężony kwas siarkowy	0,3 mL
wodorotlenek baru $\times 8H_2O$	1,5 g
lodowaty kwas octowy	12,5 mL
metanol	3 mL
eter dietylowy	10 mL
kwas mlekowy	
$Cu(CH_3COO)_2$	

Aparatura i szkło:

kolba kulista poj. 100 mL
chłodnica zwrotna
zestaw do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem
zlewka poj. 50 mL

Do kolby kulistej o poj. 100 mL, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, wlać roztwór 10 g laktozy w 25 mL wody z dodatkiem 0,3 mL kwasu siarkowego i ogrzewać do wrzenia przez 2 godz. **Nie przegrzewać!** Może dojść do utworzenia karmelu z cukru!

Do gorącego jeszcze roztworu dodać wodorotlenku baru, tak aby uzyskać odczyn obojętny. Po ochłodzeniu mieszaninę przesączyć.

Klarowny przesącz (lekko żółty) zatężyć do połowy objętości na wyparce próżniowej. Przebrać do małej zlewki, zakwasić ok. 0,3 mL lodowatego kwasu octowego i pozostawić do krystalizacji w łaźni woda–lód. Otrzymany krystaliczny produkt odsączyć na lejku Büchnera, przemyć kolejno kwasem octowym, metanolem i eterem dietylowym. Zważyć i obliczyć wydajność procesu. Zmierzyć temperaturę topnienia; lit. t.t. $165\text{ }^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D = +81,5$ ($c=1$, H_2O).

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Eluent: propanol-kwas octowy-woda (4:1:5, v/v/v). Po wysuszeniu płytkę wywołuje się termicznie poprzez lekkie podgrzanie na płytce elektrycznej.

Próba Wohlkego: W czasie ogrzewania roztworu zhydrolizowanej laktozy (galaktoza + glukoza) w obecności KOH powstaje czerwone zabarwienie, natomiast w obecności laktozy pojawia się zabarwienie żółte.

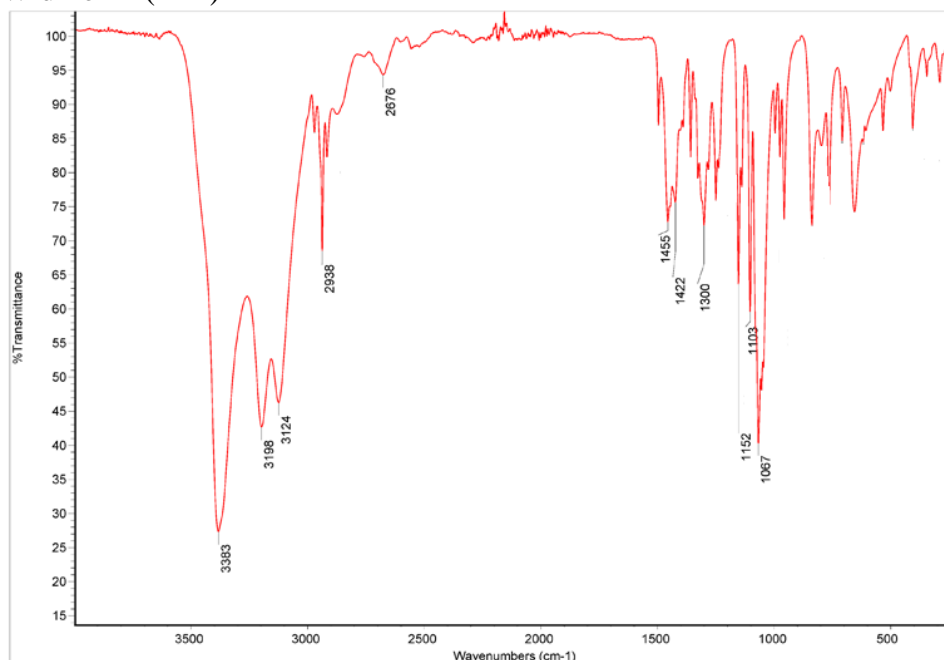
Próba Barfoeda:

Próba pozwala na odróżnienie monosacharydów od disacharydów redukujących na podstawie redukcji w środowisku lekko kwaśnym. Monosacharydy łatwo wykazują właściwości redukujące, natomiast disacharydy dopiero po dłuższym ogrzaniu, gdy dojdzie do rozerwania wiązania glikozydowego. Zanotować obserwowane zmiany barwy.

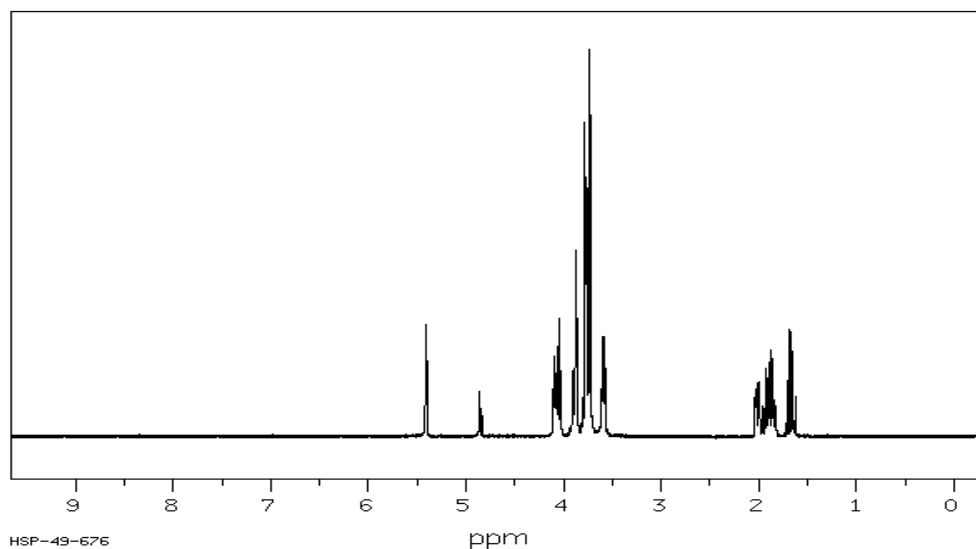
Odczynnik Barfoeda – rozpuścić na gorąco 2,4 g $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ w 45 mL wody i dodać 2,5 mL 8,5% kwasu mlekowego. Wstrząsnąć do rozpuszczenia osadu. Oziębic, uzupełnić wodą do 50 mL i przesączyć.

Dane spektroskopowe D-galaktozy

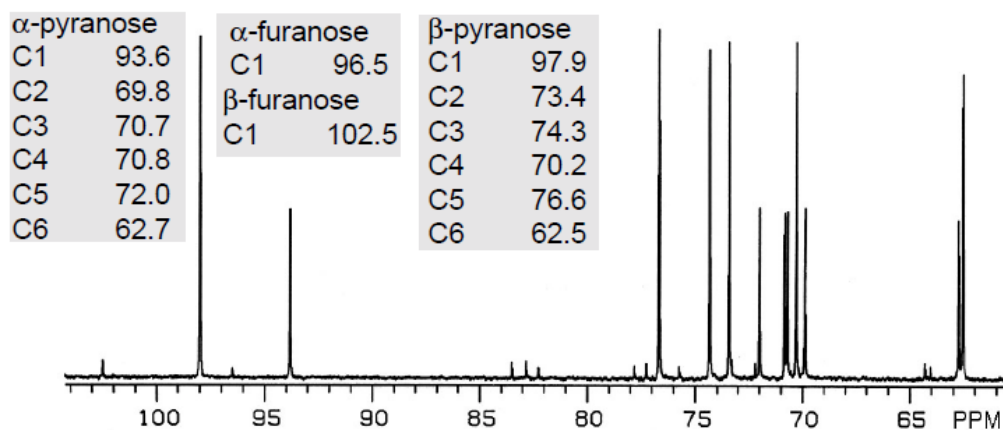
Widmo IR (KBr)



Widmo ¹H NMR w D₂O (400 MHz).



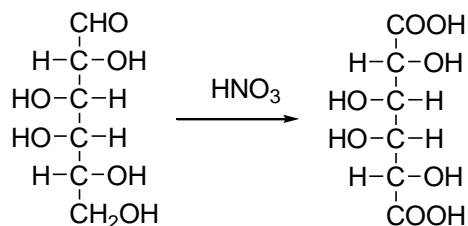
Widmo ^{13}C NMR w D_2O (75 MHz)



Zagadnienia

- Węglowodany; monosacharydy i disacharydy (budowa, nazewnictwo, podział)
- Reakcje: estryfikacji, hydrolizy sacharydów, degradacja Wohla, synteza Kilianiego-Fishera
- Stereochemia
- Anomery monosacharydów
- Wiązanie glikozydowe
- Rozróżnienie laktozy od galaktozy na podstawie reakcji barwnych oraz widm IR i NMR

6.3. Kwas śluzowy z galaktozy



Odczynniki:

galaktoza
65% HNO₃
10% NaOH
HCl rozc. (1:1, v/v)
woda destylowana

1 g
10 mL

Aparatura i szkło:

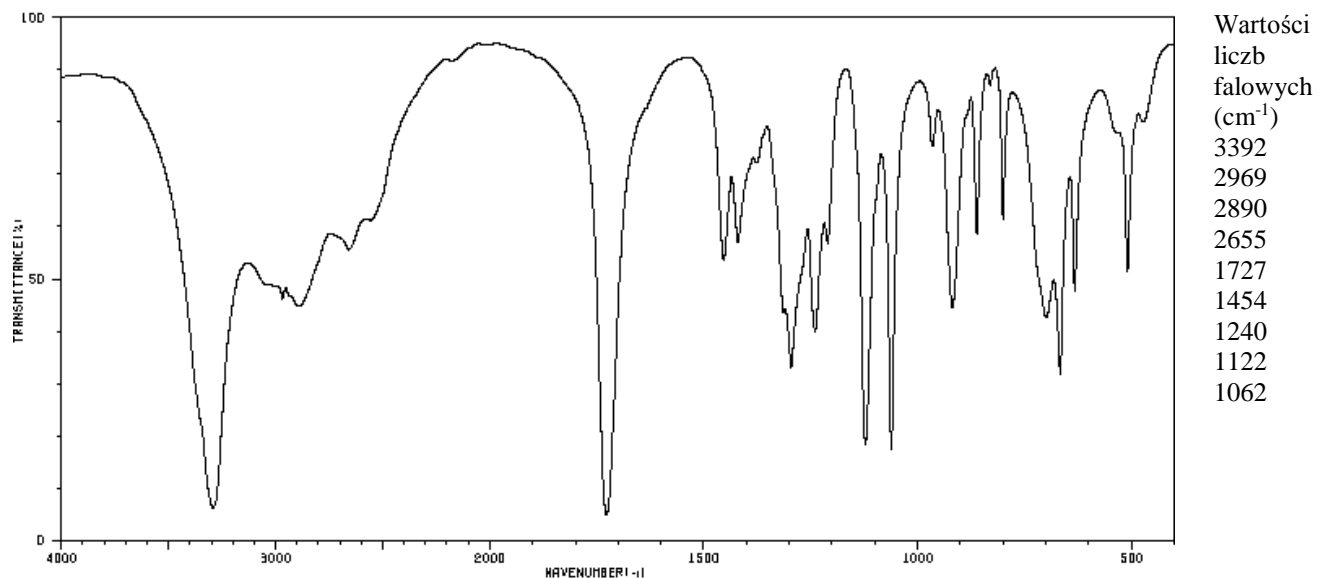
kolba okrągłodenna o poj. 50 mL
nasadka na kolbę z węzłem do odprowadzania gazów
zestaw do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem
czasza grzejna
łapa
zlewki

1 g Galaktozy należy umieścić w kolbie okrągłodennej o poj. 50 mL zaopatrzonej w nasadkę połączoną z węzłem do odprowadzania gazów i dodać 10 mL 65% kwasu azotowego.

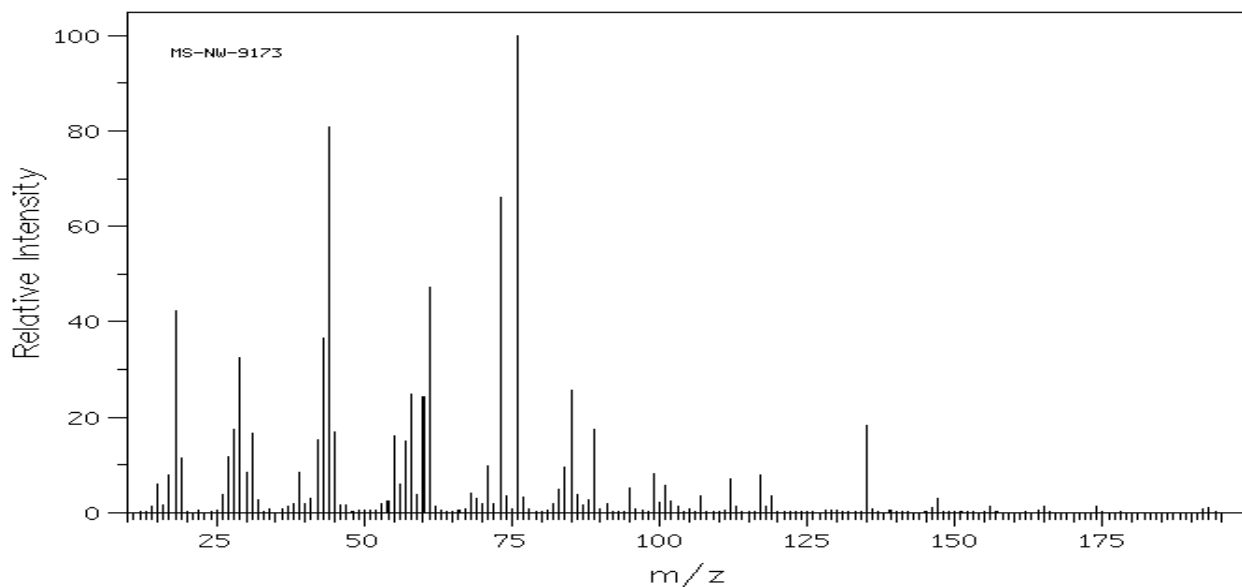
Pracę należy prowadzić pod sprawnie działającym dygestorium! Mieszaninę odparować do objętości roztworu ok. 2 mL poprzez **bardzo delikatne** ogrzewanie na czaszy grzejnej (wydzielają się brunatne dymy, tlenki azotu). Mieszanina gęstnieje, gdyż wydziela się kwas śluzowy. Pozostawić do zupełnego ostygnięcia i rozcieńczyć ją 3 mL wody. Otrzymany osad sączy się i następnie przenosi ilościowo do zlewki. W celu oczyszczenia surowego produktu należy dodać niewielką ilość roztworu NaOH aż do rozpuszczenia osadu i ponownie wytrącić rozcieńczonym HCl (1:1, v/v). **W czasie dodawania wodorotlenku sodu, a potem kwasu solnego należy uważać, aby temperatura roztworu nie przekroczyła 25 °C.** Czysty produkt – kwas śluzowy (D-galaktarowy) w postaci krystalicznego proszku o temperaturze topnienia 211-213 °C (rozkład) otrzymuje się z 58 % wydajnością.

Dane spektroskopowe kwasu śluzowego

Widmo IR (KBr)



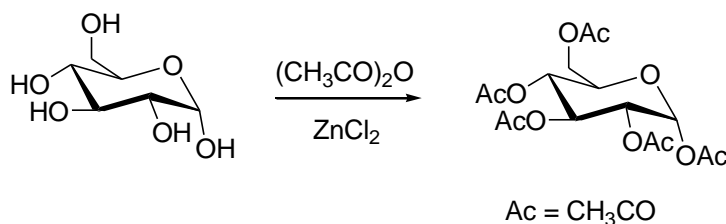
Widmo EI-MS (M=210 g/mol)



Zagadnienia

- Węglowodany; monosacharydy (budowa, nazewnictwo, podział, reaktywność)
- Odczynniki utleniające grupy hydroksylowe i karbonylowe
- Kwas śluzowy, właściwości
- Analiza widm – porównanie właściwości substratu i produktu

6.4. 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetylo- α -D-glukopiranoza



Odczynniki:

bezwodny chlorek cynku	0,54 g
eter dietylowy	100 mL
bezwodnik octowy	12,3 mL
α -D-glukoza	2,52 g
etanol do krystalizacji	

Aparatura i szkło:

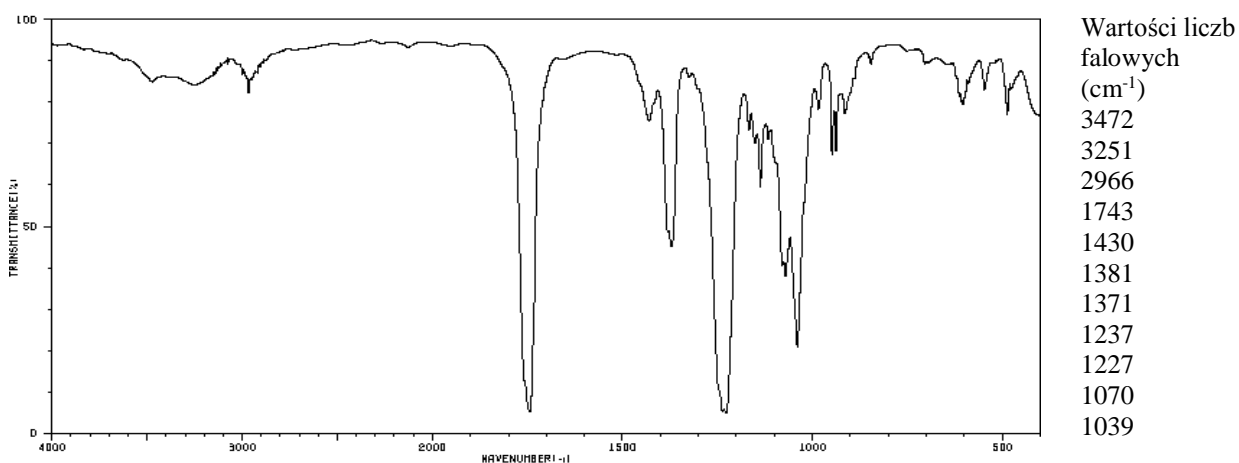
kolba dwuszyjna okrągłodenna poj. 100 mL
 chłodnica zwrotna
 rurka z chlorkiem wapnia
 mieszadło magnetyczne
 termometr
 łaźnia wodna
 łaźnia olejowa
 zlewka poj. 200 mL
 zestaw do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem

Celem ćwiczenia jest przeprowadzenie reakcji estryfikacji α -D-glukozy.

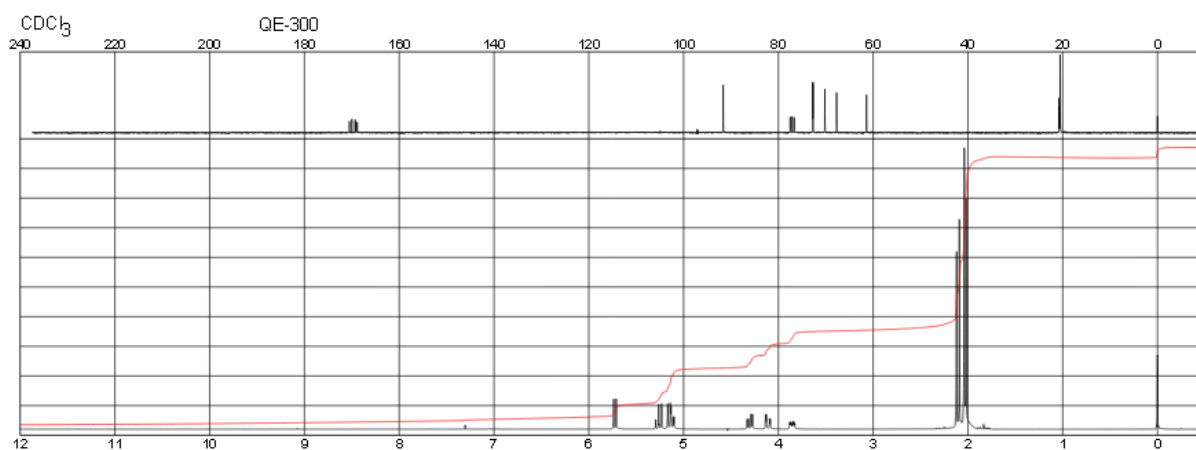
W dwuszyjnej kolbie kulistej o pojemności 100 mL zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, rurkę ze środkiem suszącym, termometr i mieszadło magnetyczne umieszcza się 0,54 g bezwodnego chlorku cynku (**jest higroskopijny, dlatego należy go bardzo szybko umieścić w kolbie reakcyjnej**) i 12,3 mL bezwodnika octowego. Mieszaninę ogrzewa się na wrzącej łaźni wodnej, mieszając za pomocą mieszadła magnetycznego przez 5-10 minut, aż większość chlorku cynku ulegnie rozpuszczeniu. Wówczas powoli dodaje się 2,52 g sproszkowanej D-glukozy. W czasie dodawania glukozy roztwór w kolbie należy mieszać łagodnie, aby kontrolować energicznie przebiegającą reakcję, a następnie mieszaninę ogrzewa się przez 1 godzinę w czaszy grzejnej w temperaturze 100 °C. Po tym czasie mieszaninę wylewa się do dość dużej zlewki zawierającej 125 mL wody z lodem i miesza energicznie, aby ułatwić hydrolizę nieprzereagowanego bezwodnika octowego. Wydziela się olej, który po ok. 30 minutach stopniowo zestala się. Produkt odsącza się, przemywa dokładnie zimną wodą i krystalizuje kilkakrotnie z alkoholu etylowego aż do uzyskania stałej temperatury topnienia. Czysty produkt wykazuje t.t. 110-111 °C. Wydajność 3,5g (63%).

Dane spektroskopowe 1,2,3,4,6-penta-O-acetylo- α -D-glukopiranozy

Widmo IR (KBr)



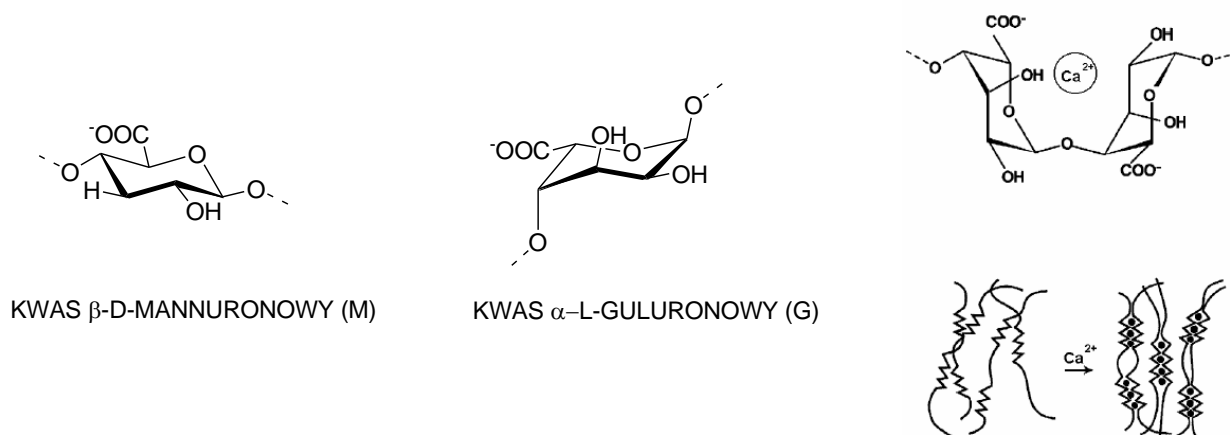
Widma ¹H NMR i ¹³C NMR w CDCl₃ (katalog Sigma Aldrich)



Zagadnienia

- Węglowodany; monosacharydy (budowa, nazewnictwo, podział, reaktywność)
- Reakcje estryfikacji
- Analiza widm – porównanie właściwości substratu i produktu

6.5. Łączenie zapachów i kolorów – formowanie alginianowych kuleczek/mikrokapsulek



Monomery alginianu i schemat reakcji żelowania alginianu sodu.

Odczynniki:

1% roztwór CaCl_2
2% roztwór alginianu sodu
woda destylowana
olejek zapachowy np. lawendowy,
cynamonowy lub zapachowy olejek do ciast,
olej antocyjanów z hibiskusa, malwy czarnej,
płatków kwiatów

Aparatura i szkło:

zlewki poj. 150 mL i 100 mL
strzykawka z igłą
krystalizator
lejek
bagietka
mieszadło magnetyczne

Alginiany

Alginiany pozyskuje się prowadząc ekstrakcję ścian komórkowych alg z klasy Brunatnic (*Phaeophyceae*). Kwasy alginowe najczęściej występują w postaci jednowartościowych soli (np. alginianu sodu), stosowanych w różnych dziedzinach przemysłu. Alginian sodu jest nietoksycznym zagęstnikiem (stabilizatorem, substancją żelującą) o symbolu E 401 i występuje w postaci proszku lub granulek o białawej barwie, nie posiada smaku i zapachu.

Rozpuszczając powoli alginian w wodzie otrzymuje się zwięzły koloidalny żel, przy czym 1g suchego alginianu sodu jest w stanie związać 25-30 g wody, a pH 1% roztworu wynosi 6,0-8,5. W ciągu ostatnich kilku lat coraz częściej i chętniej stosowany w kuchni molekularnej do uzyskania zaskakujących efektów kulinarnych – dania o najróżniejszych smakach i kolorach serwowane w postaci galaretowatych kuleczek.

Pod względem budowy chemicznej cząsteczkę alginianu należy rozpatrywać jako liniowy kopolimer zbudowany z kwasu α -L-guluronowego (G) i β -D-mannuronowego (M), a obecność grup karboksylowych w obu monomerach powoduje, że alginian jest polianionem. W cząsteczce tego naturalnego polimeru można wyróżnić trzy regiony: region zbudowany z kwasu guluronowego (G) lub mannuronowego (M) oraz region mieszany (MG). W zależności od gatunku i rodzaju tkanki, z której izolowano alginian występuje zróżnicowana ilość poszczególnych monomerów, a także długość regionów, co bezpośrednio wpływa na właściwości tych związków, jak i żeli z nich otrzymywanych. Struktura przestrzenna

regionów M przybiera kształt rozciągniętej wstążki, a w regionach G występują regularne zgięcia. W wyniku tego tworzą się puste przestrzenie pomiędzy dwoma monomerami G, które rozmiarem odpowiadają wielkości jonu wapnia, w związku z tym wykazują większe powinowactwo do tych jonów (niż do jonów sodu). Żelowanie następuje po dodaniu jonów wapnia do alginianu bogatego w regiony zbudowane z kwasu guluronowego (G). Natomiast regiony zbudowane z kwasu mannuronowego (M) wykazują słabe powinowactwo do jonów wapnia i w tych fragmentach żelu wytworzą się rejony plastyczne.

Alginian sodu może tworzyć żele także w obecności jonów innych metali dwuwartościowych: baru, kobaltu, cynku, miedzi, żelaza i trójwartościowych: żelaza i glinu, jednak tak wytworzone żele nie są biokompatybilne, co powoduje, iż nie są one w praktyce stosowane.

Mikrokapsułkowanie

Proces ten polega na utworzeniu kapsulek, w których wyróżnić można dwie warstwy; pierwszą jest rdzeń np. ciecz lub żel, a drugą warstwę stanowi otoczka utworzona z żelowego polimeru. Kapsułki alginianowe są biokompatybilne oraz biodegradowalne, a procedura otrzymywania żelu jest łatwa, stosunkowo tania i nietoksyczna. Kapsułki alginianowe są tym bardziej wytrzymałe im więcej jest regionów G w ich strukturze. Alginian wapnia wykazuje małą odporność na środki chelatujące wapń takie jak aniony wielowartościowe np. fosforany, cytryniany, mleczany oraz kationy metali, które mogą wypierać wapń z polimeru. Ponadto, w celu zachowania stabilności kapsuł należy przechowywać je w środowisku wodnym, zwłaszcza żele bogate w regiony G łatwo ulegające synerezie (kurczenie żelu z jednoczesnym wydzieleniem się z niego płynu).

Celem ćwiczenia jest otrzymanie barwnych mikrokapsulek zawierających wewnątrz olejki zapachowe.

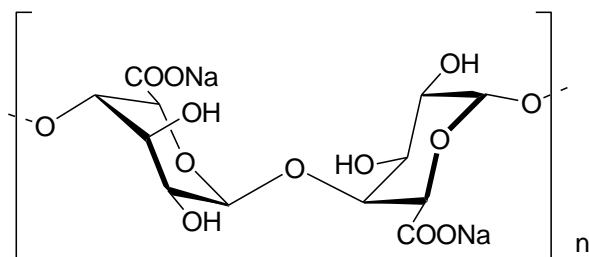
1g Alginianu sodu umieścić w zlewce o pojemności 100 mL i dodać 50 mL wody destylowanej, mieszać bagietką do uzyskania możliwie jednolitej masy. W celu otrzymania jednorodnej mieszaniny należy masę odstawić na kilka godzin, aby pozbyć się pęcherzyków powietrza.

Przygotować 200 mL wodnego roztworu chlorku wapnia w krystalizatorze, w którym należy umieścić też mieszadło magnetyczne, a krystalizator ustawić na mieszadle magnetycznym.

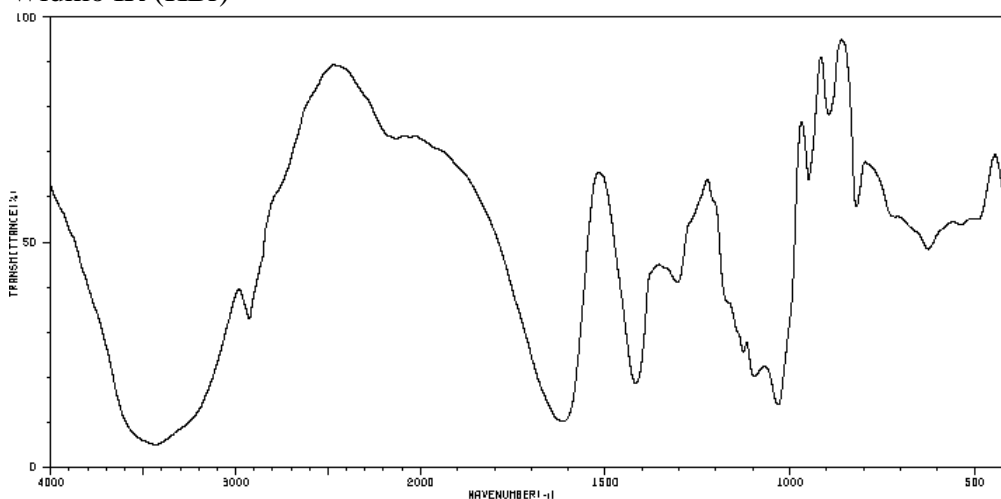
Część masy alginianowej przenieść delikatnie do drugiej zlewki i dodać kilka kropli zapachowego olejku (wcześniej konieczne zagęszczonego, otrzymanego wg opisu na str. 5, 83, 87 i kilka kropli olejku antocyjanów (również wcześniej zagęszczonego, otrzymanego wcześniej wg opisu na str. 109), ponieważ obecność rozpuszczalników organicznych wpływa niekorzystnie na formowanie się kapsulek. Mieszając składniki należy robić to bardzo powoli, aby nie powstały pęcherzyki powietrza, gdyż one także uniemożliwiają prawidłowe wytworzenie kapsulek. Tak przygotowaną mieszaniną należy napełnić plastikową strzykawkę, umieścić na statywie 2 cm nad wcześniej uszykowanym krystalizatorem z roztworem chlorku wapnia i mieszadłem magnetycznym (umieszczonym na mieszadle

magnetycznym) i rozpocząć wkraplanie. Tempo wkraplania powinno być takie, aby formowały się kształtne kuleczki. Po kilku minutach powstałe kolorowe kulki można odsączyć i wypłukać w zlewce z wodą destylowaną.

Dane spektroskopowe alginianu sodu

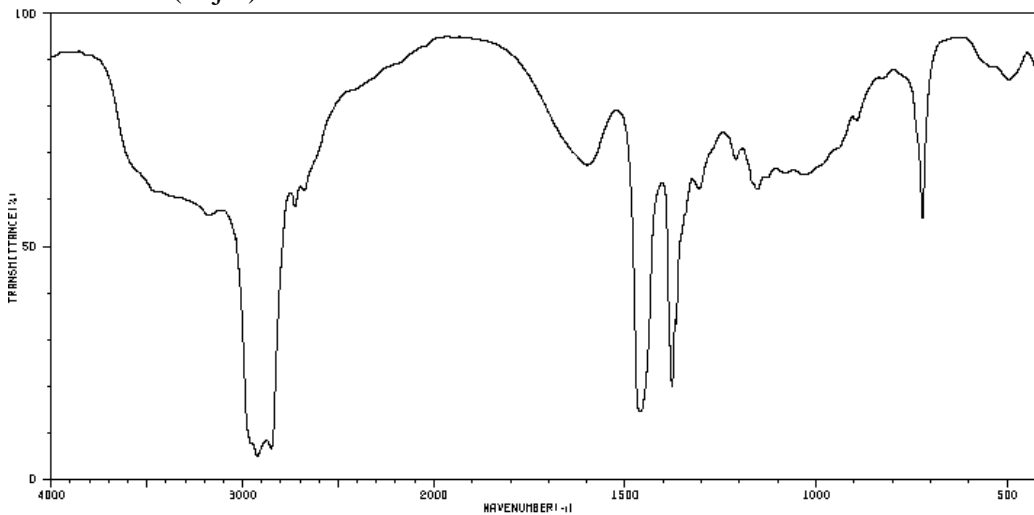


Widmo IR (KBr)



Wartości
liczb
falowych
(cm⁻¹)
2927
1620
1615
1418
1304
1126
1096
1032
949

Widmo IR (nujol)



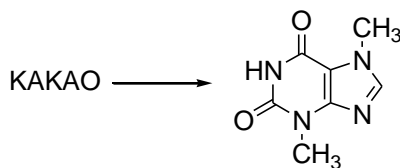
Wartości
liczb
falowych
(cm⁻¹)
2943
2851
2825
1604
1599
1460
1377
1211
722

Zagadnienia

- Polisacharydy (podział, budowa, przykłady, właściwości, reaktywność)
- Zastosowanie alginianów
- Analiza widm produktu

7. Alkaloidy purynowe

7.1. Izolacja teobrominy z kakao



Metoda A

Odczynniki:

kakao	10 g
tlenek magnezu (MgO)	3 g
metanol	10 mL
chlorku metylenu	350 mL
eter dietylowy	65 mL
jod (I ₂)	1 g
jodek potasu (KI)	2 g
etanol	100 mL

Aparatura i szkło:

kolba kulista poj. 250 mL
czasza grzejna
kolba stożkowa z korkiem
cylinder miarowy
kolba kulista poj. 100 mL
chłodnica zwrotna
łyżka metalowa
zestaw do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem
zlewka poj. 500 mL
szkiełko zegarkowe

W kolbie o poj. 250 mL zmieszać tlenek magnezu (3g) w 20 mL wody i 10 mL metanolu. i dodać kakao (10 g). Operacje należy przeprowadzać pod wyciągiem. Mieszaninę ostrożnie ogrzewać w czaszy grzejnej, obracając kolbę i mieszać bagietką tak długo, aż masa stanie się sucha (ok. 1 godz); nie przypalić! Do otrzymanej suchej masy dodać 175 mL chlorku metylenu i ogrzewać do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 30 min. Następnie przesączyć na gorąco na lejku Büchnera. Otrzymany osad rozkruszyć i przenieść ponownie do kolby okrągłodennej i ponownie zalać 175 mL chlorku metylenu. Mieszaninę ogrzewać do wrzenia przez 30 min i znów przesączyć na lejku Büchnera. Połączone roztwory osuszyć nad bezw. Na₂SO₄, odsączyć środek suszący i przesącz zatężyć pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce obrotowej w kolbie o poj. 100 mL. W kolbie musi pozostać ok. 10 mL roztworu, który należy przenieść do zlewki o poj. 100 mL i ochłodzić do temperatury pokojowej, dodać 45 mL eteru dietylowego i pozostawić do krystalizacji. Otrzymany mikrokrystaliczny osad odsączyć na lejku Büchnera i przemywać pięciokrotnie 10 mL porcjami eteru dietylowego. Otrzymuje się ok. 0,15 g teobrominy o t.t. 351 °C.

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Eluenty: chloroform-metanol (9:1, v/v); chloroform-heksan (9,5:0,5, v/v)

Płytkę zanurzyć w przygotowanym odczynniku do wykrywania alkaloidów purynowych (1,2 g I₂, 2 g KI, w 100 mL EtOH). Po wysuszeniu płytki – najpierw pomiędzy płatkami ligniny, a następnie w ciepłym strumieniu powietrza suszarki – zanurzyć ją w mieszaninie 25% kwasu solnego i etanolu w stosunku 1:1 (v/v). Plamka pochodząca od teobrominy wybarwia się na kolor szaroniebieski.

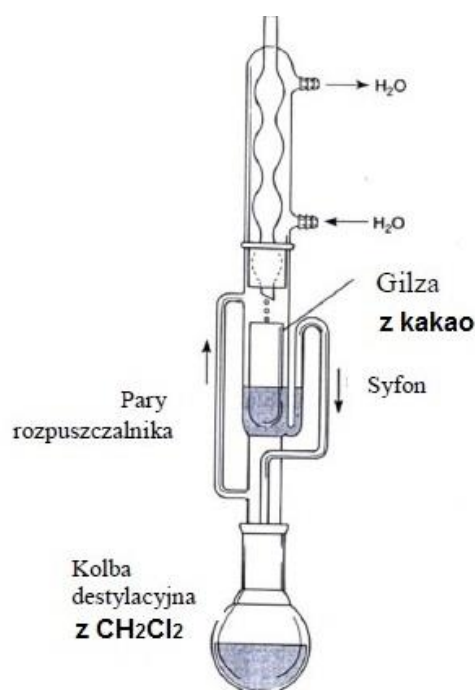
Metoda B

Odczynniki:

kakao	10 g
tlenek magnezu (MgO)	3 g
metanol	10 mL
chlerek metylenu	350 mL
eter etylowy	50 mL
jod (I ₂)	1 g
jodek potasu (KI)	2 g
etanol	100 mL

Aparatura i szkło:

Aparat Soxhleeta z kolbą kulistą poj. 250 mL
czasza grzejna
cylinder miarowy
kolba kulista poj. 50 mL
zestaw do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem



Rysunek. Aparat Soxhleeta i mechanizm działania.

W zlewce zmieszać tlenek magnezu (3g) z 25 mL wody do tej zawiesiny dodać kakao (10 g) i ponownie wymieszać, tak aby nie było jasnych grudek. Następnie dodać 4.5 g ziemi okrzemkowej (Celite) i mieszać do uzyskania sypkiej mieszaniny. Otrzymany osad przenieść do gotowej gilzy (lub do uformowanej z bibuły) włożyć do aparatu Soxhleeta (pamiętać o włożeniu kamyczków wrzennych do kolby destylacyjnej). Do układu z gilotą delikatnie wprowadzić 100 mL chlorku metylenu, tak aby doszło do pierwszego przemycia materiału. Poczekać, aż rozpuszczalnik przeleje się przez syfon do kolby i powtórzyć proces z kolejną porcją 100 mL. Gdy kolba destylacyjna zapełni się do połowy rozpocząć ogrzewanie układu. Ogrzewać do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 1 godz. Po ostudzeniu do kolby dodać środek suszący (bezw. Na₂SO₄) i po wysuszeniu przesączyć bezpośrednio do wytarowanej

kolby okrągłodennej. Przeprowadzić analizę czystości otrzymanego surowego produktu (TLC), a następnie rozpuszczalnik odparować na wyparce próżniowej i zważyć.

Przeprowadzić krystalizację otrzymanego związku z mieszaniny chlorek metylenu-eter dietylowy (5:20, v/v). Roztwór przenieść pipetą Pasteura do fiolki.

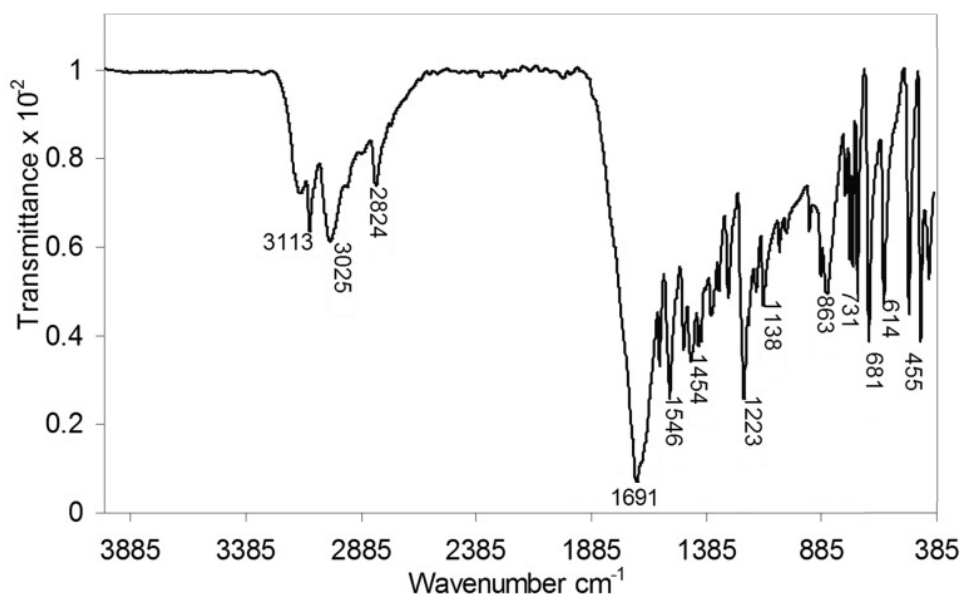
Otrzymany mikrokryształiczny osad odsączyć na lejku Büchnera i przemyć 10 mL eteru dietylowego. Otrzymaną teobrominę zważyć i obliczyć wydajność (t.t. 351 °C).

Porównać wydajność oraz czystość (TLC) produktu otrzymanego metodą A i metodą B.

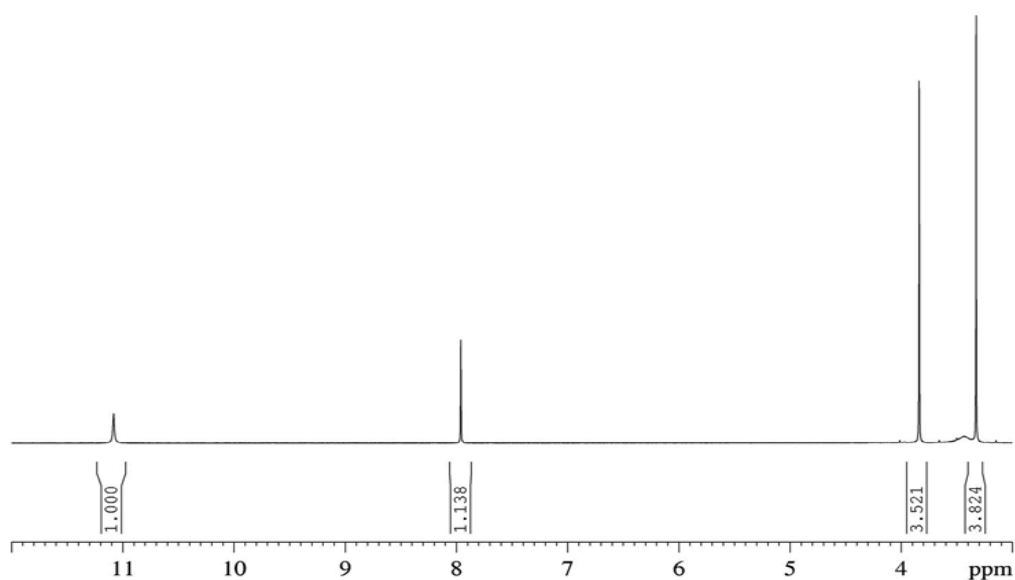
Otrzymane produkty zbadać metodami spektroskopowymi (analiza GC-MS).

Dane spektroskopowe teobrominy

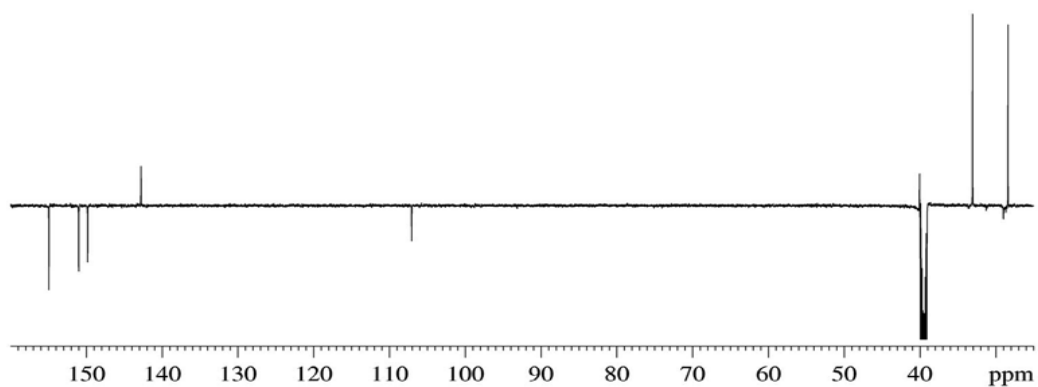
Widmo IR (KBr)



Widmo ¹H NMR w DMSO-d₆ (400 MHz)



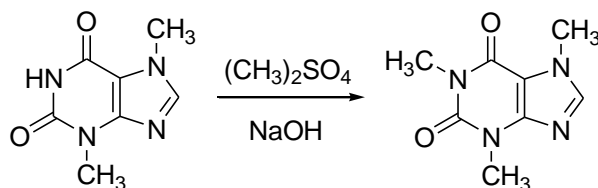
Widmo APT ^{13}C NMR w DMSO- d_6 (400 MHz)



Zagadnienia

- Metody wyodrębniania składników z surowca roślinnego
- Alkaloidy purynowe; reakcje charakterystyczne; modyfikacje chemiczne
- Rozróżnienie teobrominy od kofeiny na podstawie reakcji barwnych oraz widm IR i NMR

7.2. Metylowanie teobrominy do kofeiny



Odczynniki:

teobromina	0,2 g
10% NaOH	3,35 mL
siarczan dimetylu (silna trucizna!)	0,7 mL
chlurek metylenu	25 mL
bezw. Na ₂ SO ₄	

Aparatura i szkło:

mieszadło magnetyczne, mieszadło
cylinder miarowy
kolba dwuszyjna poj. 50 mL
rozdzielacz poj. 50 mL
kolba stożkowa poj. 50 mL
chłodnica zwrotna
rurka do odprowadzania gazów

W dwuszyjnej kolbie o poj. 50 mL, wyposażonej w chłodnicę zwrotną z rurką do odprowadzania gazów, rozpuścić 0,2 g surowej teobrominy w 3,35 mL 10% roztworu wodorotlenku sodu. Do tego roztworu dodać pipetą 0,7 mL siarczanu dimetylu (**UWAGA!!! Związek silnie trujący!** Praca w rękawicach i pod wyciągiem!) i mieszaninę mieszać przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodać 12 mL chlorku metylenu, mieszać ok. 10 minut i przelać do rozdzielacza. Produkt ekstrahować chlorkiem metylenu (2 x 20 mL) i suszyć nad bezwodnym siarczanem sodu. Odsączyć środek suszący i przesącz umieścić w kolbie o poj. 50 mL. Roztwór zatężyć pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce obrotowej.

Otrzymaną surową kofeinę suszyć na powietrzu. Zważyć i obliczyć wydajność procesu. Zmierzyć temperaturę topnienia (lit. t.t. 225-228 °C).

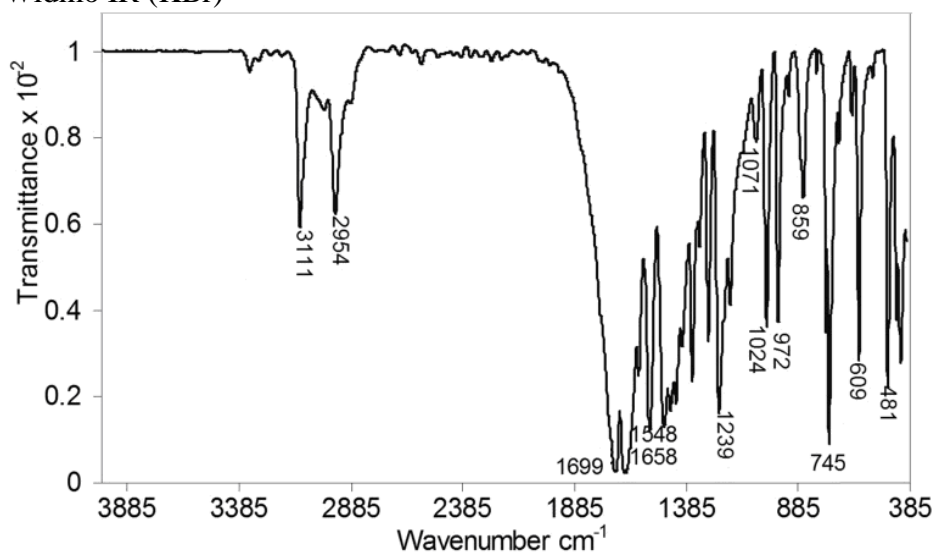
Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Eluenty: chloroform-metanol (9,5:0,5, v/v); chloroform-heksan (9,5:0,5, v/v).

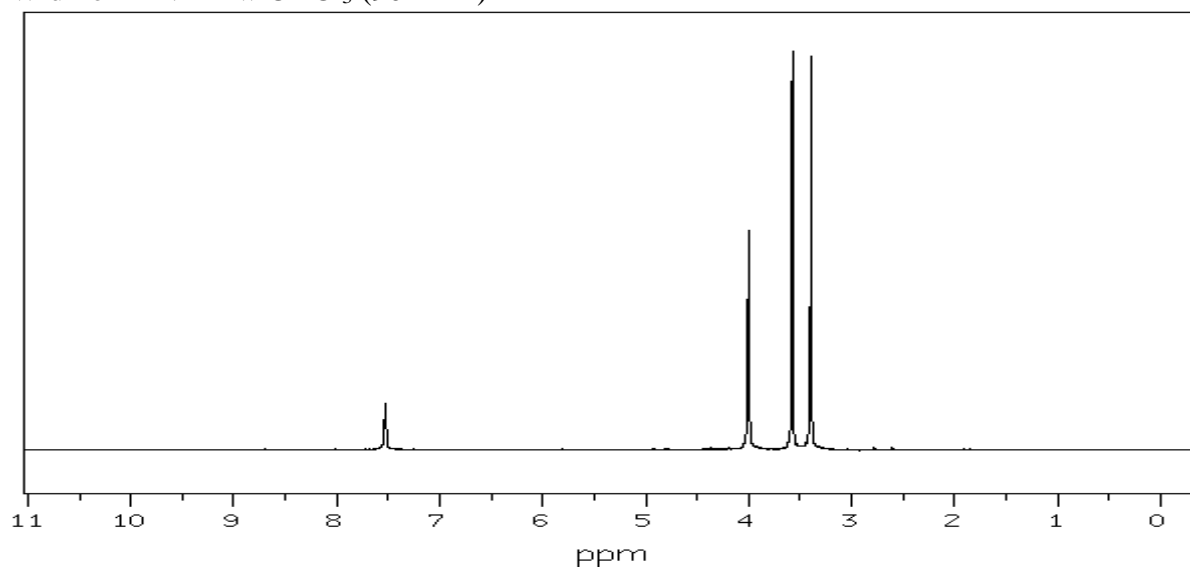
Płytkę zanurzyć w odczynniku do wykrywania alkaloidów purynowych (1,2 g I₂, 2 g KI, w 100 mL EtOH). Po wyschnięciu płytki zanurzyć ją w mieszaninie 25% kwasu solnego i etanolu w stosunku (1:1, v/v). Plamka pochodząca od kofeiny wybarwia się na kolor ciemnobrunatny.

Dane spektroskopowe kofeiny

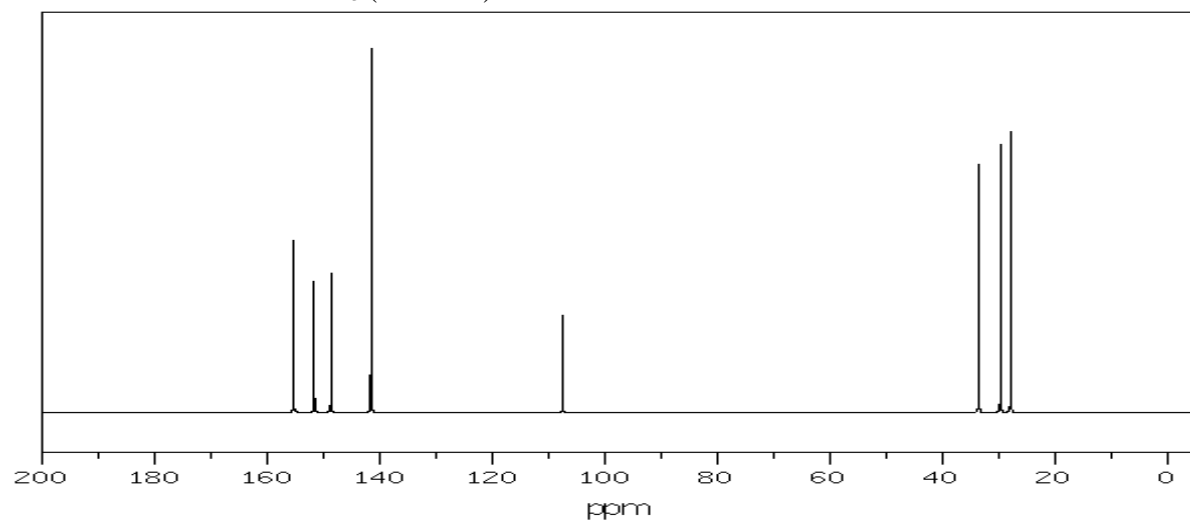
Widmo IR (KBr)



Widmo ¹H NMR w CDCl₃ (90 MHz)



Widmo ¹³C NMR w CDCl₃ (90 MHz)



Zagadnienia

- Metody wyodrębniania składników z surowca roślinnego
- Alkaloidy purynowe; reakcje charakterystyczne; modyfikacje chemiczne
- Rozróżnienie teobrominy od kofeiny na podstawie reakcji barwnych oraz widm IR i NMR

8. Terpeny

8.1. (S)-(+)-Karwon z nasion kminku



Celem ćwiczenia jest porównanie dwóch metod: A i B izolacji produktów naturalnych.

Metoda A

Odczynniki:

nasiona kminku	20 g
chloroform	60 mL
bezw. Na ₂ SO ₄	
walina	

Aparatura i szkło:

zestaw do destylacji z parą wodną
kolba okrągłodenna poj. 500 mL
rozdzielacz poj. 500 mL
kolba stożkowa poj. 250 mL
kolba okrągłodenna poj. 250 mL
kolba okrągłodenna poj. 50 mL

W kolbie o poj. 500 mL umieścić 20 g zmielonego kminku i dodać 150 mL wody. Następnie należy zmontować układ do destylacji z parą wodną tak, jak jest to pokazane na rysunku w ćwiczeniu 1 (str. 5). Przeprowadzić destylację olejku kminkowego. Destylat zawiera karwon, który należy wyekstrahować chloroformem (4 x 30 mL). Połączone ekstrakty przemyć wodą destylowaną (2 x 20 mL), frakcję organiczną suszyć nad bezw. siarczanem sodu (ok. 30 min, mieszając za pomocą mieszadła magnetycznego), odsączyć środek suszący. Osuszony roztwór przenieść do wytarowanej kolby o poj. 250 mL i zatężyć na wyparce pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości ok. 15 mL. Uzyskany roztwór przenieść za pomocą pipetki do wytarowanej kolby o poj. 50 mL i odparować rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymuje się surowy (S)-(+)-karwon, $[\alpha]_D^{20} = +61$ (c=1, EtOH). Zważyć i obliczyć zawartość karwonu w materiale roślinnym.

Metoda B

Odczynniki:

nasiona kminku	20 g
eter dietylowy	150 mL
walina	

Aparatura i szkło:

kolba stożkowa poj. 500 mL
zestaw do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem
kolba okrągłodenna poj. 250 mL
kolba okrągłodenna poj. 50 mL

Do kolby stożkowej o poj. 500 mL wsypać zmielone nasiona kminku i zalać całość eterem dietylowym. Wymieszać dokładnie tak, aby cały wsad był zanurzony w rozpuszczalniku i odstawić mieszaninę na 30 minut, od czasu do czasu wstrząsnąć i mieszać zawartość kolby.

Następnie przygotować zestaw do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem i przesączyć mieszaninę. Kolbę przemyć eterem i wylać na osad na lejku przemywając go ponownie eterem.

Otrzymany klarowny przesącz przelać do kolby okrągłodennej i zatężyć pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce. Następnie pozostałość przenieść pipetką do wytarowanej kolby o poj. 50 mL i całkowicie odparować rozpuszczalnik.

Zważyć otrzymany olejek karwonu i obliczyć wydajność w stosunku do ilości użytego zmielonego kminku.

Na podstawie analizy TLC porównać czystość otrzymanych produktów metodami A i B. Otrzymane produkty zbadać metodami spektroskopowymi (analiza GC-MS).

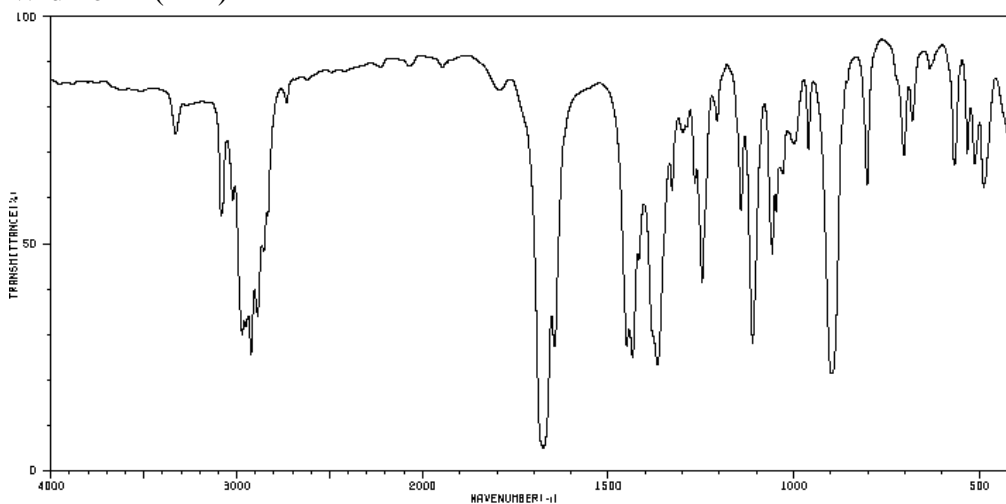
Chromatografia cienkowarstwowa (TLC).

Eluent: heksan-octan etylu (9:1, v/v).

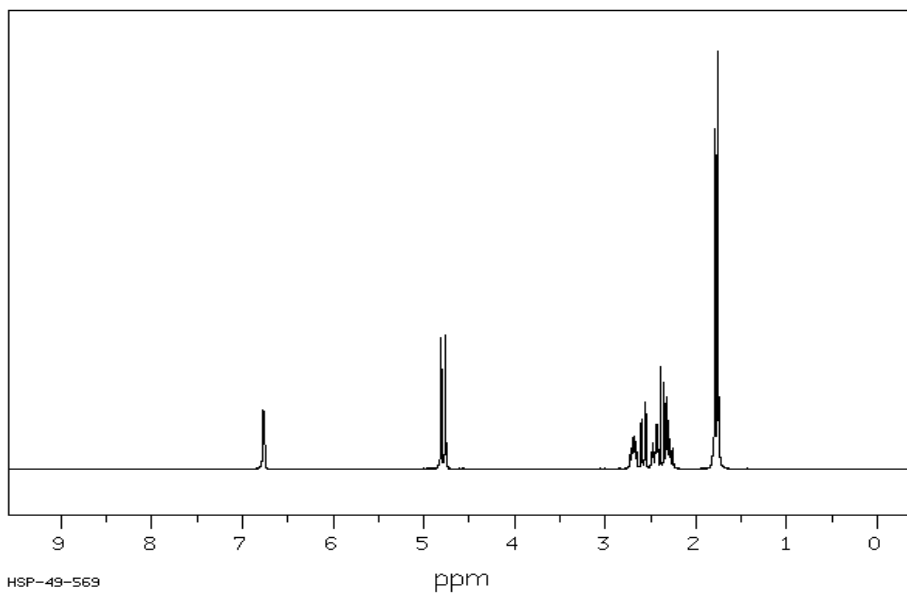
Po wysuszeniu płytkę zanurzyć w roztworze waliny (1 g waliny rozpuścić w 100 mL kwasu siarkowego). Osuszyć płytkę i wywołać termicznie poprzez delikatne podgrzanie na płycie elektrycznej. Plamka pochodząca od karwonu wykazuje zabarwienie różowe. Pozostałe plamki, o zabarwieniu żółtym i brązowym, pochodzą od antocyjanów, limonenu oraz barwników – pigmentów, m. in. chlorofilu.

Dane spektroskopowe karwonu

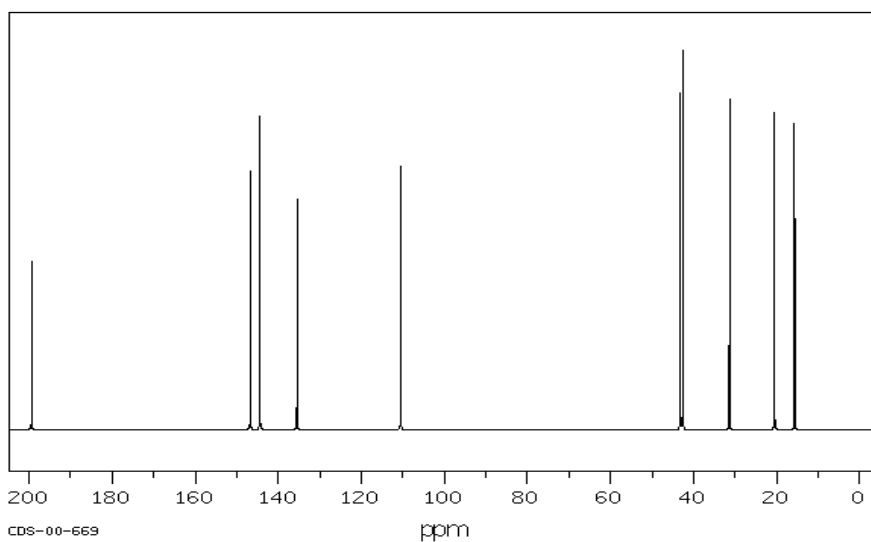
Widmo IR (film)



Widmo ^1H NMR w CDCl_3 (400 Hz)



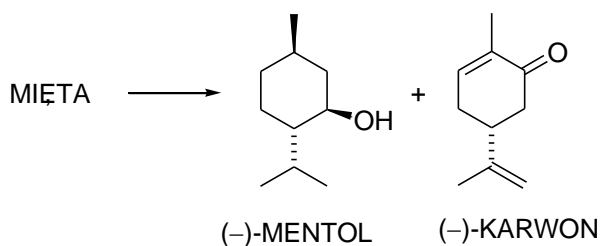
Widmo ^{13}C NMR w CDCl_3



Zagadnienia

- Metody wyodrębniania składników z surowca roślinnego
- Olejki eteryczne (przykłady, zastosowanie)
- Terpeny (budowa, podział, synteza i modyfikacja)
- Stereochemia
- Analiza widm produktu

8.2. Mentol oraz (R)-(-)-karwon z mięty ogrodowej (pieprzowej)



Celem ćwiczenia jest porównanie dwóch metod: A i B izolacji produktów naturalnych.

Metoda A

Odczynniki:

świeża mięta pieprzowa	20 g
chloroform	60 mL
bezw. Na ₂ SO ₄	
walina	1 g
kwas fosfomolibdenowy	10 g
etanol	50 mL

Aparatura i szkło:

zestaw do destylacji z parą wodną
 rozdzielacz poj. 500 mL
 kolba stożkowa poj. 250 mL
 kolba okrągłodenna poj. 250 mL
 kolba okrągłodenna poj. 50 mL

W kolbie dwuszyjnej umieścić 20 g mięty i zalać 150 mL wody. Przeprowadzić destylację z parą wodną według opisu w ćwiczeniu 1 (str. 5).

Destylat zawiera mentol i (-)-karwon, które należy wyekstrahować kilkoma porcjami chlorku metylenu (5 x 30 mL). Połączone ekstrakty suszyć nad bezw. siarczanem sodu (ok. 30 min, mieszając za pomocą mieszadła magnetycznego). Osuszony roztwór odsączyć od środka suszącego do kolby o poj. 250 mL i zatężyć pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce do objętości ok. 10 mL. Przenieść pipetką do mniejszej wytarowanej fiolki i odparować rozpuszczalnik. Otrzymuje się ok. 0,2 g olejku zawierającego surowy (R)-(-)-karwon, skręcalność właściwa $[\alpha]_D = -61$ (c=1, EtOH) oraz (±)-mentol t.t. 34-36 °C. Temperatura topnienia czystych kryształów (-)-mentolu wynosi 42-45 °C.

Metoda B

Odczynniki:

świeża mięta pieprzowa	20 g
chloroform	50 mL
etanol	50 mL
walina	
kwas fosfomolibdenowy	10 g

Aparatura i szkło:

kolba stożkowa poj. 500 mL
 zestaw do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem
 kolba okrągłodenna poj. 250 mL
 kolba okrągłodenna poj. 50 mL

W kolbie stożkowej o poj. 500 mL umieścić miętę i zalać całość chloroformem. Wymieszać dokładnie, tak aby cały wsad był zanurzony w rozpuszczalniku. Odstawić mieszaninę na 30 minut i od czasu do czasu wstrząsnąć i mieszać zawartość. Następnie przygotować zestaw do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem i przesączyć mieszaninę. Przemycić kolbę chloroformem i wylać na osad na lejku, przemywając go ponownie. Następnie osad przenieść do zlewki i zalać chloroformem. Pozostawić na 30 min. Całą operację powtórzyć.

Otrzymane klarowne przesącze należy przelać do oddzielnych kolb i zatężyć na wyparce pod zmniejszonym ciśnieniem, następnie pipetką przenieść do wytarowanych fiolek. Po całkowitym odparowaniu rozpuszczalnika, zważyć otrzymane olejki i obliczyć zawartość procentową w stosunku do masy liści.

Przeprowadzić porównawczą analizę TLC produktów otrzymanych metodami A i B. Otrzymane produkty zbadać metodami spektroskopowymi (analiza GC-MS).

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) – wykrywanie mentolu:

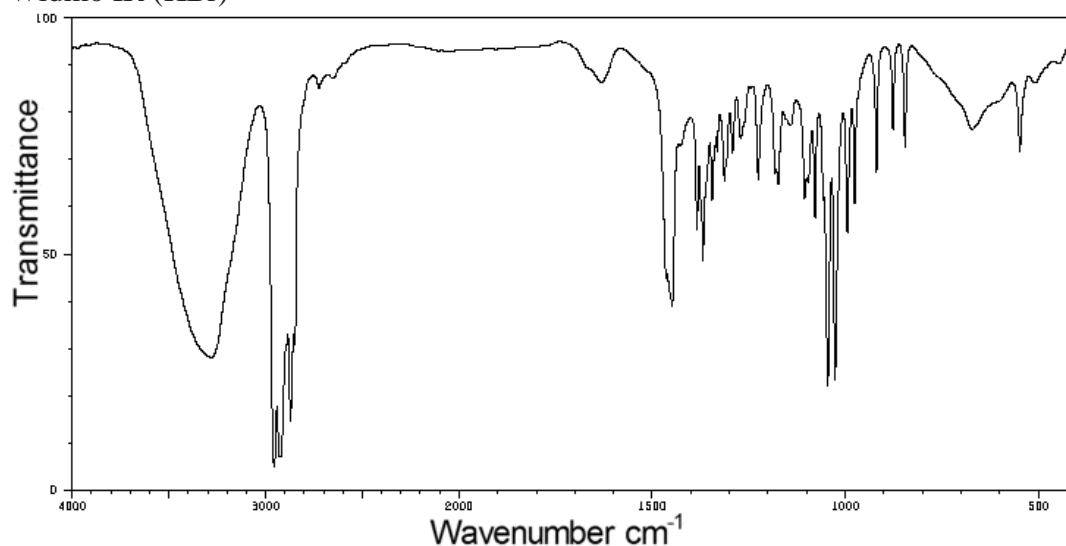
Eluent: heksan-metanol-chloroform (8:2:2, v/v/v). Po wysuszeniu płytkę zanurzyć w roztworze kwasu fosfomolibdenowego (10 g kwasu rozpuścić w 50 mL etanolu). Nasyconą tym roztworem płytkę ogrzewać kilka minut w temp. ok. 100 °C. Plamka pochodząca od mentolu wykazuje niebieskie zabarwienie.

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) – wykrywanie karwonu:

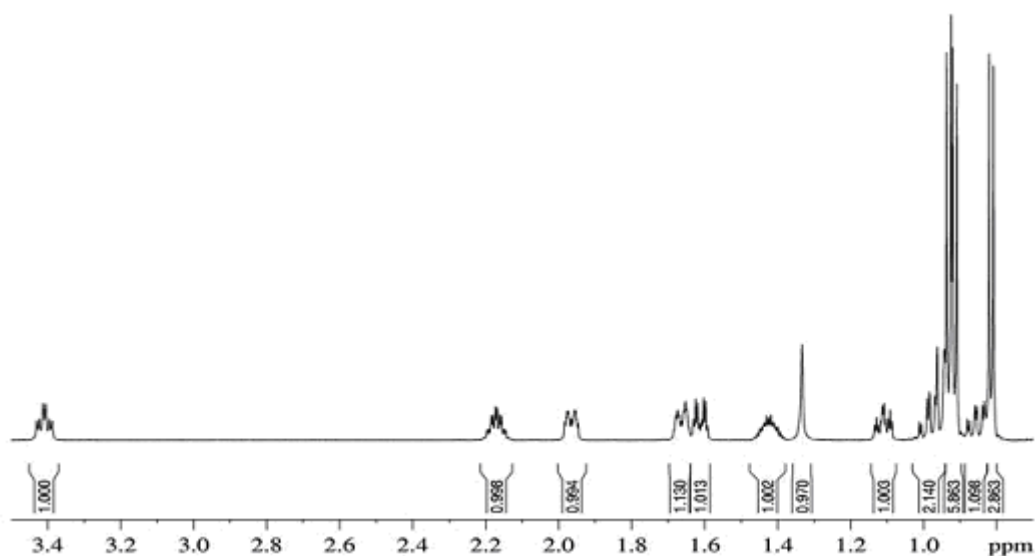
Eluent: heksan-octan etylu (9:1, v/v). Po wysuszeniu płytkę zanurzyć w roztworze waliny (1 g waliny rozpuścić w 100 mL kwasu siarkowego). Osuszyć płytkę i wywołać termicznie poprzez delikatne podgrzanie na płytce elektrycznej. Plamka pochodząca od karwonu wykazuje zabarwienie różowe.

Dane spektroskopowe mentolu

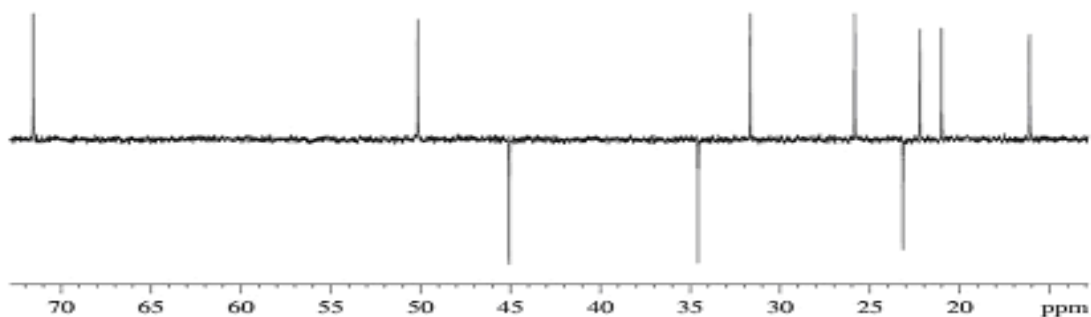
Widmo IR (KBr)



Widmo ^1H NMR w CDCl_3 (600 MHz)



Widmo APT ^{13}C NMR w CDCl_3 (150 MHz).

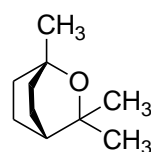


Zagadnienia

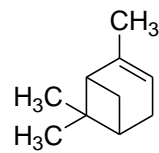
- Metody wyodrębniania składników z surowca roślinnego
- Olejki eteryczne (przykłady, zastosowanie)
- Terpeny (budowa, podział, synteza i modyfikacja)
- Stereochemia
- Analiza widm produktów

8.3. Pozyskiwanie olejku rozmarynowego

LIŚCIE ROZMARYNU → OLEJEK ROZMARYNOWY



EUKALIPTOL



α-PINEN

Odczynniki:

liście rozmarynu 20 g
chloroform
bezw. Na₂SO₄

Aparatura i szkło:

zestaw do destylacji z para wodną
rozdzielacz
płytką grzejną
kolbki stożkowe poj. 250 mL

Rozmaryn lekarski (*Rosmarinus officinalis*) jest wiecznie zielonym krzewem o liściach kształtem przypominających igły oraz charakterystycznym zapachu nieco zbliżonym do eukaliptusowego. Rozmaryn jest rośliną z rodziny wargowych (*Labiatae*). Rozmaryn był jedną z roślin najwcześniej stosowanych w medycynie. Dawniej stosowany był też jako przyprawa konserwująca żywność, a w niektórych krajach był rośliną używaną w obrządkach religijnych. Surowcem zielarskim stosowanym do otrzymywania olejku eterycznego są liście lub gałązki rozmarynu lekarskiego zebrane w czasie lub po kwitnieniu w postaci świeżej, względnie wysuszonej. W surowcu zazwyczaj znajduje się nie mniej niż 1,2% olejku eterycznego w przeliczeniu na suchą masę, którego głównymi składnikami są: eukaliptol (1,8-cyneol) 20-50%, oraz α-pinen (zawartość do 25%), kamfora, borneol i kamfen. Występuje kilka odmian olejku rozmarynowego: cyneolowy (eukaliptolowy) zawierający do 40% cyneolu (Włochy, Maroko, Tunezja); kamforowy – zawierający do 25% kamfory (Francja); α-pinenowo-werbenowy – zawierający do 25% α-pinenu oraz do 25% werbenonu (Korsyka, Algieria); α-pinenowo-cyneolowy – zawierający do 20% α-pinenu oraz do 30% cyneolu (Jugosławia, Grecja, Hiszpania).

Olejek stosowany jest w kosmetyce (do wyrobu spirytusu rozmarynowego, dezodorantów, wód kolońskich, perfum, toników, a także do masażu, kąpieli, maseczek, parówek twarzy, kompresów) gdzie wykorzystywane są jego właściwości normalizujące i ściągające. W pielęgnacji włosów i skóry wykorzystuje się jego właściwości antybakteryjne i antygrzybicze (m. in. eliminuje łupież i pomaga przy przetłuszczających się włosach). W kosmetyce naturalnej w olejkach do twarzy i ciała po zmieszaniu go z olejem bazowym otrzymuje się preparat skutecznie ujędrniający skórę. Ponadto rozjaśnia blizny. W medycynie naturalnej jest stosowany przy przeziębieniach (inhalacje z jego zastosowaniem wykazują działanie antyseptyczne), zapaleniu stawów, artretyzmie, migrenach i biegunkach, ponadto wzmacnia ściany naczyń krwionośnych i łagodzi stany zapalne żył, a także jest pomocny przy leczeniu żylaków.

Aromaterapia z zastosowaniem olejku rozmarynowego działa korzystnie na centralny układ nerwowy. Olejek rozmarynowy jest dobrym środkiem przeciwbólowym, stosuje się go

przy bólach reumatycznych i masażach zmęczonych, sforsowanych mięśni. Dlatego się uznaje się, że jest to jeden z najcenniejszych olejków aromaterapeutycznych.

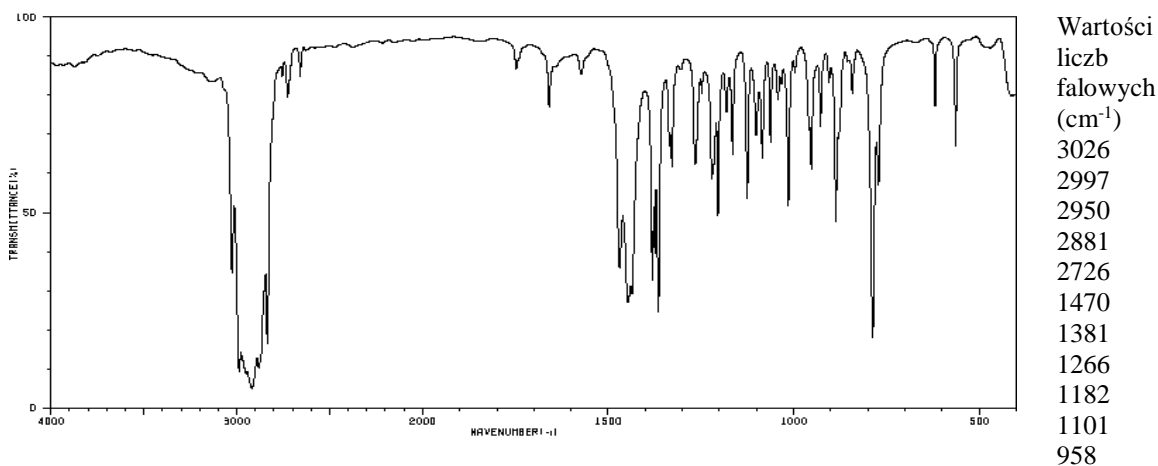
Celem ćwiczenia jest otrzymanie olejku rozmarynowego i przygotowanie preparatu pielęgnacyjnego na jego bazie.

Destylacja z parą wodną liści rozmarynu

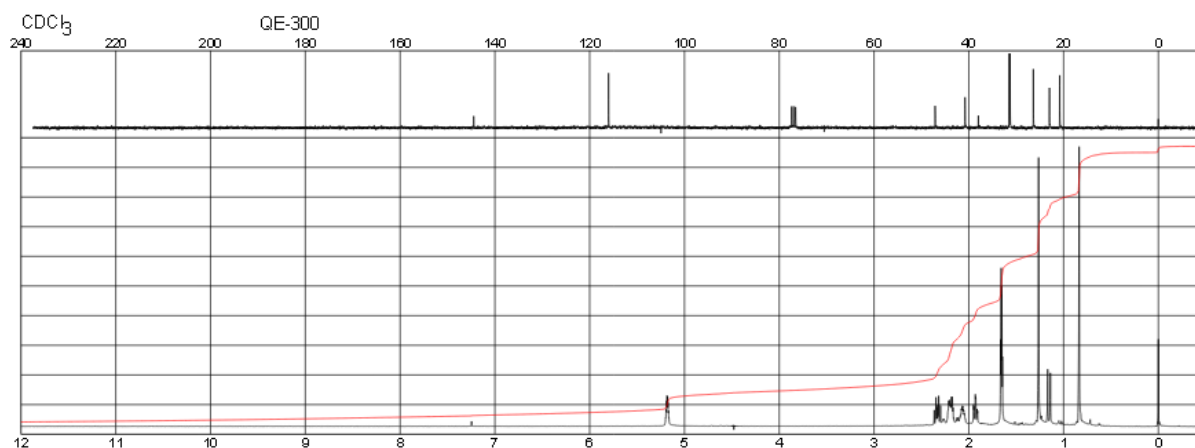
Zmontować zestaw do destylacji z parą wodną tak, jak jest to pokazane na rysunku w ćwiczeniu 1, str. 5. W kolbie o pojemności 500 mL umieścić 20 g liści rozmarynu i dodać 100-150 mL wody destylowanej. Destylację prowadzić do momentu uzyskania 150-200 mL destylatu, objętość zebranego destylatu zanotować. Do odbieralnika można od razu wlać chloroform, co umożliwi lepsze wydzielenie olejku z warstwy wodnej. Następnie destylat przenieść do rozdzielacza i ekstrahować chloroformem (6 x 50 mL). Otrzymane ekstrakty połączyć i suszyć nad bezw. siarczanem sodu (ok. 30 min, mieszając za pomocą mieszadła magnetycznego), odsączyć środek suszący. Następnie przesącz zagęścić pod zmniejszonym ciśnieniem w wytarowanej kolbie. Obliczyć wydajność otrzymanego olejku.

Dane spektroskopowe α -pinenu

Widmo IR (film)

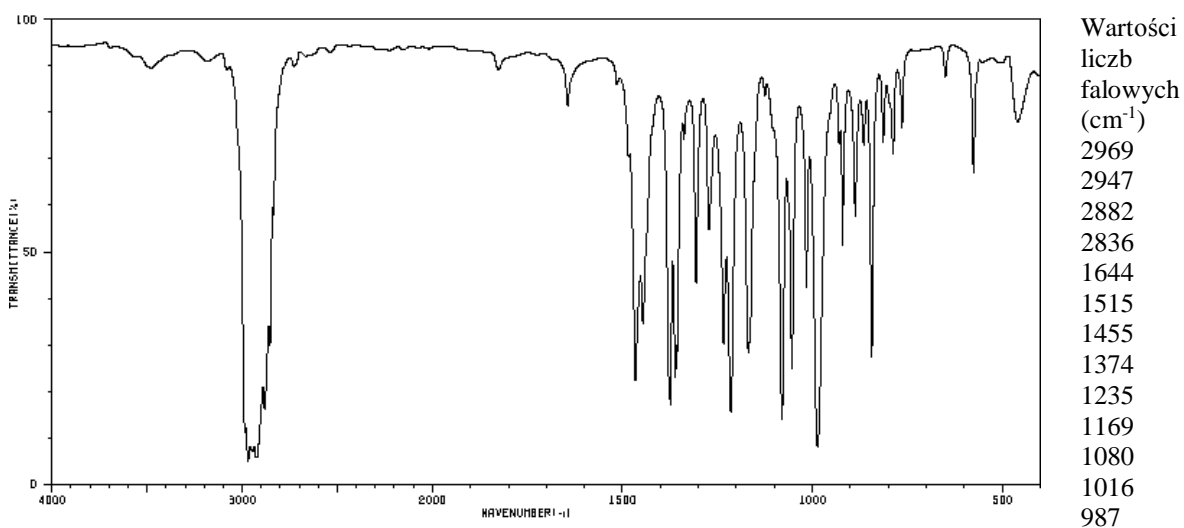


Widma ^1H NMR i ^{13}C NMR w CDCl_3 (katalog Sigma Aldrich)

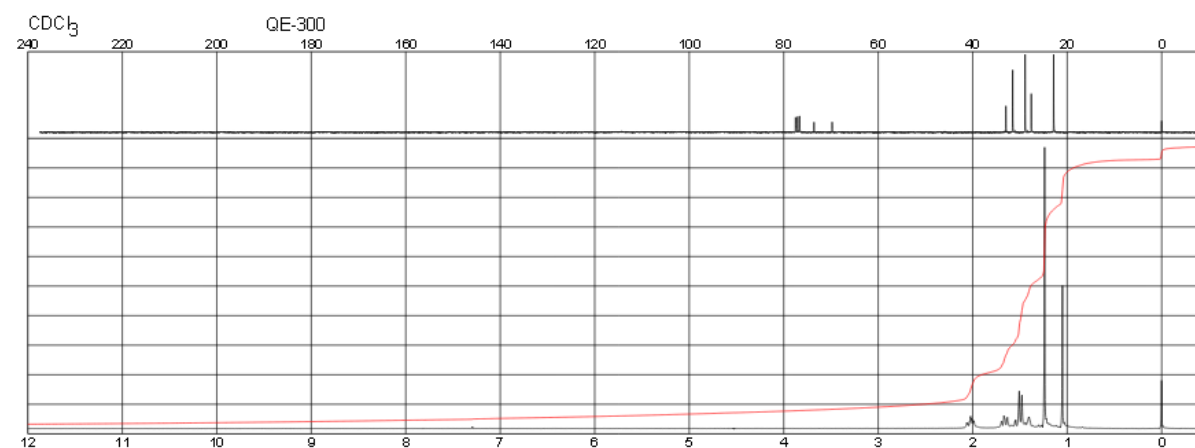


Dane spektroskopowe eukaliptolu

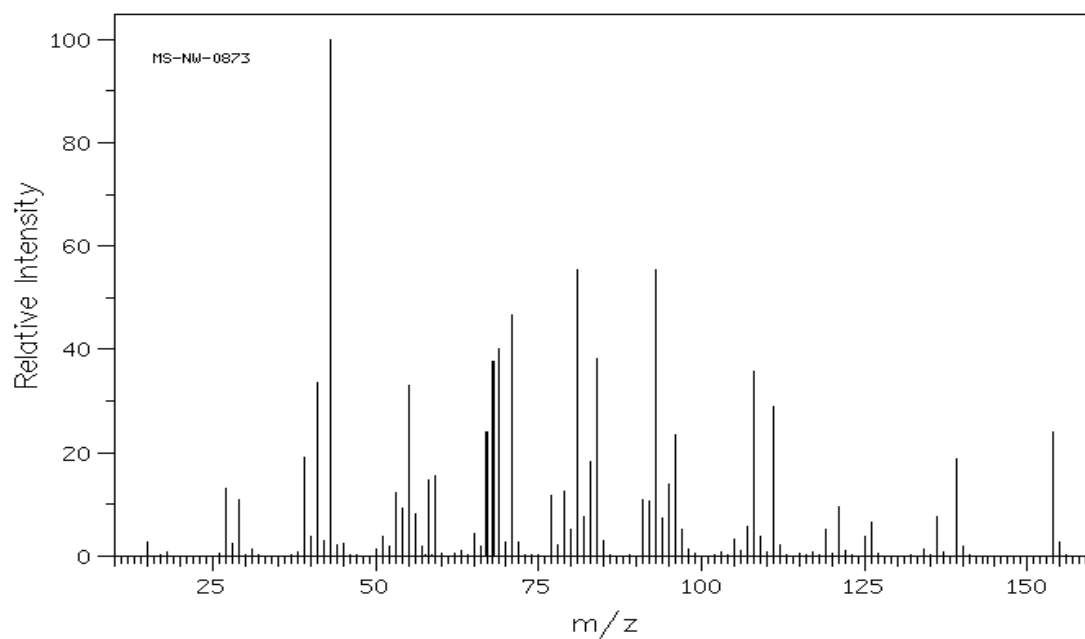
Widmo IR (film)



Widma ^1H NMR i ^{13}C NMR w CDCl_3 (katalog Sigma Aldrich)



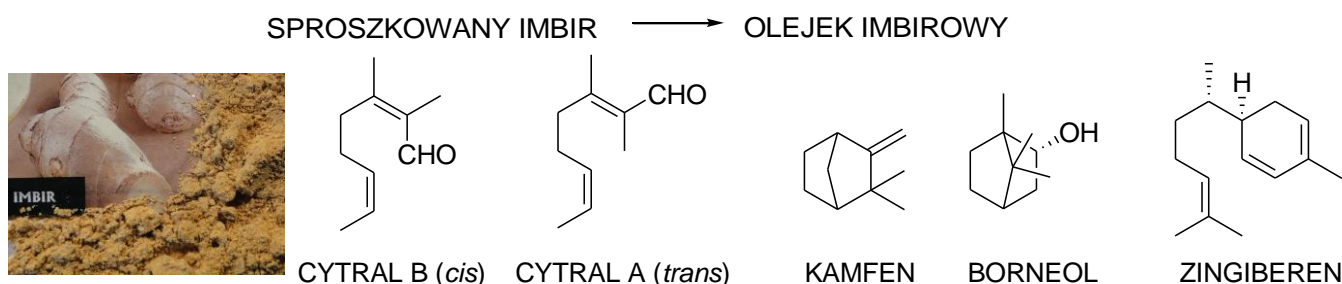
Widmo EI-MS (M=154 g/mol)



Zagadnienia

- Metody wyodrębniania składników z surowca roślinnego
- Olejki eteryczne (przykłady, zastosowanie)
- Terpeny (budowa, podział, synteza i modyfikacja)
- Analiza widm produktów

8.4. Otrzymywanie olejku imbirowego i jego zastosowanie do preparatów pielęgnacyjnych



Odczynniki:

sproszkowany imbir 10 g
chloroform
bezw. Na₂SO₄

Aparatura i szkło:

zestaw do destylacji z para wodną
rozdzielacz
płytką grzejną
kolbki stożkowe poj. 250 mL

Olejek imbirowy (*Oleum Zingiberis officinalis*) wytwarza się z wysuszonych, zmielonych kłączy w procesie destylacji z parą wodną. Ta metoda otrzymywania pozwala na zachowanie w jego składzie substancji mineralnych i witamin. Olejek ma barwę bursztynową i bardzo intensywny miodowo-korzenny zapach.

Imbir znany jest od wieków zarówno jako przyprawa, jak i środek na dolegliwości trawienne. Jest również pomocny w leczeniu przeziębień ponieważ działa napotnie, obniża wysoką temperaturę. Wchodzi w skład niektórych maści i plastrów rozgrzewających. Olejek imbirowy ma działanie przeciwzapalne i rozgrzewające. Silnie pobudza krążenie, przez co pozytywnie wpływa na likwidację cellulitu i nadmiernej ilości tkanki tłuszczowej. Olejek imbirowy stosuje się w preparatach wyszczuplająco-modelujących. Pełen świeżości i egzotyki zapach imbirowy jest bazą wielu perfum. Imbirowa nuta często współgra z innymi przyprawami (pieprzem, kardamonem). Olejek imbirowy znajduje zastosowanie w: mieszankach zapachowych, olejkach do masażu, maściach i kremach likwidujących obrzęki nóg, perfumach do ciała i kompozycjach zapachowych, inhalacjach. Zawarty w szamponach i balsamach do włosów ekstrakt z imbiru zapobiega procesom starzenia się skóry głowy. Przeciwdziała elektryzowaniu się włosów, ułatwia ich rozczesywanie oraz układanie fryzury.

W lecznictwie wykorzystuje się kłączy imbiru - *Rhizoma Zingiberis*, w którym znajduje się około 2-4% oleju z czego olejek eteryczny stanowi 1,5-3%. Składnikami nadającymi charakterystyczny zapach, a także ostry smak są: zingiberol C₁₅H₂₅OH (alkohol), cineol, giberen (węglowodór cykliczny), gingerole (związki fenolowe, głównie 6-gingerol), szogaole, mieszanina seskwiterpenów (zingiberen, α-kurkumen, β-bisabolen, β-seskwifelandren) i monoterpenu (geranial, cytral B, linalol), zinferon, citreol, borneol i kamfen. Wszystkie te substancje mają lecznicze właściwości. Surowy imbir zawiera jeszcze około 9% lipidów i glikolipidów oraz diterpenowe galanolaktony i zawierające grupy siarkowe kwasy.

Celem ćwiczenia jest otrzymanie olejku imbirowego i przygotowanie preparatu pielęgnacyjnego na jego bazie.

Część A Destylacja z parą wodną sproszkowanego imbiru

Zmontować zestaw do destylacji z parą wodną tak, jak jest to pokazane na rysunku w ćwiczeniu 1, str. 5. W kolbie o pojemności 500 mL umieścić 10 g sproszkowanego imbiru i dodać 100-150 mL wody destylowanej. Destylację prowadzić do momentu uzyskania 150-200 mL destylatu, zanotować objętość zebranego destylatu. Do odbieralnika można od razu wlać chloroform, co umożliwi lepsze wydzielenie olejku z warstwy wodnej. Następnie destylat przenieść do rozdzielacza i ekstrahować chloroformem (6 x 50 mL). Otrzymane ekstrakty suszyć nad bezw. siarczanem sodu (ok. 30 min, mieszając za pomocą mieszadła magnetycznego), odsączyć środek suszący. Następnie przesącz zagęścić pod zmniejszonym ciśnieniem w wytarowanej uprzednio kolbie. Obliczyć wydajność otrzymanego olejku.

Część B Przygotowanie olejku do masażu

Składniki:

olejek imbirowy 4-5 kropli
olej migdałowy
olej z oliwek
olej z nasion winogron

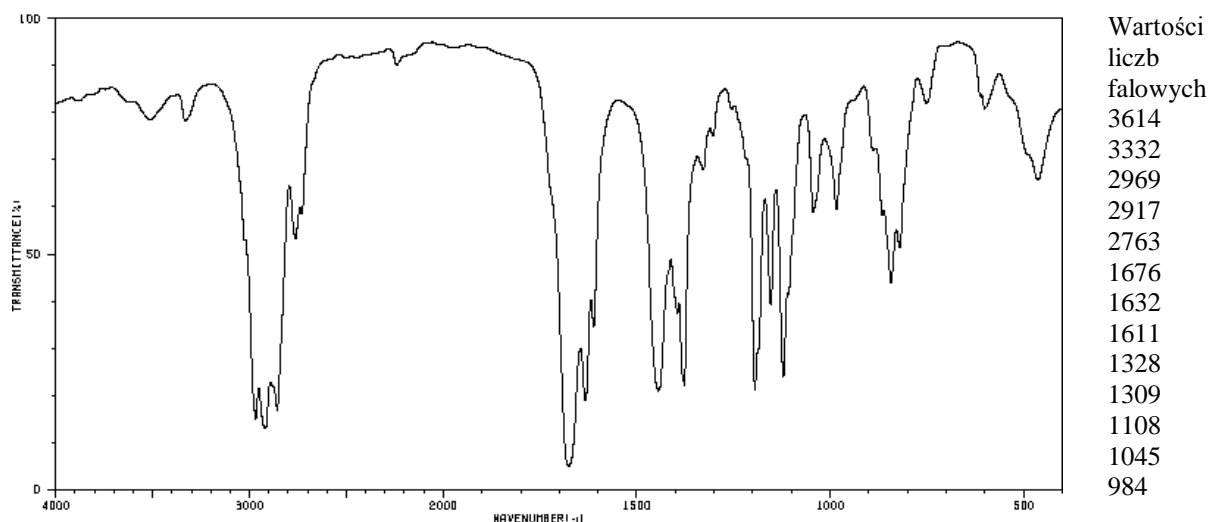
Sprzęt:

zlewki poj. 100 mL
pipeta Pasteura
fiolka/buteleczka do produktu

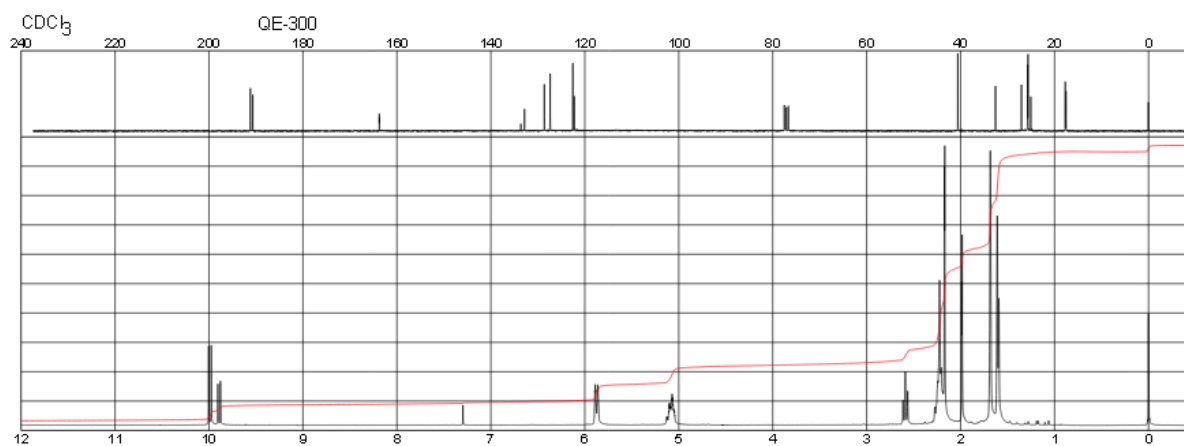
Za pomocą pipety Pasteura otrzymany wcześniej olejek imbirowy wkropić do zlewki i policzyć ilość kropli. W drugiej zlewce uszykować odpowiednią ilość oleju podstawowego przez zmieszanie oleju migdałowego (otrzymany w ćwiczeniu 4.6., str. 35) z olejem z oliwek i olejem z pestek winogron (1:1:1, v/v/v, np. po 10 mL każdego oleju daje 30 mL mieszaniny), przy czym należy zachować następującą proporcję: na 4-5 kropli olejku imbirowego stosować 10 mL oleju podstawowego (olej migdałowy, olej z oliwek i nasion winogron). W przypadku mniejszej lub większej ilości olejku imbirowego objętość oleju podstawowego należy odpowiednio zmniejszyć lub zwiększyć. Tak zmieszane składniki należy umieścić w fiolce/ buteleczce (najlepiej z ciemnego szkła) i można stosować do masażu.

Dane spektroskopowe cytralu

Widmo IR (film)



Widma ¹H NMR i ¹³C NMR w CDCl₃ (katalog Sigma Aldrich)



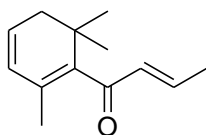
Zagadnienia

- Metody wyodrębniania składników z surowca roślinnego
- Olejki eteryczne (przykłady, zastosowanie)
- Analiza widm produktu

9. Olejek kawowy – destylacja zmielonych ziaren kawy Arabica z parą wodną

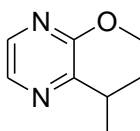
Główne składniki olejku kawowego – lotne związki zapachowe składające się na aromat kawy

(*E*)- β -damascenon



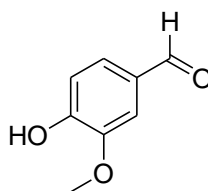
zapach miodowy,
owocowy

2-izopropyl-3-
metoksypirazyna



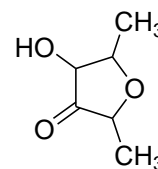
zapach ziemisty, prażony

wanilina



zapach waniliowy

4-hydrokso-2,5-dimetylo-
3(2H)-furanon



zapach karmelowy

Odczynniki:

zmielona kawa gatunek Arabica 20 g
chloroform
bezw. Na₂SO₄

Aparatura i szkło:

zestaw do destylacji z parą wodną
rozdzielacz
płytką grzejną
kolbki stożkowe poj. 250 mL

Aromat kawy jest bardzo istotną cechą różnych rodzajów kawy, przy czym kawa rozpuszczalna jest pozbawiona większości lotnych związków zapachowych. Powyżej przedstawiono wybrane związki, najbardziej istotne w tworzeniu aromatu kawy. Aromat może być odczuwany poprzez wąchanie albo percepcję (wrażenie smakowo-węchowe), gdy kawa jest obecna w jamie ustnej lub połknięta, a związki zapachowe przedostają się do nabłonka węchowego od strony jamy ustnej. Powstawanie aromatu kawy uzależnione jest od następujących czterech głównych reakcji w czasie prażenia ziaren:

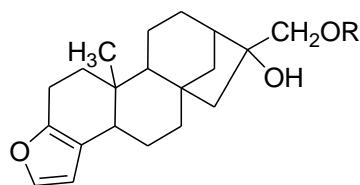
- reakcja Maillarda – zachodząca między związkami zawierającymi azot (aminokwasy, białka, jak również trigonelina i serotonina) oraz węglowodanami,
- rozpad pojedynczych aminokwasów, szczególnie siarkowych,
- rozpad cukrów i powstanie związków podobnych do karmelu,
- rozpad kwasów fenolowych, szczególnie o strukturze kwasu chinowego.

W dalszych reakcjach następuje rozpad tłuszczów oraz mają miejsce różne interakcje między pośrednimi produktami rozkładu.

Pośród związków zapachowych kawy dominującą grupę stanowią furany, które posiadają zapach podobny do karmelu, gdyż tworzą się w procesie pirolizy cukrów. Natomiast pirole odpowiedzialne są za część słodkiego, karmelowego i grzybowego aromatu kawy.

Składnikami kawy odpowiedzialnymi za wzrost poziomu cholesterolu we krwi u człowieka są kafeol i kafestol, związki rozpuszczalne w tłuszczach znane jako diterpeny i znajdujące się w oleju izolowanym z ziaren kawy. Stężenie tych dwóch składników zależy od

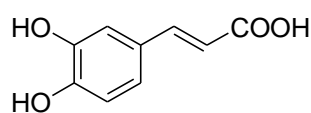
gatunku kawy; ziarna kawy Arabika zawierają zarówno kafeol i kafestol, natomiast ziarna kawy Robusta zawiera o połowę mniej kafestolu i śladowe ilości kafeolu. Kafestol zwiększa poziom cholesterolu we krwi znacznie bardziej od kafeolu. Oba diterpenom przypisuje się działanie przeciwnowotworowe. Wykazano, że kafeol i kafestol wywołują szereg reakcji biochemicznych ograniczających działanie kilku związków rakotwórczych, w tym wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych.



KAFEOL



KAFESTOL



KWAS KAWOWY



Kwaskowatość (cierpkość) kawy jest od dawna uważana za jej ważną cechę jakościową. Kwaskowatość jest zazwyczaj wysoko cenionym walorem kawy, szczególnie w przypadku kawy pochodzącej z Ameryki Środkowej i niektórych kaw pochodzenia wschodnioafrykańskiego. Nadmierna kwaskowatość uważana jest za wadę. pH kawy jest skorelowane z odczuwalną kwaskowatością. Dobra kawa charakteryzuje się zakresem pH od 4,9 do 5,2.

W zielonej i w prażonej kawie zidentyfikowano ponad 100 różnych kwasów. Głównymi kwasami znajdującymi się w zielonej kawie są kwas chlorogenowy i kwas chinowy oraz kwas jabłkowy i kwas cytrynowy. Kwasy chlorogenowe znane są jako cynamonowe (powstałe z kwasu chinowego i związków fenolowych), a najczęściej występującym kwasem jest kwas 5-O-dikawoilochinowy. Kawa jest jednym z najbogatszych źródeł kwasu chlorogenowego, którego zawartość w 200 mL kawy to 70-350 mg. Zapewnia to organizmowi około 35-175 mg kwasu kawowego. Wykazano, że kwasy chlorogenowe w kawie mają działanie prozdrowotne. Wykazano działanie przeciwutleniające *in vitro* kwasu chlorogenowego i kwasu kawowego. Kwas kawowy jest znanym przeciwutleniaczem obecnym nie tylko w kawie, ale w różnorodnych jadalnych i niejadalnych roślinach. Niedawne badania wykazały, że kwas kawowy może być również substancją rakotwórczą, co utrudnia jednoznaczną ocenę wpływu tego kwasu na zdrowie człowieka.

Celem ćwiczenia jest otrzymanie olejku kawowego w wyniku destylacji zmielonych ziaren kawy z para wodną.

Destylacja z parą wodną zmielonych ziaren kawy Arabica

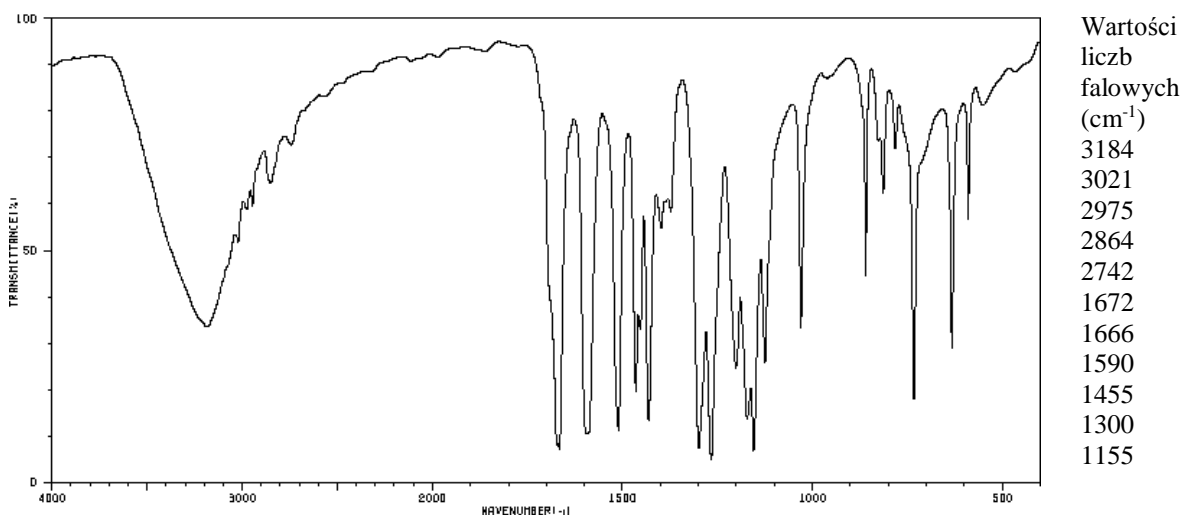
Zmontować zestaw do destylacji z parą wodną tak, jak jest to pokazane na rysunku w ćwiczeniu 1, str. 5. W kolbie o pojemności 500 mL umieścić 20 g zmielonej kawy Arabica i dodać 100-150 mL wody destylowanej. Destylację prowadzić do momentu uzyskania 150-200 mL destylatu, objętość zebranego destylatu zanotować. Do odbieralnika można od razu wlać chloroform, co umożliwi lepsze wydzielenie olejku z warstwy wodnej. Następnie destylat przenieść do rozdzielacza i ekstrahować chloroformem (6 x 50 mL). Otrzymane ekstrakty połączyć i suszyć nad bezw. siarczanem sodu (ok. 30 min, mieszając za pomocą mieszadła magnetycznego), odsączyć środek suszący. Następnie przesącz zagęścić pod zmniejszonym ciśnieniem w wytarowanej kolbie. Obliczyć wydajność otrzymanego olejku.

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

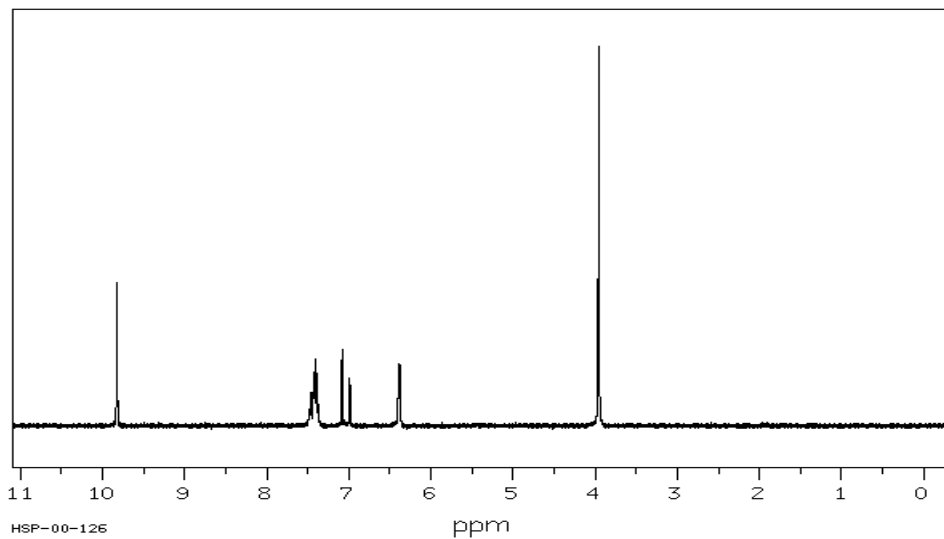
Eluent: heksan-octan etylu (3:1, v/v). Na płytkę z SiO₂ nanieść rozcieńczone w metanolu wanilinę (wzorzec) oraz otrzymany produkt. Wysuszyć i płytkę wstawić do kuwety z eluentem. Po wysuszeniu płytki rezultat odczytać pod lampą UV i następnie płytkę wywołać w komorze z jodem.

Dane spektroskopowe waniliny

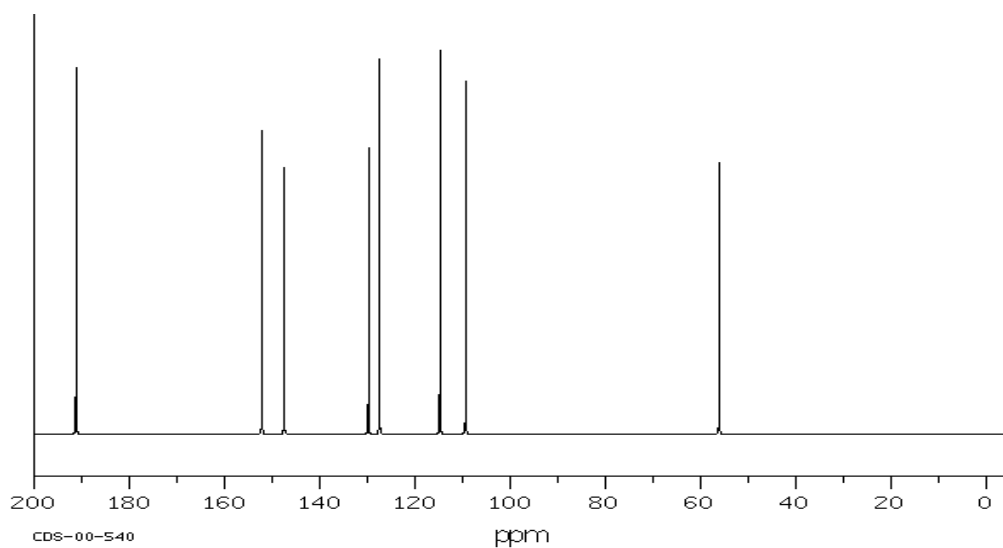
Widmo IR (KBr)



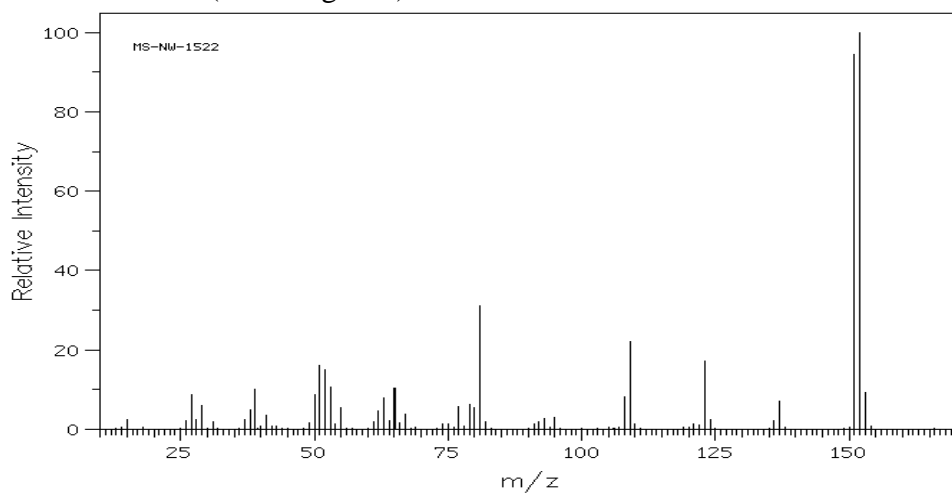
Widmo ^1H NMR w CDCl_3



Widmo ^{13}C NMR w CDCl_3



Widmo EI-MS (M=152 g/mol)



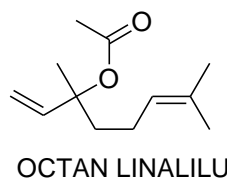
Zagadnienia

- Metody wyodrębniania składników z surowca roślinnego
- Olejki eteryczne (przykłady, zastosowanie)
- Analiza widm produktu

10. Otrzymywanie olejku lawendowego z kwiatów lawendy



KWIATY LAWENDY



+



Odczynniki:

Metoda A

kwiaty lawendy 15 g
chlorek metylenu 450 mL
bezw. Na₂SO₄

Metoda B

kwiaty lawendy 15 g
chlorek metylenu 300 mL
bezw. Na₂SO₄

Aparatura i szkło:

kolbka okrągłodenna poj. 250 mL
chłodnica zwrotna
czasza grzejna
lejek
rozdzielacz poj. 250 mL
zestaw do destylacji z parą wodną
kolba stożkowa poj. 250 mL (2 szt.)

Celem ćwiczenia jest wyizolowanie z kwiatów lawendy olejku z zastosowaniem dwóch metod, A i B, a następnie porównanie wydajności tych procesów. Głównymi składnikami nadającymi charakterystyczny zapach lawendzie są dwa estry: octan linalilu i maślan linalilu.

Metoda A

W kolbie umieścić 15 g kwiatów lawendy i 100 mL chlorku metylenu (pamiętać o kamyczkach wrzennych!). Całość ogrzewać przez godzinę w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Następnie usunąć czaszę i ochłodzić kolbę. Oddzielić kwiaty od roztworu poprzez odsączenie na lejku z sączkiem z bibuły. Otrzymany zielonkawy roztwór zagęścić pod zmniejszonym ciśnieniem i zważyć. Obliczyć w % zawartość olejku w surowcu.

Zmontować zestaw do destylacji z parą wodną tak, jak jest to pokazane na rysunku w ćwiczeniu 1 (str. 5). Następnie rozpuścić uzyskaną substancję w około 100 mL wody i prowadzić destylację z parą wodną aż do uzyskania 250 mL destylatu. Przeprowadzić ekstrakcję destylatu chlorkiem metylenu (6 x 50 mL). Ekstrakty połączyć i suszyć nad bezw. siarczanem sodu (ok. 30 min, mieszając za pomocą mieszadła magnetycznego), odsączyć

środek suszący. Następnie przesącz zateżyć pod zmniejszonym ciśnieniem w uprzednio zważonej kolbie i zważyć. Obliczyć w % zawartość olejku w surowcu.

Metoda B

Zmontować zestaw do destylacji z parą wodną tak, jak jest to pokazane na rysunku w ćwiczeniu 1 (str. 5). W kolbie umieścić 15 g kwiatów lawendy i 100 mL wody. Destylację prowadzić do momentu uzyskania 250 mL destylatu. Destylat przenieść do rozdzielacza i ekstrahować chlorkiem metylenu (6 x 50 mL). Otrzymane ekstrakty połączyć i suszyć nad bezw. siarczanem sodu (ok. 30 min, mieszając za pomocą mieszadła magnetycznego), odsączyć środek suszący. Następnie zateżyć przesącz pod zmniejszonym ciśnieniem w uprzednio zważonej kolbie. Obliczyć wydajność otrzymanego olejku. Następnie porównać wydajności olejku lawendowego uzyskanego metodą A i B.

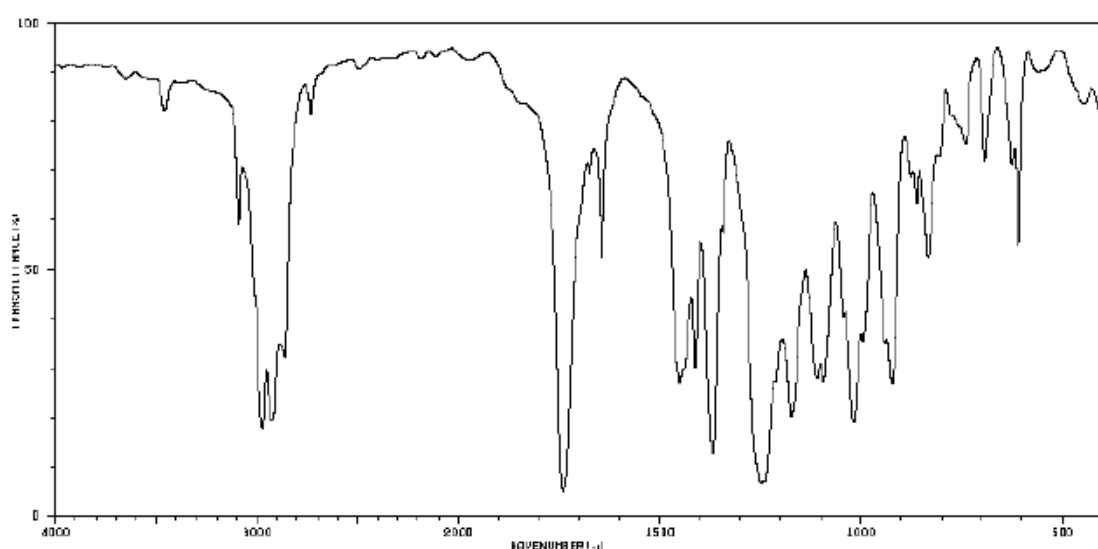
Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Eluent: heksan-octan etylu (3:1, v/v). Na płytkę z SiO₂ nanieść rozcieńczony w metanolu otrzymany produkt. Wysuszyć i płytkę wstawić do kuwety z eluentem. Po wysuszeniu płytki rezultat odczytać pod lampą UV i następnie płytkę wywołać w komorze z jodem.



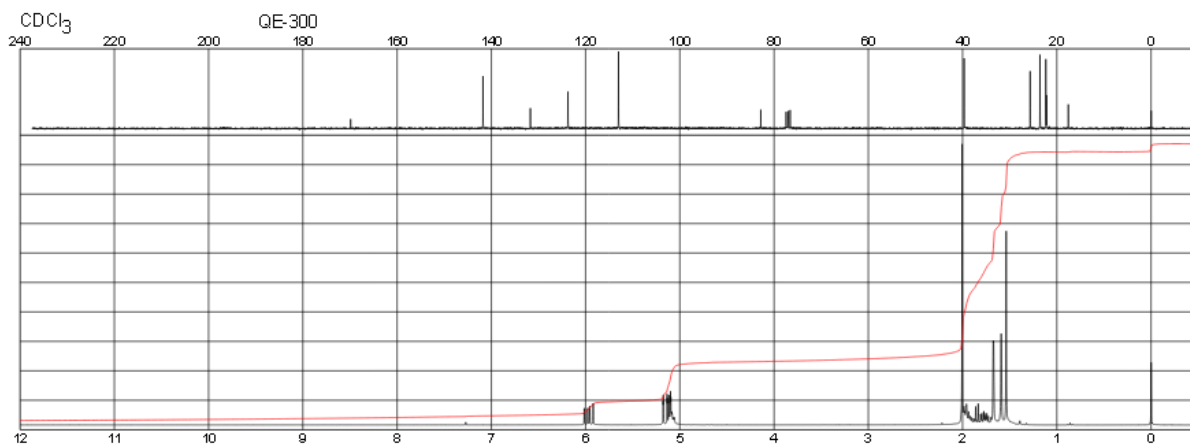
Dane spektroskopowe octanu linalilu

Widmo IR (film)

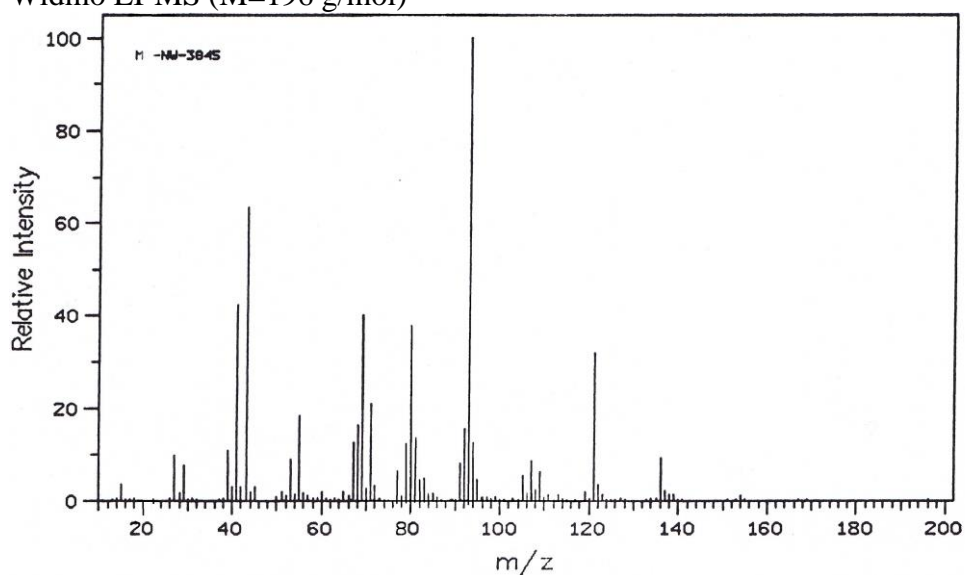


Wartość liczb falowych (cm⁻¹)
3650
3457
3090
2972
2860
1738
1676
1413
1358
1241
996

Widma ^1H NMR i ^{13}C NMR w CDCl_3 (katalog Sigma Aldrich)

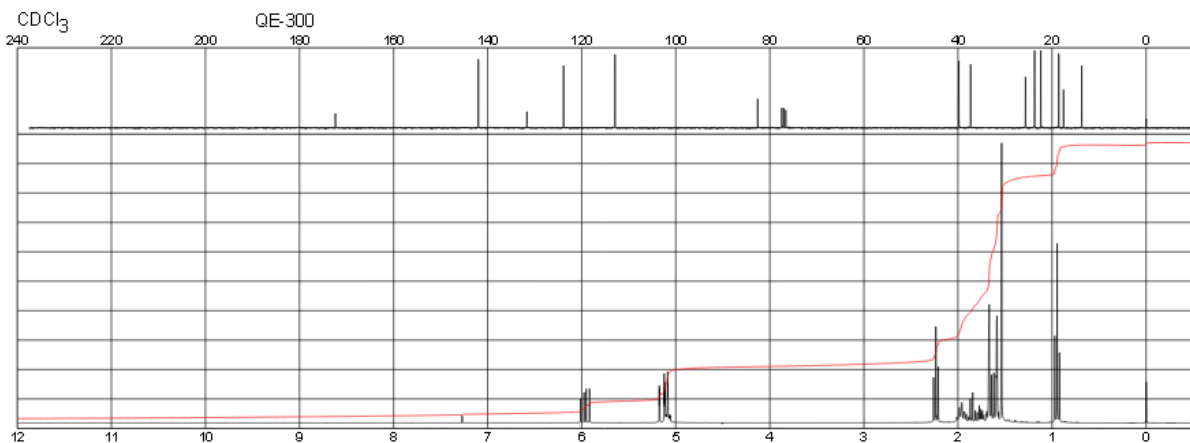


Widmo EI-MS (M=196 g/mol)



Dane spektroskopowe maślanu linalilu

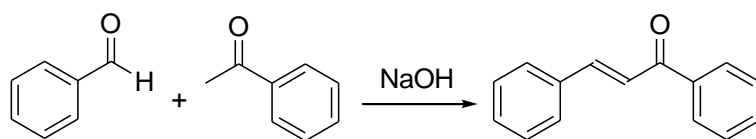
Widma ^1H NMR i ^{13}C NMR w CDCl_3 (katalog Sigma Aldrich)



Zagadnienia

- Metody wyodrębniania składników z surowca roślinnego
- Estry (budowa, metody otrzymania, zastosowanie)
- Analiza widm produktów

11. Benzylidenoacetofenon (Chalkon)



Odczynniki:

wodorotlenek sodu	2,2 g
etanol	13 mL
acetofenon	5 mL
aldehyd benzoesowy	4,4 mL

Aparatura i szkło:

kolba dwuszyjna okrągłodenna poj. 100 mL
mieszadło magnetyczne
chłodnica zwrotna
termometr
zestaw do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem

Do kolby dwuszyjnej o pojemności 100 mL, zaopatrzonej w mieszadełko magnetyczne i chłodnicę zwrotną, wlać roztwór 2,2 g wodorotlenku sodu w 20 mL wody i 13 mL etanolu. Kolbę umieścić w łaźni z drobno pokruszonym lodem i dodać z wkraplacza 5 mL acetofenonu, a następnie 4,4 mL aldehydu benzoesowego. Utrzymując temperaturę mieszaniny ok. 25 °C (dopuszczalne granice temperatury 15-30 °C) mieszać energicznie tak długo, aż stanie się gęsta (po 2-3 godzinach). Mieszaninę pozostawić na noc w lodówce. Następnie produkt odsączyć pod zmniejszonym ciśnieniem na lejku Büchnera i przemywać zimną wodą tak długo, aż odczyn przesącza wobec papierka uniwersalnego będzie obojętny. Następnie osad przemyć porcją zimnego etanolu (8 mL). Po wysuszeniu osadu na powietrzu otrzymuje się 8,8 g surowego chalkonu o t.t. 50-54 °C. Krystalizować z etanolu stosując około 5 mL na 1 g chalkonu. Wydajność po krystalizacji wynosi ok. 87%. Benzylidenoacetofenon otrzymuje się w postaci jasnożółtych kryształów o t.t. 56-57 °C.

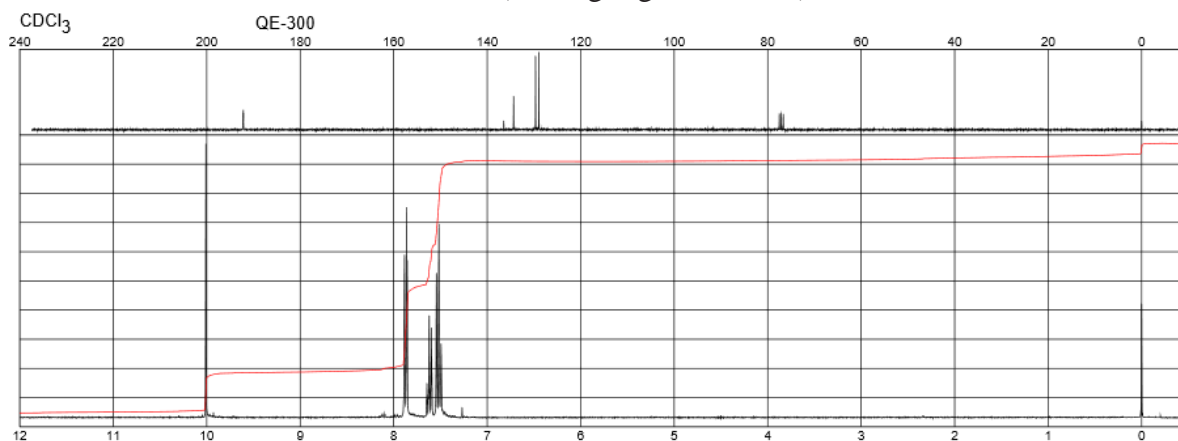
UWAGA! Praca z tym związkiem wymaga zachowania dużej ostrożności (rękawice ochronne) ponieważ działa drażniąco na skórę.

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Eluent: chlorek metylenu-etanol-heksan (6:1:3, v/v/v). Na płytkę z SiO₂ nanieść rozcieńczone w metanolu substraty oraz otrzymany produkt. Wysuszyć i płytkę wstawić do kuwety z eluentem. Po wysuszeniu płytki rezultat odczytać pod lampą UV i następnie płytkę wywołać w komorze z jodem.

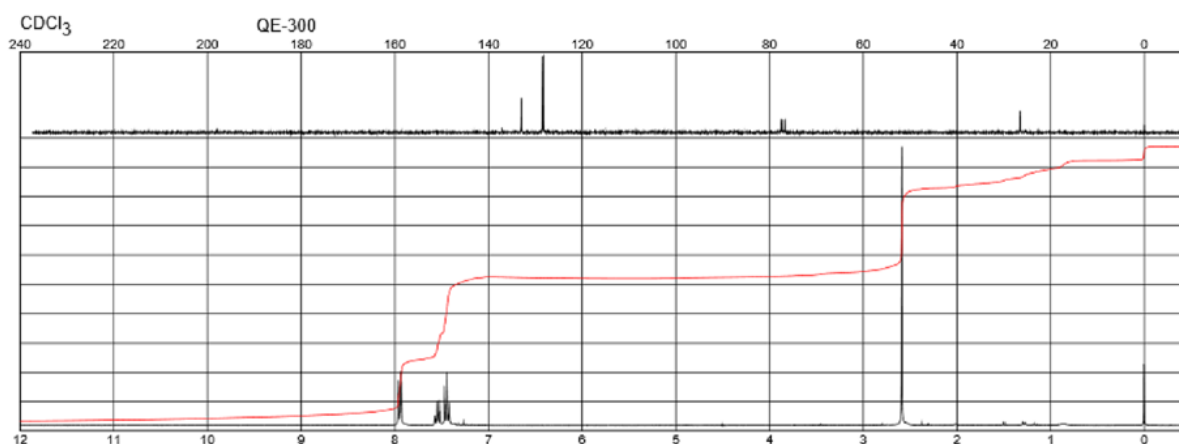
Dane spektroskopowe aldehydu benzoowego

Widma ^1H NMR i ^{13}C NMR w CDCl_3 (katalog Sigma Aldrich)



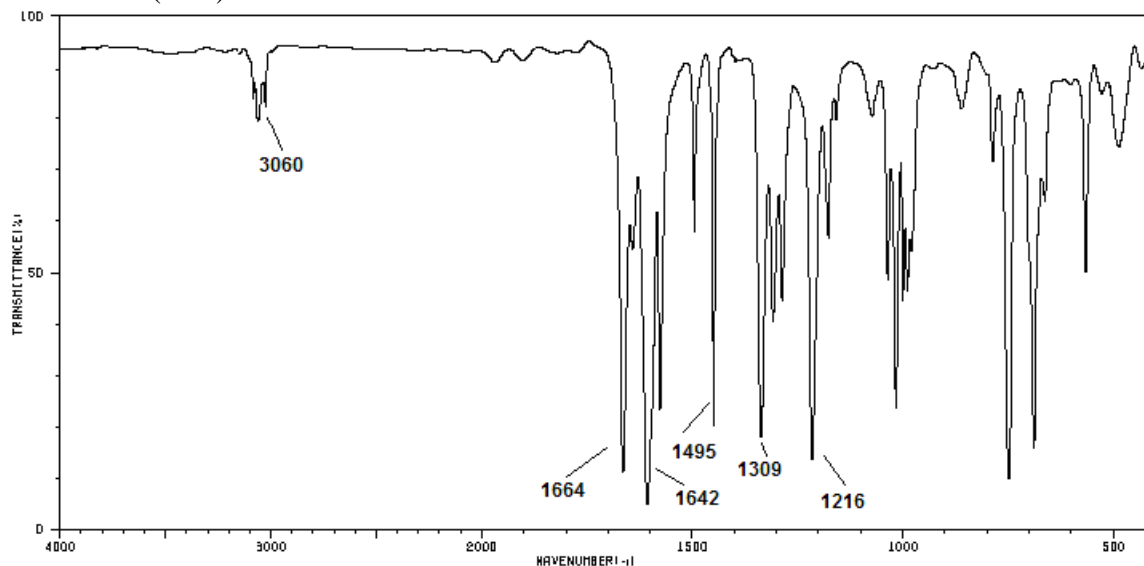
Dane spektroskopowe acetofenonu

Widma ^1H NMR i ^{13}C NMR w CDCl_3 (katalog Sigma Aldrich)

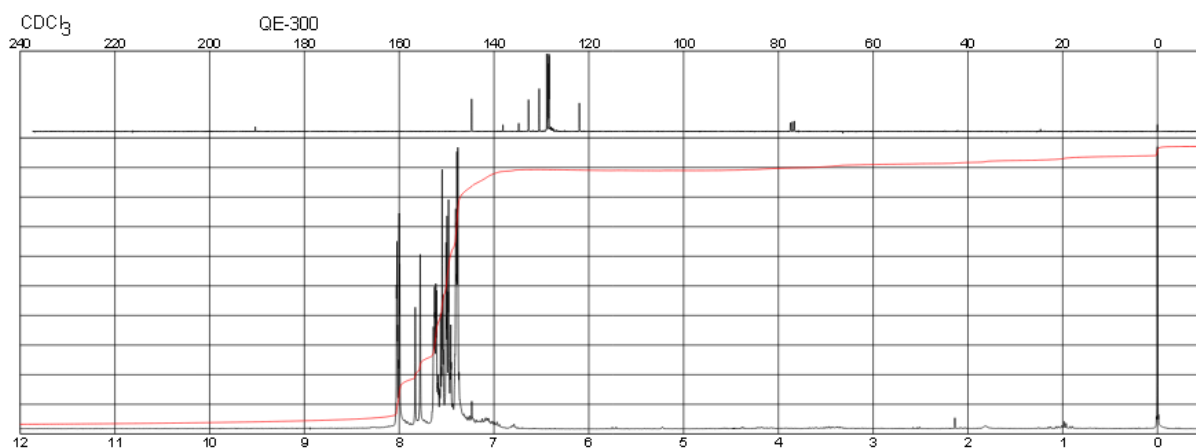


Dane spektroskopowe chalkonu

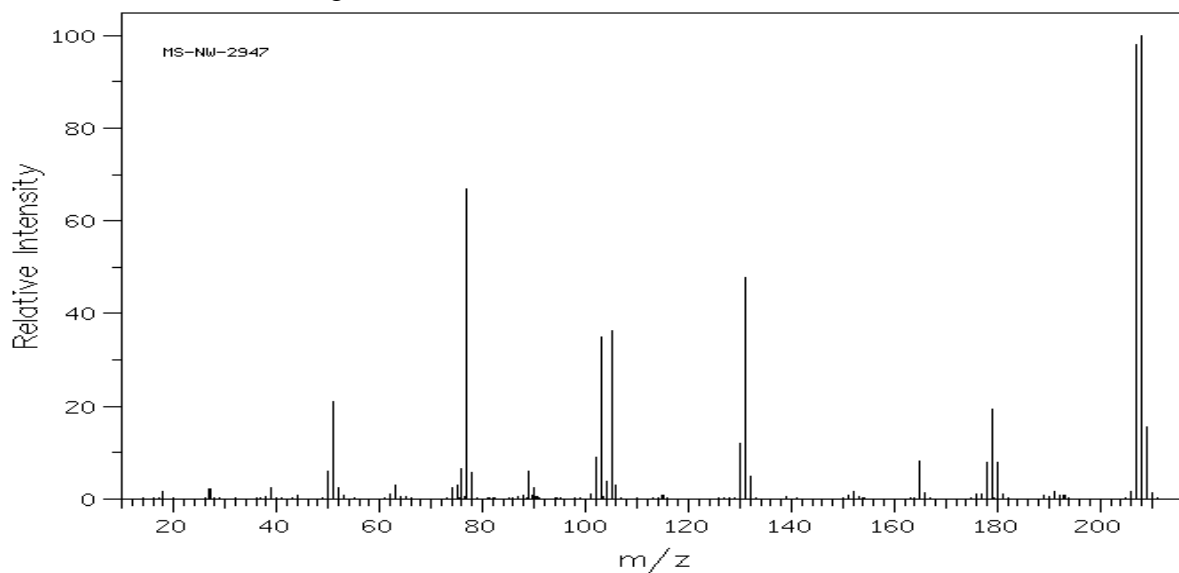
Widmo IR (KBr)



Widma ^1H NMR i ^{13}C NMR w CDCl_3 (katalog Sigma Aldrich)



Widmo EI-MS ($M=208$ g/mol)



Zagadnienia

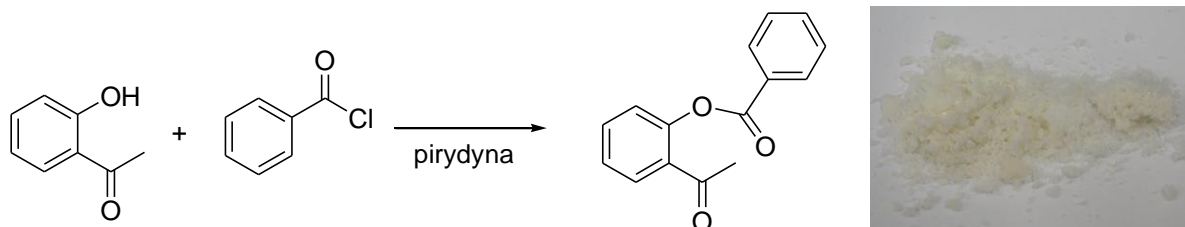
- Mechanizm syntezy chalkonu
- Modyfikacja chemiczna struktury chalkonu – reakcje redukcji
- Zastosowanie pochodnych chalkonu
- Analiza widm – porównanie właściwości substratów i produktu

12.1. Synteza flawonu

Synteza flawonu przebiega w trzech etapach:

- Etap 1 *o*-Benzoiloksoacetofenon
 Etap 2 *o*-Hydroksydibenzoilometan
 Etap 3 Flawon

12.1.1 *o*-Benzoiloksoacetofenon



Odczynniki:

<i>o</i> -hydroksyacetofenon	3,4 g
chlorek benzoilu	4 mL
bezw. pirydyna	5 mL
1 M HCl	120 mL
metanol	15 mL

Aparatura i szkło:

kolba stożkowa ze szlifem poj. 50 mL
korek
zlewka poj. 250 mL
zestaw do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem

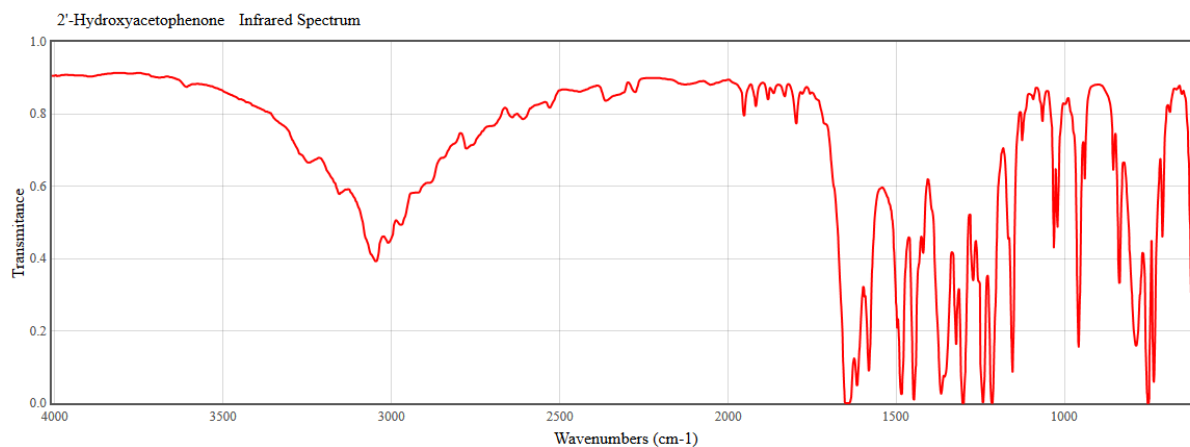
Do 3,4 g *o*-hydroksyacetofenonu umieszczonego w kolbie stożkowej o pojemności 50 mL dodać 4 mL (4,9 g) chlorku benzoilu i 5 mL bezwodnej, świeżo destylowanej pirydyny i zamknąć plastikowym korkiem. **Należy pracować pod sprawnie działającym wyciągiem i w rękawicach ochronnych!** Kolbę wytrząsać tak, aby jej zawartość uległa wymieszaniu, przy czym należy zwrócić uwagę, że temperatura mieszaniny nieco wzrasta. Po 20 minutach zawartość kolby, cały czas mieszając, wlać do zlewki z 1 M HCl oraz pokruszonym lodem (50 g). Wydzielony produkt odsączyć pod zmniejszonym ciśnieniem i przemyć najpierw 5 mL metanolu oziębionego w łaźni z lodem, a następnie 5 mL wody destylowanej. Produkt krystalizować z metanolu (6-8 mL). Ochłodzić otrzymaną mieszaninę w łaźni z lodem i osad odsączyć pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymuje się *o*-benzoiloksoacetofenon o t.t. 87-88 °C. (Wyd. ok. 80%)

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC):

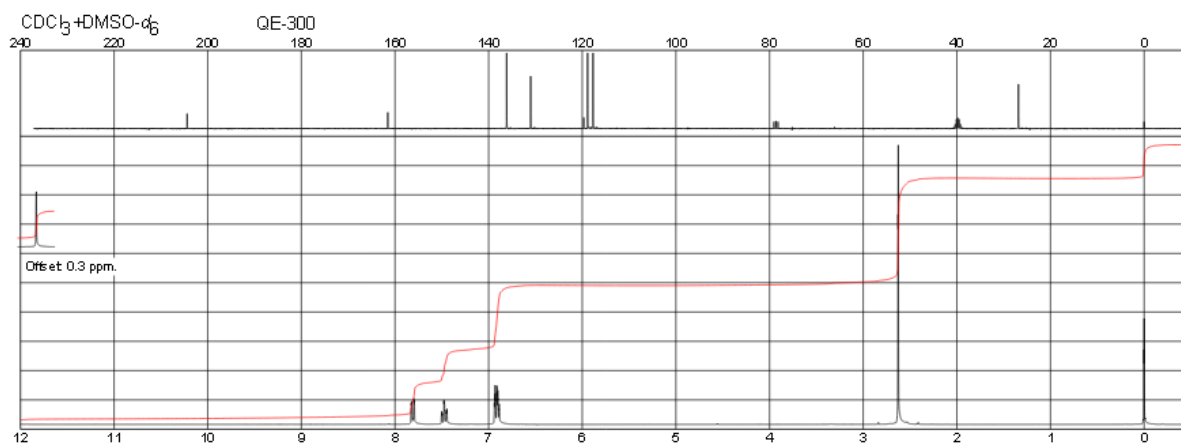
Eluenty: chloroform lub chloroform-metanol (5:1, v/v). Na płytkę SiO₂ nanieść rozcieńczone w metanolu roztwory *o*-hydroksyacetofenonu i *o*-benzoiloksoacetofenonu. Wysuszyć i płytkę wstawić do kuwety z eluentem. Po wysuszeniu płytki rezultat odczytać pod lampą UV i następnie płytkę wywołać w komorze z jodem.

Dane spektroskopowe *o*-hydroksyacetofenonu

Widmo IR

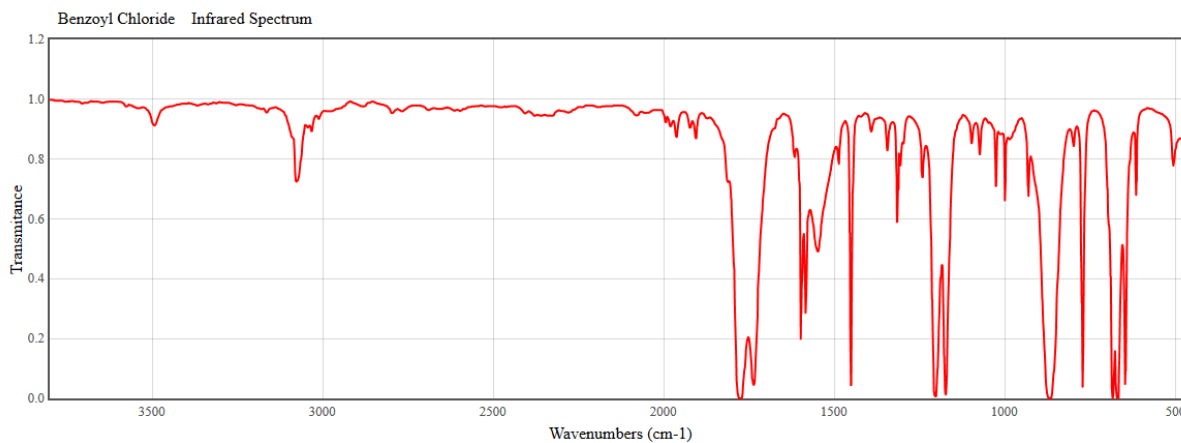


Widma ^1H NMR i ^{13}C NMR w CDCl_3 (katalog Sigma Aldrich))



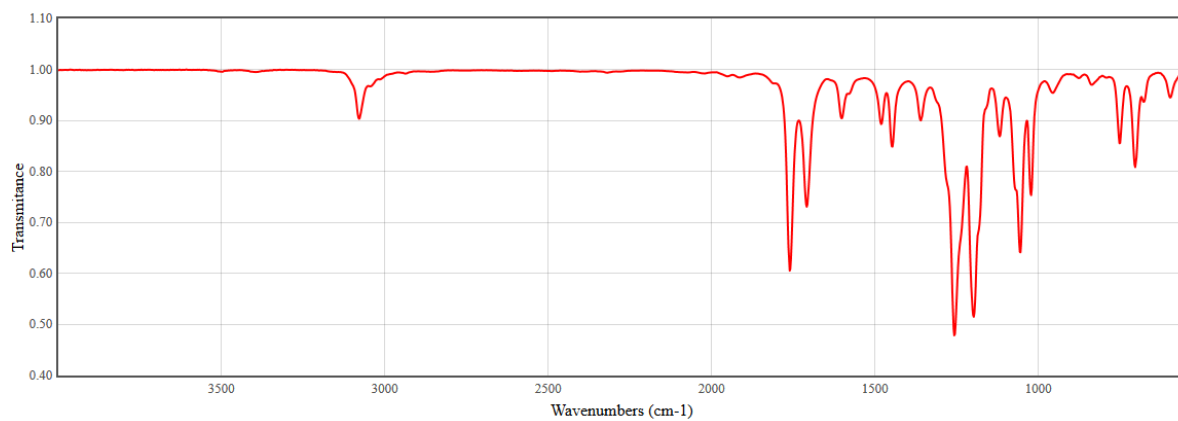
Dane spektroskopowe chlorku benzoilu

Widmo IR

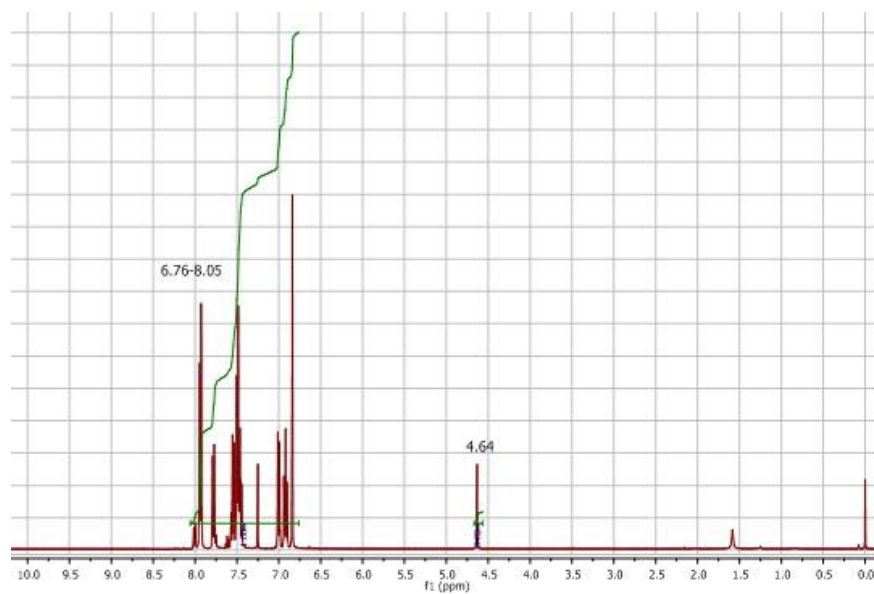


Dane spektroskopowe *o*-benzoiloksoacetofenonu

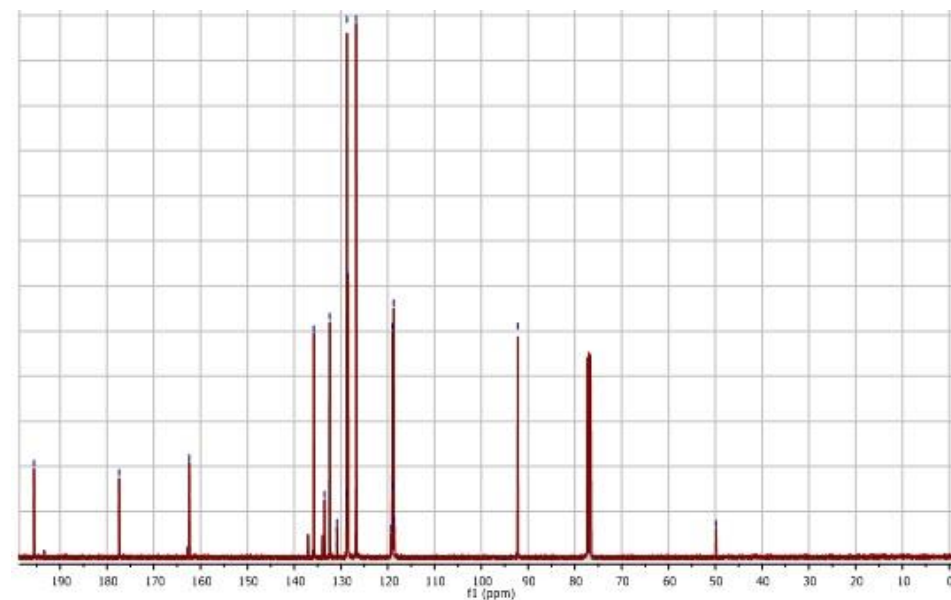
Widmo IR



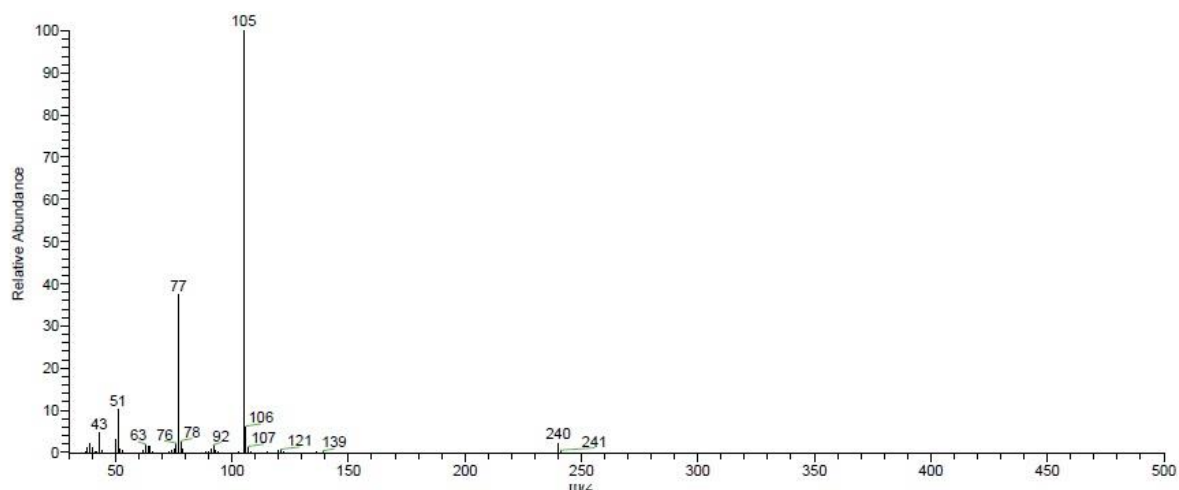
Widmo ¹H NMR w CDCl₃



Widmo ¹³C NMR w CDCl₃



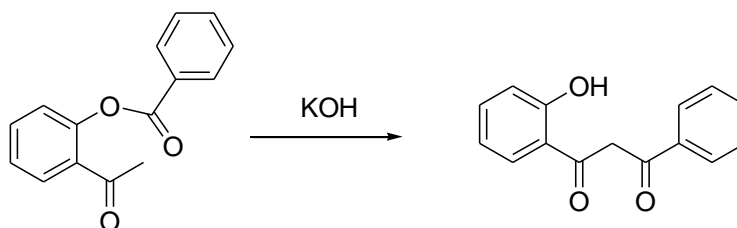
Widmo MS (M=240 g/mol)



Zagadnienia

- Flawonoidy
- Mechanizm syntezy flawonu (3 etapy)
- Modyfikacja chemiczna struktury flawonu
- Zastosowanie pochodnych flawonu
- Analiza widm – porównanie właściwości substratów i produktu

12.1.2. *o*-Hydroksydibenzoilometan



Odczynniki:

<i>o</i> -benzoyloksyoacetofenon	4 g
pirydyna	15 mL
wodorotlenek potasu	1,4 g
10% kwas octowy	21 mL
metanol	

Aparatura i szkło:

kolba okrągłodenna poj. 50 mL
chłodnica zwrotna
łaźnia wodna
mieszadło magnetyczne
bagietka
zestaw do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem

Wszystkie czynności należy wykonywać pod wyciągiem!

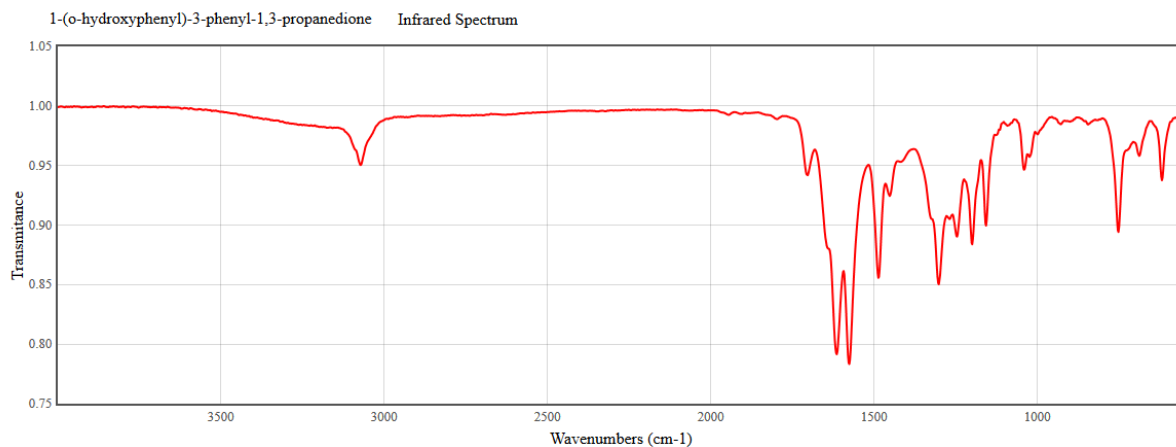
Kolbę o pojemności 50 mL, zaopatrzoną w chłodnicę zwrotną, umieścić w łaźni wodnej na mieszadle magnetycznym. Do kolby dodać 4 g *o*-benzoyloksyoacetofenonu w 15 mLpirydyny i mieszając ogrzewać do temperatury 50 °C. Dodać 1,4 g wodorotlenku potasu i całość mieszać przez 15 minut. Jeżeli wydzielający się żółty osad soli potasowej uniemożliwi mieszanie przy pomocy mieszadła magnetycznego, to należy mieszać ręcznie przy pomocy bagietki. Następnie mieszaninę ochłodzić do temperatury pokojowej i zakwasić, dodając, w trakcie mieszania, 21 mL 10% wodnego roztworu kwasu octowego. Wydzielony jasnożółty osad odsączyć pod zmniejszonym ciśnieniem i suszyć w suszarce w temperaturze 50 °C. Wydajność *o*-hydroksydibenzoilometanu o t.t. 117-120 °C wynosi ok. 80%. Czystość związku jest wystarczająca, aby mógł być użyty w kolejnym etapie syntezy. Po krystalizacji z metanolu można otrzymać czysty związek o t.t. 121-122 °C.

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC):

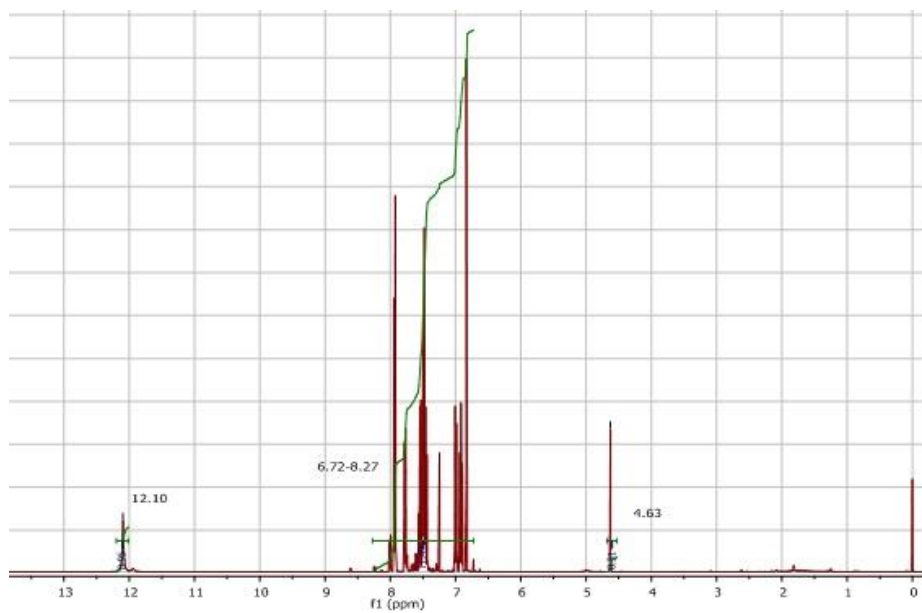
Eluenty: chloroform lub heksan-aceton (7:3, v/v). Na płytkę nanieść roztwory *o*-benzoyloksyoacetofenonu i *o*-hydroksydibenzoilometanu. Wsuszyć i płytkę wstawić do kuwety z eluentem. Po wysuszeniu płytki rezultat odczytać pod lampą UV a następnie płytkę wywołać w komorze z jodem. Podać wartości R_f dla substratu i produktu.

Dane spektroskopowe *o*-hydroksydibenzoilometanu

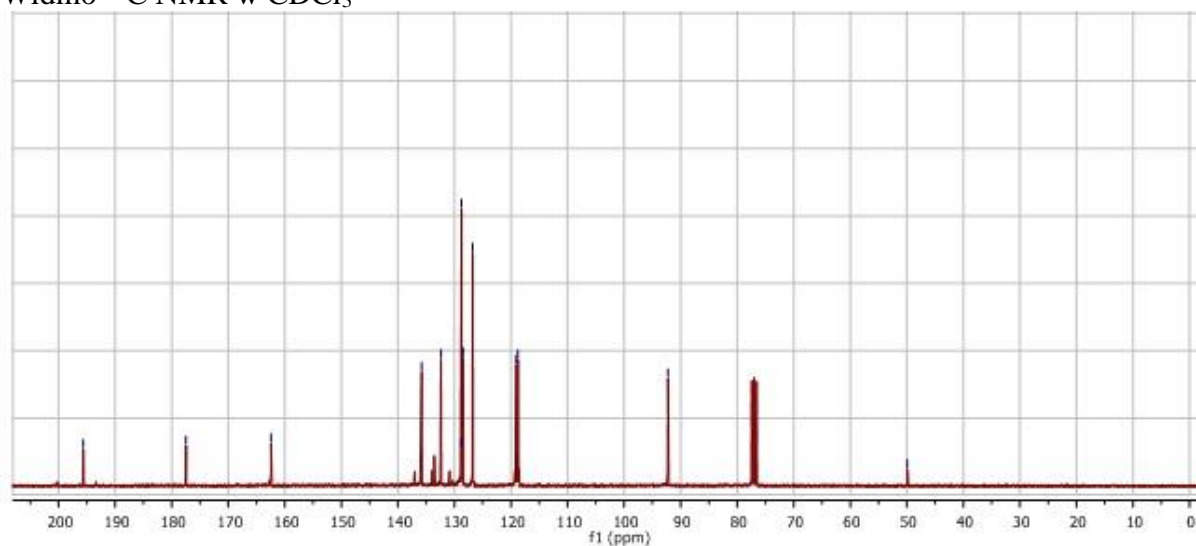
Widmo IR



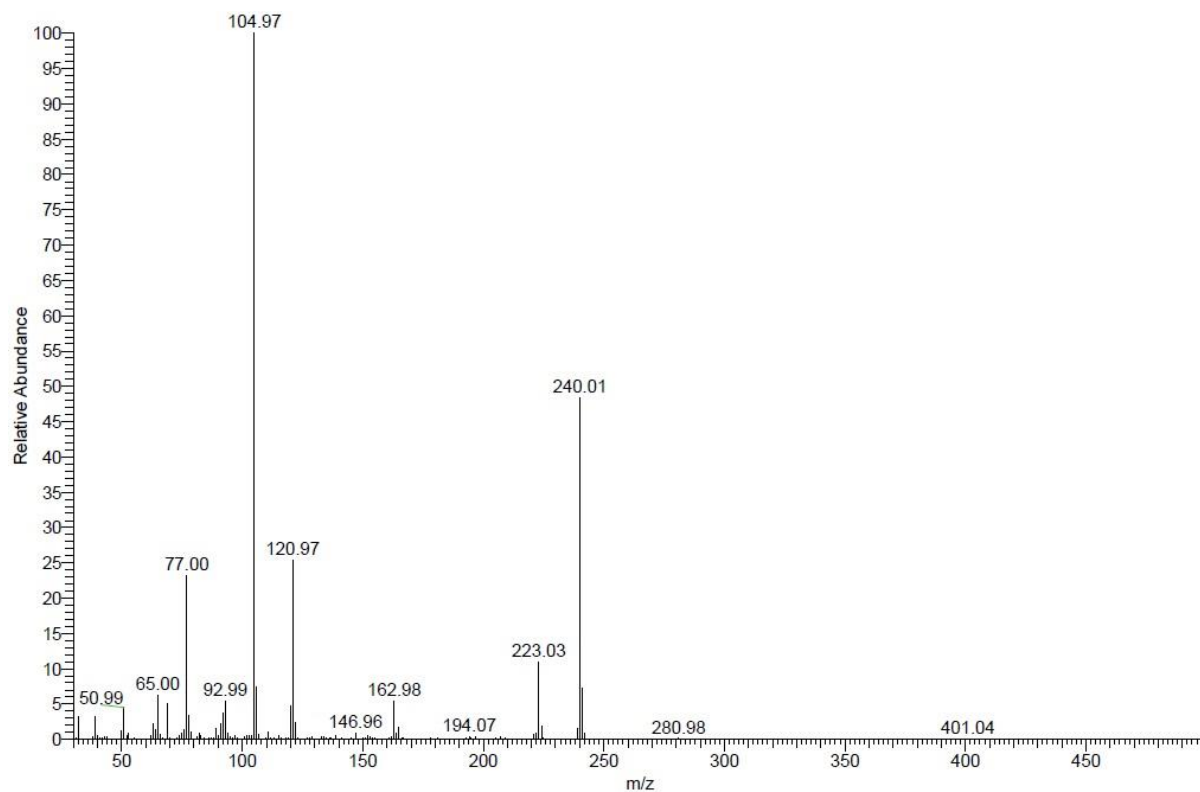
Widmo ^1H NMR w CDCl_3



Widmo ^{13}C NMR w CDCl_3



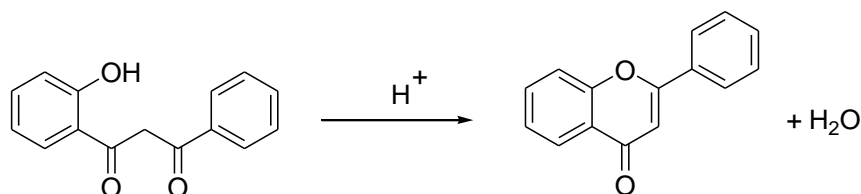
Widmo MS (M=240 g/mol)



Zagadnienia

- Flawonoidy
- Mechanizm syntezy flawonu (3 etapy)
- Modyfikacja chemiczna struktury flawonu
- Zastosowanie pochodnych flawonu
- Analiza widm – porównanie właściwości substratu i produktu

12.1.3. Flawon



Odczynniki:

o-hydroksydibenzoilometan 3 g
lodowaty kwas octowy 17 mL
stężony kwas siarkowy(VI) 0,7 mL
eter naftowy

Aparatura i szkło:

kolba okrągłodenna poj. 50 mL
chłodnica zwrotna
łaźnia wodna
zlewka poj. 200 mL
zestaw do sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem

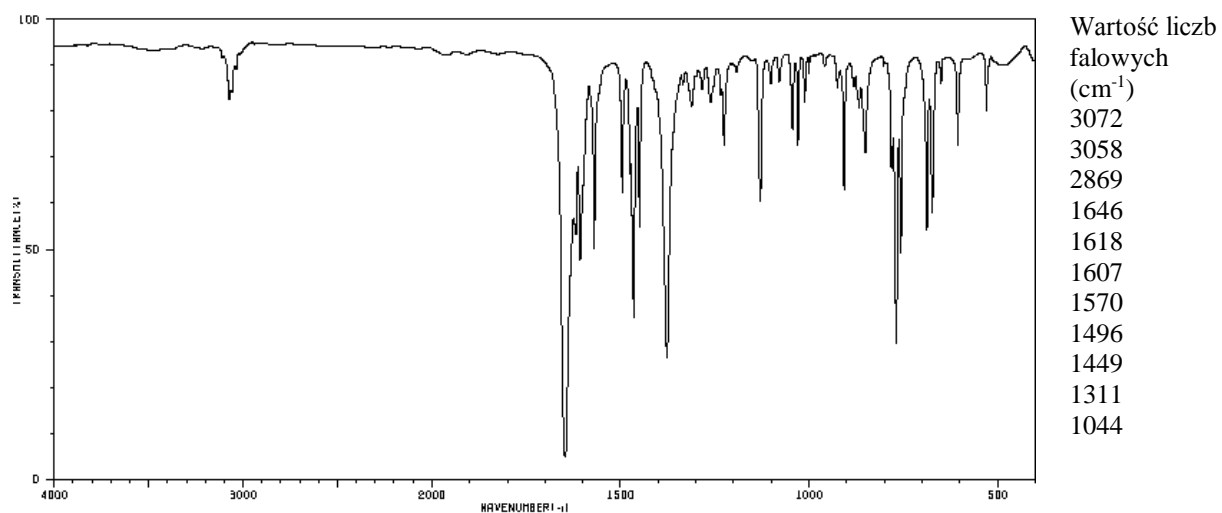
Do roztworu 3 g *o*-hydroksydibenzoilometanu w 17 mL lodowatego kwasu octowego przygotowanego w kolbie o pojemności 50 mL zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i umieszczonej w łaźni wodnej, dodać, wstrząsając, 0,7 mL stężonego kwasu siarkowego(VI). Roztwór ogrzewać przez 1 godzinę w łaźni wodnej, co jakiś czas wstrząsając delikatnie kolbą. Następnie zawartość kolby wylać do zlewki o pojemności 200 mL zawierającej 80 g pokruszonego lodu i pozostawić, aż lód ulegnie całkowitemu roztopieniu. Wydzielony flawon odsączyć i przemywać wodą tak długo, aż przesącz wykaże odczyn obojętny (około 170 mL wody). Osad suszyć w suszarce w temperaturze 50 °C. Po krystalizacji z dużej objętości eteru naftowego otrzymuje się czysty flawon w postaci bezbarwnych igieł. Zważyć otrzymany produkt i obliczyć wydajność ostatniego etapu oraz wydajność całego procesu. Zmierzyć temperaturę topnienia (lit. t.t. 98 °C).

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC):

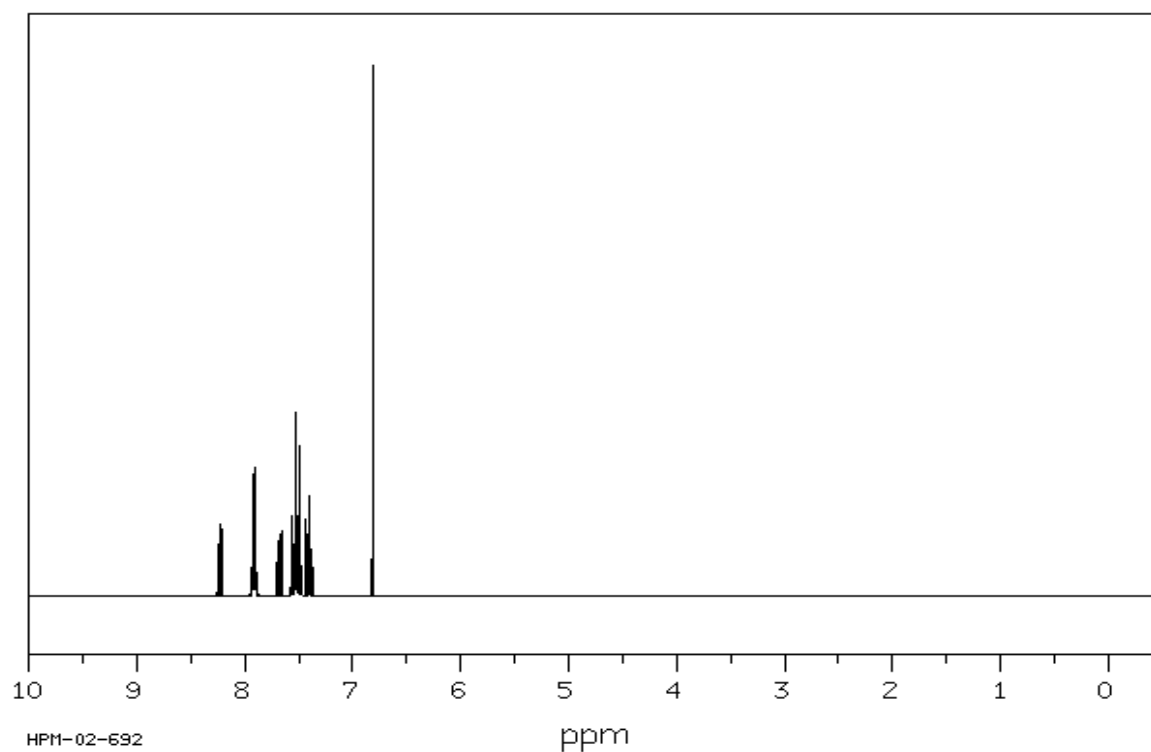
Eluenty: chloroform lub heksan-aceton (7:3, v/v). Na płytkę nanieść metanolowe roztwory *o*-hydroksydibenzoilometanu i flawonu. Wysuszyć i płytkę wstawić do kuwety z eluentem. Po wysuszeniu płytki rezultat odczytać pod lampą UV i następnie płytkę wywołać w komorze z jodem. Podać wartości R_f dla substratu i produktu.

Dane spektroskopowe flawonu

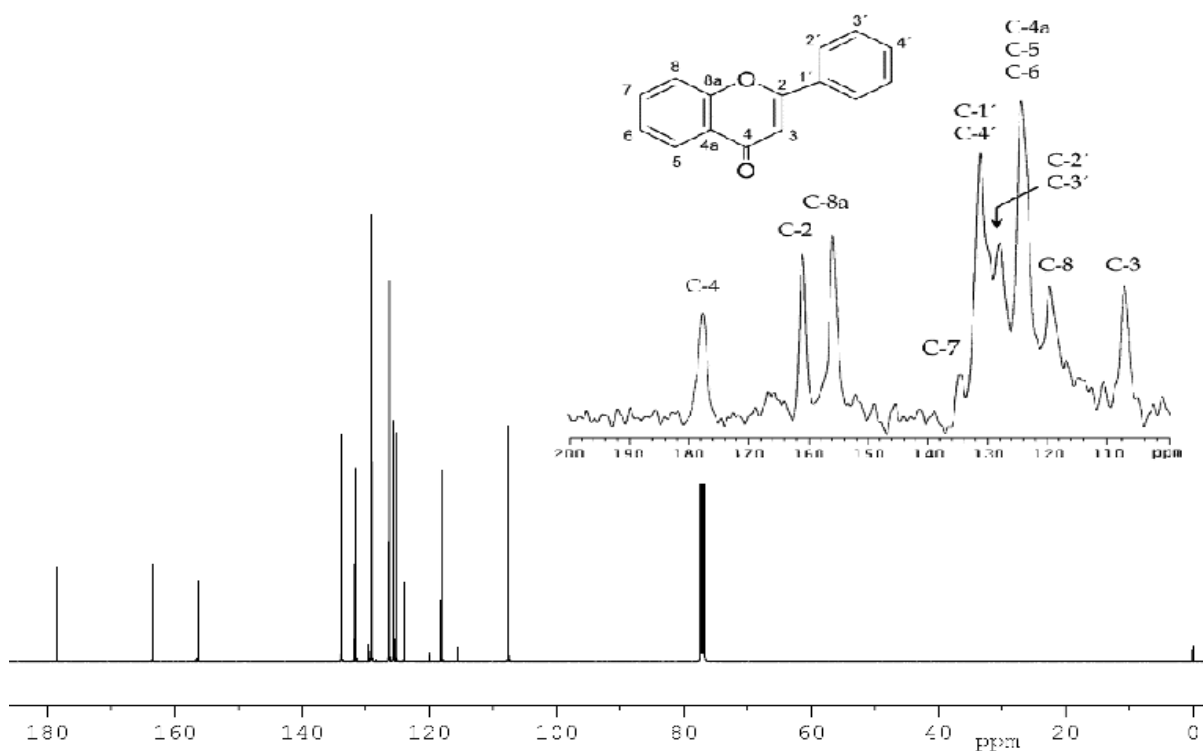
Widmo IR (KBr)



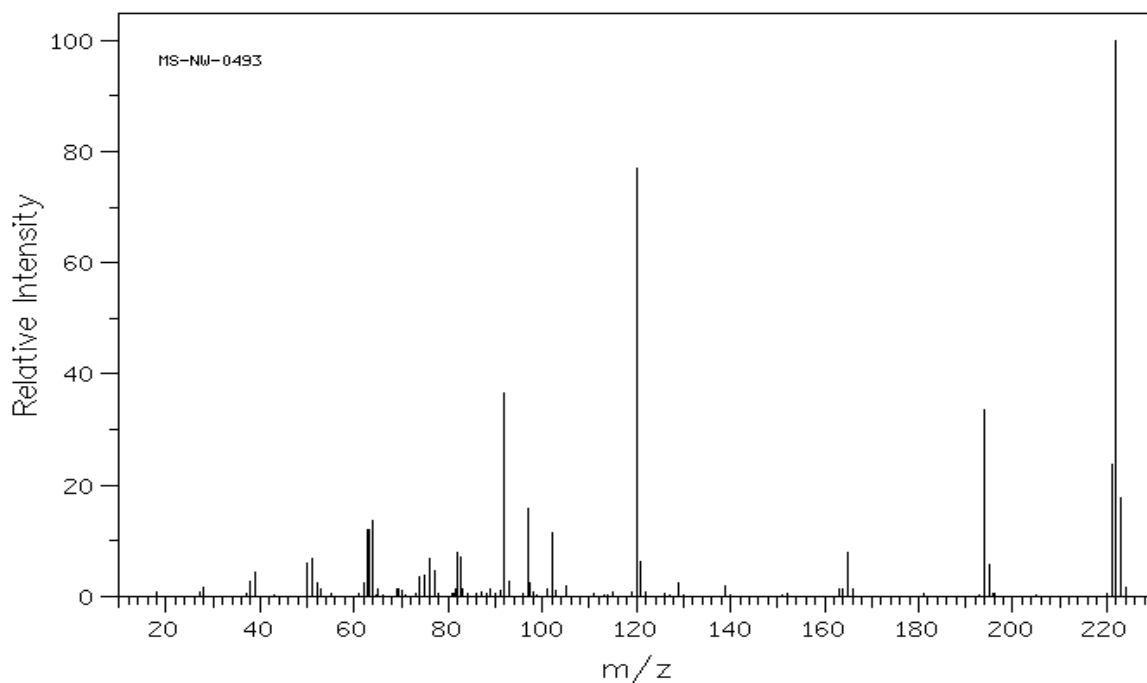
Widmo ¹H NMR w CDCl₃ (300 Hz)



Widmo ^{13}C NMR w CDCl_3



Widmo EI-MS ($M=222$ g/mol)



Zagadnienia

- Flawonoidy
- Mechanizm syntezy flawonu (3 etapy)
- Modyfikacja chemiczna struktury flawonu
- Zastosowanie pochodnych flawonu
- Analiza widm – porównanie właściwości substratu i produktu

12.2. Izolacja flawonoidów i reakcje barwne



Odczynniki:

kora dębu, wierzby, brzozy lub łuski cebuli	10 g
metanol	150 mL
woda destylowana	
sole nieorganiczne i organiczne	
flawon	0,1 g

Aparatura i szkło:

zlewka poj. 400mL
lejek zwykły
sączki z bibuły
probówki i statyw do probówek

Flawonoidy to grupa związków organicznych występujących w roślinach, spełniających funkcję m. in. barwników, przeciwutleniaczy i naturalnych insektycydów oraz fungicydów. Najbardziej popularnym i najlepiej poznanym flawonoidem jest kwercetyna i jej glikozydy (kora dębu, wierzby, brzozy, łuski cebuli) a także mirycetyna (kora brzozy) i apigenina.

Kora wierzby (*Salicis cortex*):

Stosuje się w postaci odwarów w objawowym leczeniu gorączki i bólu oraz łagodnych bólach reumatycznych, gdyż dzięki obecności salicylanów posiada właściwości przeciwgorączkowe i przeciwzapalne. Nie zaleca się stosowania u osób z nadwrażliwością na salicylany lub leki z grupy niesterydowych, przeciwzapalnych oraz u osób z astmą oskrzelową.

Kora dębu (*Quercus cortex*):

Do stosowania zewnętrznego w postaci odwaru do okładów, przemywań, płukania gardła i jamy ustnej, gdyż wykazuje działanie ściągające w łagodnych stanach zapalnych skóry i błon śluzowych gardła i jamy ustnej.

Przeprowadzić macerację surowca (łuski cebuli lub kora dębu, wierzby, brzozy) w zlewce o pojemności 400 mL zalewając na pół godziny metanolem. Co kilka minut należy pomieszać bagietką. Uzyskany macerat należy przesączyć przez zwykły lejek i roztwór zagaęścić pod zmniejszonym ciśnieniem. Zważyć. Otrzymany olej z flawonoidami rozpuścić w 100 mL metanolu lub w wodzie destylowanej i określić odczyn tego roztworu za pomocą papierka uniwersalnego. Przygotować wodne roztwory soli nieorganicznych poprzez

całkowite rozpuszczenie około 50 mg danej soli w najmniejszej możliwej ilości wody (około 5 mL) w oznaczonych probówkach (wg tabeli podanej poniżej). Przygotować roztwór, który będzie stanowić wzorzec koloru poprzez dodanie 6-10 kropli wodnego roztworu flawonoidów do próbki z wodą destylowaną. Dodawać za pomocą pipety Pasteura kroplami roztwór flawonoidów do kolejnych roztworów soli obserwując zmianę barwy i zanotować w tabeli.

Pisząc odpowiednie równania reakcji hydrolizy (cząsteczkowo i jonowo) określić odczyn wyjściowych roztworów soli. Po około pół godziny sprawdzić zmiany barwy roztworów i obserwacje zanotować w tabeli.

Pobrać próbkę flawonu (syntetycznego), rozpuścić w wodzie lub/i metanolu i następnie przeprowadzić reakcje z przygotowanymi roztworami soli. Porównać barwy roztworów otrzymanych w przypadku flawonu oraz mieszaniny flawonoidów otrzymanej z surowca roślinnego.

Na podstawie wiadomości o flawonoidach i obserwacji eksperymentalnych sformułować zależność pomiędzy barwą roztworu, a składnikami znajdującymi się w danej próbce, biorąc pod uwagę następujące czynniki:

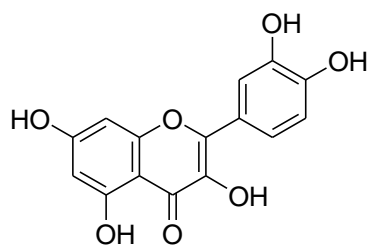
- odczyn roztworu,
- rodzaj kationu i anionu.

Określić wpływ budowy strukturalnej badanego związku na zmianę zabarwienia poszczególnych roztworów soli (należy wziąć pod uwagę obecność jonów jednowartościowych i dwuwartościowych w analizowanych roztworach).

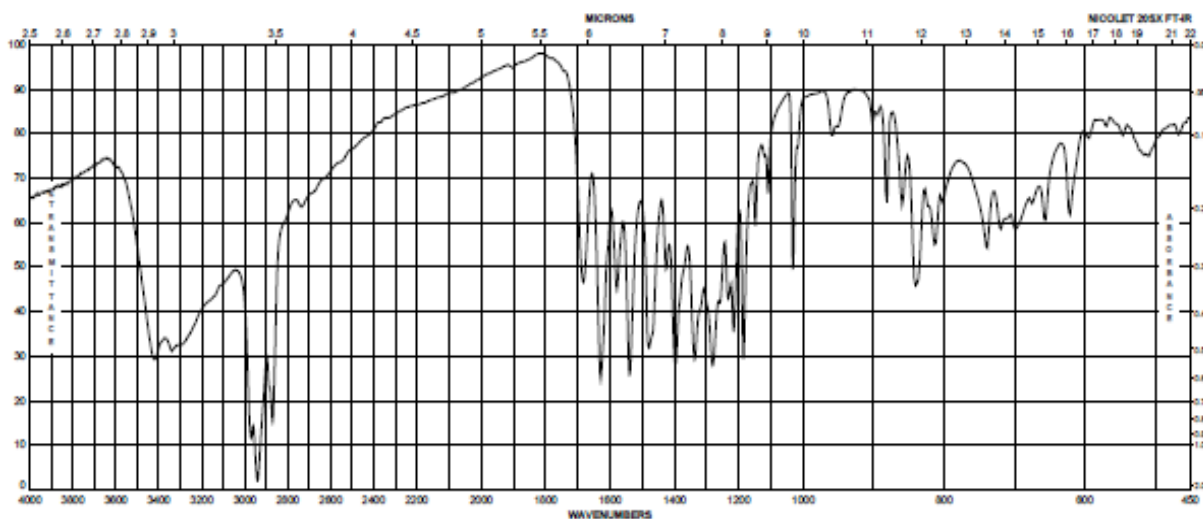
Nr próbki	Stosowana sól*	Odczyn wodnego roztworu soli	Barwa roztworu bezpośrednio po dodaniu roztworu soli	Barwa roztworu po 0,5 godz od dodania roztworu soli
1	LiClO ₄			
2	Li ₂ CO ₃			
3	cytrynian litu			
4	NaCl			
5	cytrynian sodu			
6	NaNO ₂			
7	Na ₂ SO ₃			
8	KBr			
9	K ₂ CO ₃			
10	MgSO ₄			
11	CaCl ₂			
12	NH ₄ Cl			
13	FeCl ₃			
14	Fe(ClO ₄) ₂			
15	Al(NO ₃) ₃			

* można też zastosować inne sole (dobrze rozpuszczalne w wodzie) z danym kationem

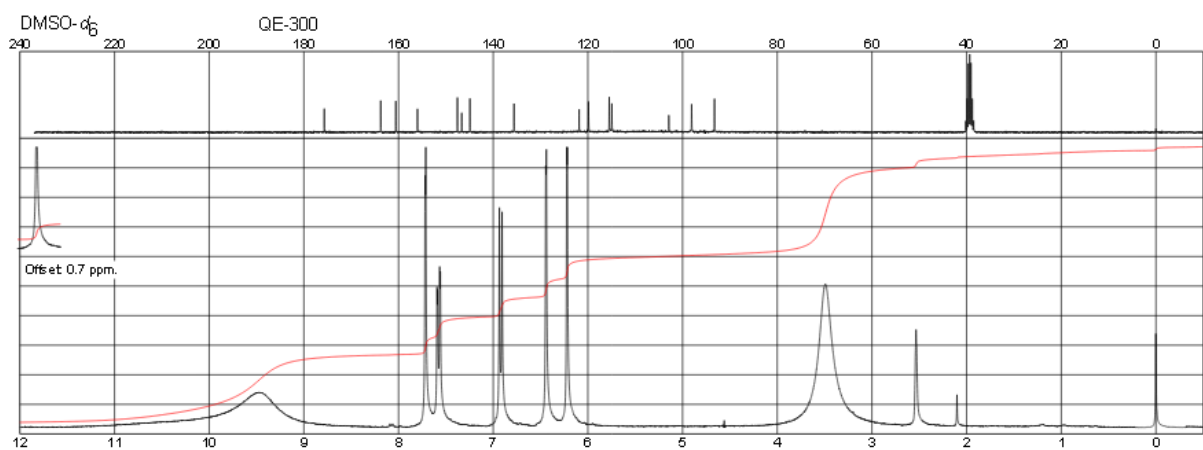
Dane spektroskopowe kwercetyny



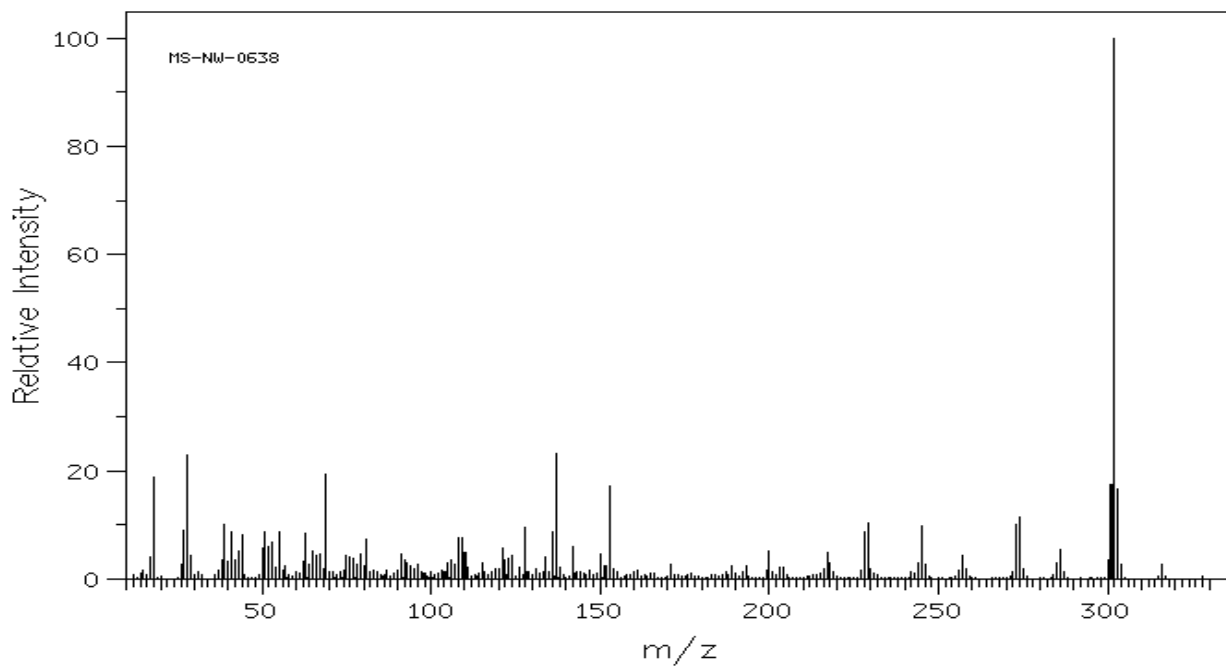
Widmo IR (katalog Sigma Aldrich)



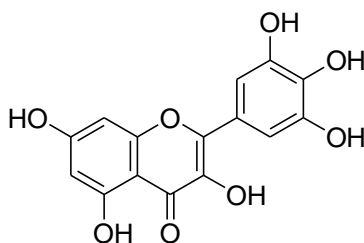
Widma ¹H NMR i ¹³C NMR w DMSO-d₆ (katalog Sigma Aldrich)



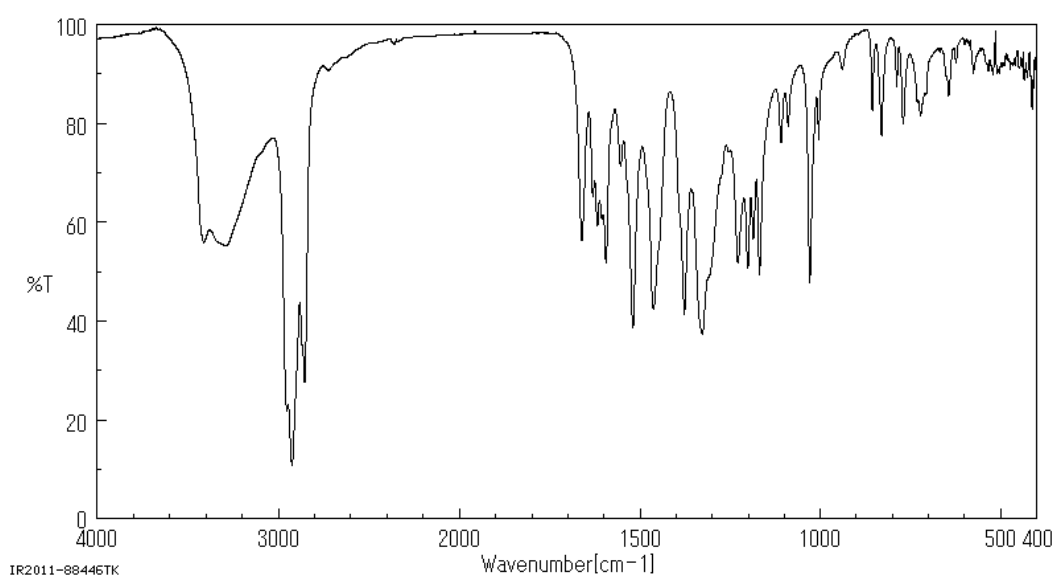
Widmo EI-MS (M=302 g/mol)



Dane spektroskopowe mirycetyny (3,3',4',5,5',7-heksahydroksyflawon)

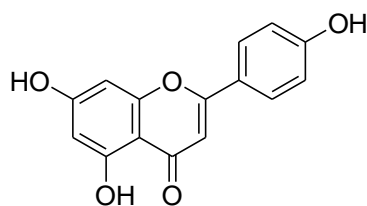


Widmo IR (nujol)

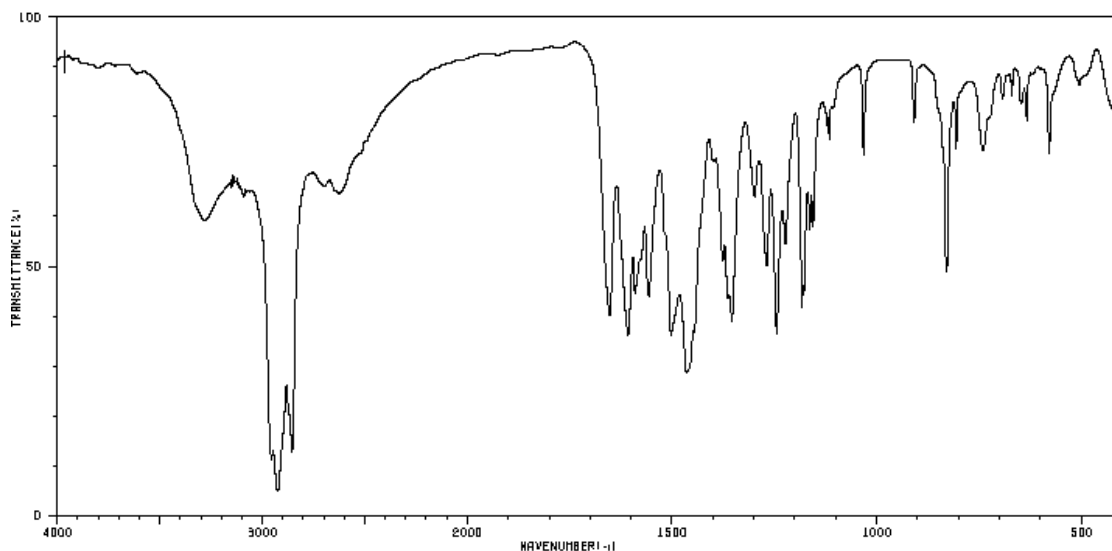


Wartości
liczb
falowych
(cm⁻¹)
3410
3294
2924
2854
1661
1618
1595
1554
1377
1169
1029

Dane spektroskopowe apigeniny (4',5,7-trihydroksyflawon)



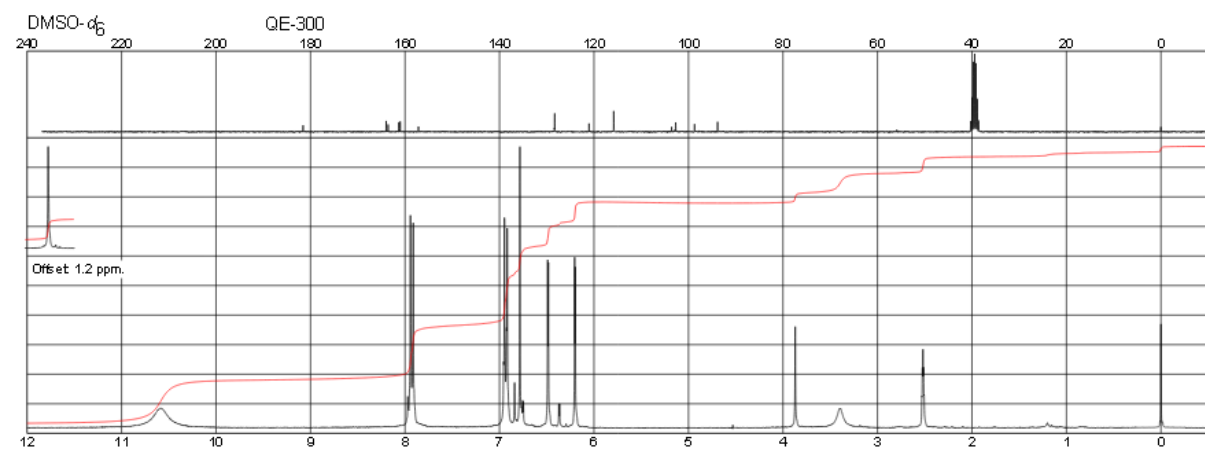
Widmo IR (nujol)



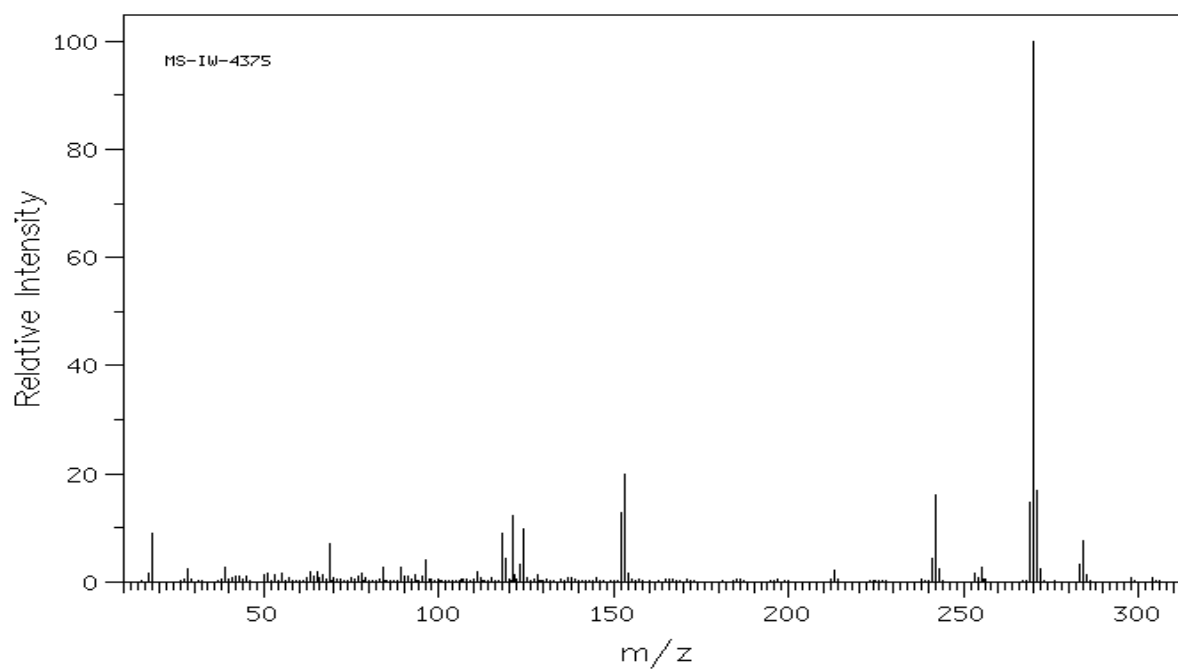
Wartości liczb falowych (cm⁻¹)

- 3280
- 3145
- 3095
- 2909
- 2855
- 1652
- 1607
- 1590
- 1376
- 1122
- 1032

Widma ¹H NMR i ¹³C NMR w DMSO-d₆ (katalog Sigma Aldrich)



Widmo EI-MS (M= 270 g/mol)

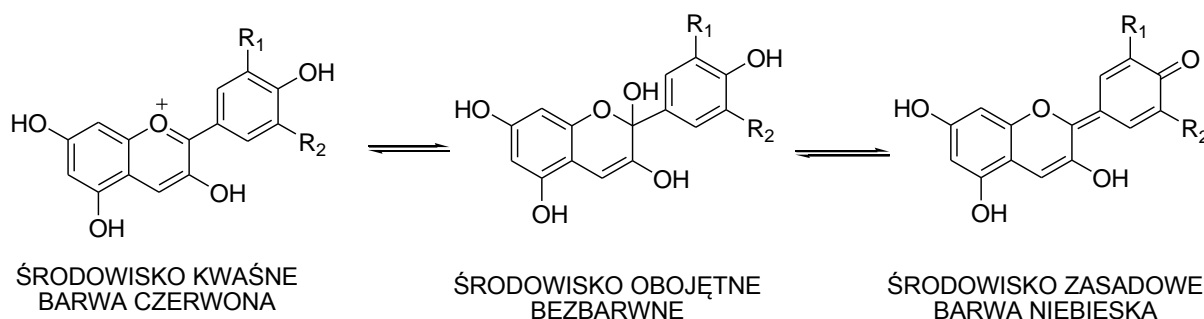


Zagadnienia

- Metody wyodrębniania składników z surowca roślinnego
- Flawonoidy (właściwości, reaktywność)
- Analiza widm produktów

13. Antocyjany

13.1. Reakcje barwne antocyjanów izolowanych z owoców dzikiej róży i głogu, kwiatów hibiskusa i malwy czarnej



Odczynniki:

surowiec: owoc głogu	10 g
kwiat hibiskusa	5 g
dzika róża	10 g
kwiat malwy czarnej	5 g
metanol	
sole nieorganiczne	(tabela)
flawon	0,1 g

Aparatura i szkło:

zlewki poj. 400 mL i 200 mL
probówki 30 sztuk
lejek zwykły (średnica około 10 cm)
papierki wskaźnikowe (1-14 pH)
pipety Pasteura

Przeprowadzić macerację surowca (10 g owocu głogu, 5 g kwiatu hibiskusa, 10 g dzikiej róży, 5 g kwiatów malwy czarnej) w zlewce o pojemności 400 mL zalewając na pół godziny metanolem. Co kilka minut należy zamieszać bagietką. Uzyskany macerat należy przesączyć przez zwykły lejek i roztwór zagęścić pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymaną mieszaninę antocyjanów zważyć i rozpuścić w wodzie destylowanej. Sporządzić wodne roztwory soli nieorganicznych poprzez całkowite rozpuszczenie około 50 mg związku w najmniejszej możliwej ilości wody (około 5 mL) w oznaczonych probówkach (wg tabeli podanej poniżej). Przygotować roztwór, który będzie stanowić wzorzec koloru poprzez dodanie 6-10 kropli wodnego roztworu antocyjanów do probówki z wodą destylowaną. Dodawać kroplami do poszczególnych probówek z wodnymi roztworami soli za pomocą pipety Pasteura roztwór antocyjanów obserwując zmianę barwy i zanotować w tabeli. Określić odczyn wyjściowych roztworów soli, pisząc odpowiednie równania reakcji hydrolizy

(cząsteczkowo i jonowo). Po około pół godziny sprawdzić czy barwy roztworów uległy zmianie i obserwacje zanotować w tabeli.

Pobrać próbkę flawonu (syntetycznego), rozpuścić w wodzie lub/i metanolu i następnie przeprowadzić reakcje z przygotowanymi roztworami soli. Porównać barwy roztworów otrzymanych w przypadku flawonu oraz mieszaniny antocyjanów otrzymanej z surowca roślinnego.

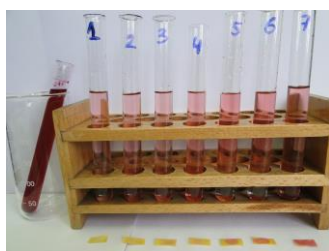
Na podstawie wiadomości o antocyjanach i obserwacji eksperymentalnych sformułować zależność pomiędzy barwą roztworu, a składnikami znajdującymi się w danej próbce, biorąc pod uwagę:

- odczyn roztworu,
- rodzaj kationu i anionu.

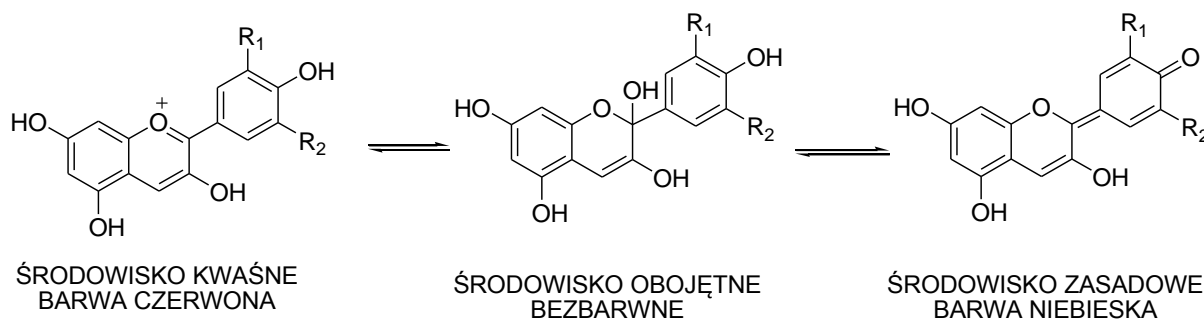
Określić wpływ jonów jednowartościowych i dwuwartościowych na zmianę barwy analizowanych roztworów.

Numer próbki	Stosowana sól*	Odczyn wodnego roztworu soli	Barwa roztworu bezpośrednio po dodaniu roztworu soli	Barwa roztworu po 0,5 godz. od dodania roztworu soli
1	LiClO ₄			
2	Li ₂ CO ₃			
3	cytrynian litu			
4	NaCl			
5	cytrynian sodu			
6	NaNO ₂			
7	Na ₂ SO ₃			
8	KBr			
9	K ₂ CO ₃			
10	MgSO ₄			
11	CaCl ₂			
12	NH ₄ Cl			
13	FeCl ₃			
14	Fe(ClO ₄) ₂			
15	Al(NO ₃) ₃			

* można też zastosować inne sole (dobrze rozpuszczalne w wodzie) z danym kationem



13.2. Izolacja i badanie wpływu odczynu roztworu na barwę antocyjanów zawartych w owocach dzikiej róży i głogu, kwiatach hibiskusa i malwy czarnej



Odczynniki:

surowiec (dwa do wyboru):

owoc głogu	10 g
kwiat hibiskusa	5 g
dzika róża	10 g
kwiaty malwy czarnej	5 g
metanol	ok. 300 mL
0,5 M HCl	
0,5 M NaOH	

Aparatura i szkło:

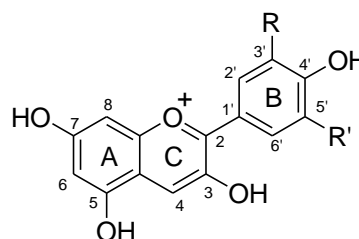
zlewki poj. 400 mL i 200 mL
kolba okrągłodenna poj. 250 mL
lejek zwykły (średnica ok. 10 cm)
papierki wskaźnikowe (1-14 pH)
biureta 50 mL
bagietka

Przeprowadzić macerację surowca (10 g owocu głogu, 5 g kwiatu hibiskusa, 10 g dzikiej róży, 5 g kwiatów malwy czarnej) w zlewce o pojemności 400 mL zalewając na pół godziny metanolem. Co kilka minut należy pomieszać bagietką. Uzyskany macerat należy przesączyć przez zwykły lejek i roztwór zagęścić pod zmniejszonym ciśnieniem i zważyć. Otrzymany olej z antocyjanami (1 g) rozpuścić w 100 mL metanolu w kolbie stożkowej, zbadać pH wyjściowego roztworu za pomocą papierka uniwersalnego i miareczkować 0,5 M wodnym roztworem NaOH ciągle mieszając do momentu zauważalnej zmiany barwy utrzymującej się przez 30 sekund, zbadać wartość pH i zanotować barwę. Jeżeli zmiana barwy nastąpi ponownie i będzie utrzymywać się przez 30 sekund, to zanotować barwę roztworu i określić wartość pH za pomocą papierka uniwersalnego. Kontynuować miareczkowanie do osiągnięcia przez roztwór miareczkowany wartości pH 14. Następnie biuretę umyć i prowadzić miareczkowanie (tego samego roztworu) wodnym roztworem 0,5 M HCl i zanotować zmiany barwy i wartości pH. Podać wnioski wynikające z przeprowadzonej analizy.

13.3. Izolacja i identyfikacja antocyjanów zawartych w czerwonych owocach

Tabela 1. Budowa najpopularniejszych antocyjanidyn

Antocyjanidyna	Podstawnik R	Podstawnik R'
cyjanidyna	OH	H
delfinidyna	OH	OH
malwidyna	OCH ₃	OCH ₃
pelargonidyna	H	H
peonidyna	OCH ₃	H
petunidyna	OCH ₃	OH



Celem ćwiczenia jest izolacja oraz identyfikacja antocyjanów zawartych w czerwonych owocach.

Odczynniki:

Owoce - 5 rodzajów po 10g z każdego
 czerwone jabłka (skórka)
 porzeczka / jagoda
 żurawina
 truskawki

(owoce mogą być mrożone)

woda dest.

metanol

HCl stężony

kwas mrówkowy

Aparatura i szkło:

zlewki poj. 100 mL

płytki TLC

probówki

bagietka

Część A Maceracja owoców

Macerację surowca roślinnego – czerwonych owoców (5-10 g z każdego rodzaju) w celu wyizolowania antocyjanin należy przeprowadzić z zastosowaniem mieszaniny metanol-HCl (99:1, v/v) w czasie 0,5-1 godziny mieszając od czasu do czasu bagietką. Następnie przesączyć i zatężyć przesącz pod zmniejszonym ciśnieniem do możliwie niewielkiej objętości.

Na tym etapie pobiera się niewielką ilość otrzymanych antocyjanin w celu wykonania analizy TLC, a na pozostałych porcjach przeprowadza się hydrolizę opisaną w części B.

Analiza TLC antocyjanin

Wykonać analizę TLC antocyjanin wyizolowanych z poszczególnych owoców. W tym celu należy uszykować mieszaninę rozpuszczalników stanowiących fazę ruchomą – stężony HCl-kwas mrówkowy-woda (19:39,6:41,4; v/v/v). Przygotować płytki szklane o wymiarach 20x5 cm (płytki o tych wymiarach rozwija się ponad 2 godziny, jednak daje dobry rozdział) lub plastikowe o wymiarach 7,5x4 cm pokryte celulozą (płytki będą się rozwijały około 20 minut, dając gorszy rozdział). Przykładowy wygląd uzyskanych płytek przedstawiono na rysunku na str. 114 a wartości R_f zestawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Chromatografia TLC i wartości R_f głównych antocyjanin zawartych w owocach

Surowiec	Obserwowana ilość plamek	Wartość R_f
czerwona skórka jabłka	1	0,47
borówka	3	0,32; 0,47; 0,60
truskawki	2	0,44; 0,60
żurawina	2	0,49; 0,62

Na płytce poszczególne antocyjaniny zabarwiają się na inny kolor. Pelargonidyna pojawia się postaci różowej, pomarańczowo-czerwonej lub szkarłatnej plamki, natomiast cyjanidyna w kolorze karmazynowym lub purpurowym, a delfinidyna niebieska lub karmazynowa.

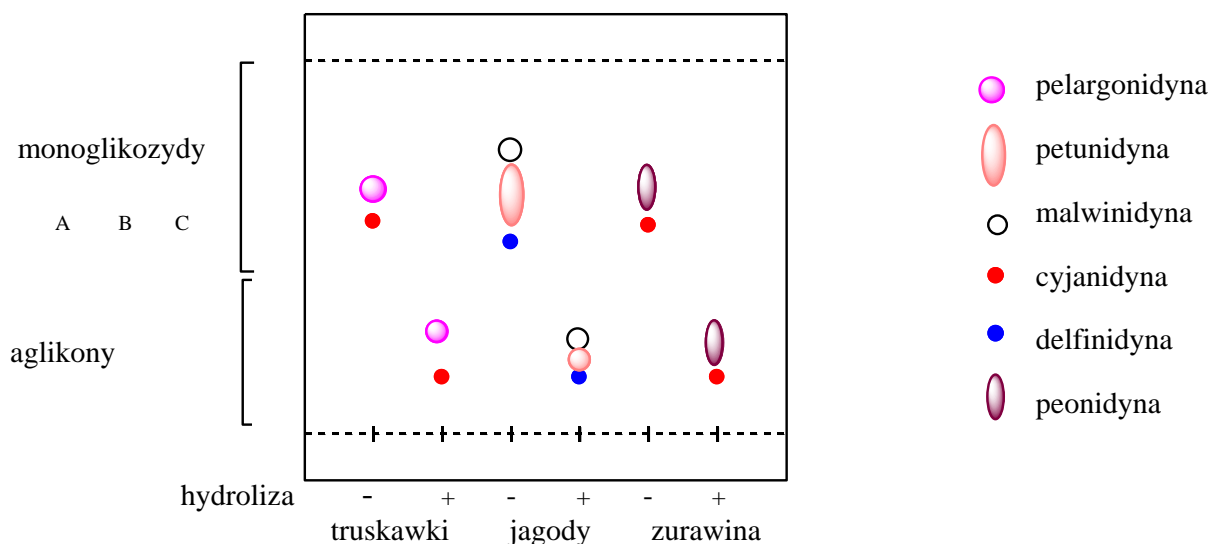
Część B Hydroliza antocyjanin – uzyskanie antocyjanidyn

Antocyjany występują naturalnie w formie glikozydów, która zawiera związane kowalencyjnie węglowodany, najczęściej monosacharydy (glukoza, galaktoza, ksyloza lub arabinoza). W wyniku hydrolizy kwasowej zostają uwolnione aglikony zwane antocyjanidynami. Aglikony (antocyjanidyny bez jednostek węglowodanowych) są mniej polarne niż antocyjaniny toteż w trakcie hydrolizy podczas analizy TLC będą migrowały znacznie wolniej. Hydrolizę prowadzi się w probówkach przez zmieszanie 1 mL wyekstrahowanych barwników antocyjanowych (dla każdego barwnika osobna probówka) z 1 mL kwasu solnego o stężeniu 4 mol/dm^3 w łaźni wodnej w temperaturze około 80 °C. Probówki należy zakorkować np. gilzą aby zapobiec wydostawaniu się par. Tę część prac laboratoryjnych należy prowadzić pod wyciągiem. Hydrolizę prowadzić przez co najmniej 0.5 godziny do 1 godziny (często kompletna hydroliza zachodzi dopiero po kilku godzinach). Stopień hydrolizy można sprawdzić już po 20 minutach od zapoczątkowania reakcji w

podanych warunkach, stosując taką samą płytkę TLC oraz roztwór eluujący. Kolejną analizę TLC wykonać po 40 minutach, ale z zastosowaniem eluenta: stężony HCl-kwas mrówkowy-woda (7,1:51,4:41,4; v/v/v), daje on lepszy rozdział, gdyż aglikony są mniej polarne. Zupełna hydroliza najczęściej zajmuje kilka godzin. Następnie próbówki delikatnie ochłodzić i wykonać ponownie analizę TLC. Stopień zhydrolizowania antocyjanów z czerwonej skórki jabłka przedstawia poniższy chromatogram.



Chromatogram: A) niezhydrolizowane; B) częściowo zhydrolizowane (30 minut, 80 °C); C) zupełnie zhydrolizowane (60 minut, 80 °C) antocyjaniny z czerwonej skórki jabłka.



ozn. – przed hydrolizacją; ozn. + po hydrolizie

Na podstawie analizy płytki TLC wykonanej w trakcie i po hydrolizie (część B) można zaobserwować dla truskawek dwie plamki, przy czym przed hydrolizacją odpowiadają one glikozydom pelargonidyny i cyjanidyny, a po hydrolizie samym aglikonom – antocyjanidynom.

Tabela 3. Identyfikacja rodzajów antocyjanin (antocyjanidyny+jednostki cukrowe) zawartych w ekstraktach z badanych owoców po hydrolizie

surowiec	Antocyjaniny	Forma sacharydowa
czerwona skórka jabłka	cyjanidyna	monoglikozyd
	malwinidyna	monoglikozyd
borówka	petunidyna	monoglikozyd
	delfinidyna	monoglikozyd
żurawina	cyjanidyna	monoglikozyd
	peonidyna	monoglikozyd
truskawki	pelargonidyna	monoglikozyd
	cyjanidyna	monoglikozyd

Płytkę TLC otrzymaną po hydrolizie antocyjanin należy porównać z płytką TLC wykonaną w pierwszym etapie (przed hydrolizą) i na tej podstawie określić w których przypadkach zaszła kompletna hydroliza (pojawienie się plamek o niższym R_f nieobecnych w pierwszym etapie).

Zagadnienia

- Metody wyodrębniania składników z surowca roślinnego
- Antocyjany (właściwości, reaktywność)
- Analiza TLC

14. Literatura

- Matławska I., Bylka W., Gawron-Gzella A., Sikorska M., Szafer-Hajdrych M., Wójcińska M., Dudek-Makuch M., Witkowska-Banaszak E., „Farmakognozja”, Wydawnictwo Naukowe Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2006.
- Praca zbiorowa pod redakcją Stefana Malepszego, „Biotechnologia roślin”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001.
- Jerzmanowska Z., „Substancje roślinne – metody wyodrębniania”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1967.
- Glover, B., “Understanding Flowers and Flowering”, Oxford University Press, 2007.
- Wrzeciono W., Zaprutko L., „Chemia związków naturalnych”, Wydawnictwa Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2001.
- Kołodziejczyk A., „Naturalne związki organiczne”, wyd. 3, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2013.
- Molski M., „Chemia piękna”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2009.
- Vogel A. I., „Preparatyka organiczna”, wyd. 3, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2006.
- Kączkowski J., „Podstawy biochemii”, wyd. 14, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2004.
- Lewak S., Kopcewicz J., „Fizjologia roślin. Wprowadzenie”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2009.
- Klimek R., „Olejki eteryczne”, Wydawnictwo Przemysłu Lekkiego i Spożywczego, Warszawa 1957.
- Nowak K., Rutkowski K., Suryło P., Mitka K., Kowalski P., Kowalska T., „Laboratorium chemii organicznej, techniki pracy i przepisy bhp”, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2004.
- Brud W. S., Konopacka-Brud I., „Podstawy perfumerii. Historia, pochodzenie i zastosowania substancji zapachowych”, Oficyna Wydawnicza MA Łódź 2009.
- Berger S., Sicker D., “Classics in Spectroscopy. Isolation and structure elucidation of natural products”, Wiley-VCH, 2009, 65-82.
- Dewick P. M., “Medicinal Natural Products: a Biosynthetic approach”, Wiley, 2nd ed., 2002, 291-398.
- Bhat S. V., Nagsampagi B. A., Sivakumar M., “Chemistry of Natural Products”, Springer, 2005, 237-315.
- Sołoducho J., Idzik K., „Chemia Produktów Naturalnych”, Politechnika Wrocławska 2004.
- Penniston K. L., Nakada S. Y., Holmes R. P., Assimos D. G. "[Quantitative Assessment of Citric Acid in Lemon Juice, Lime Juice, and Commercially-Available Fruit Juice Products](#)". *J. Endourol.* 22 (2008) 567.
- Lucas J. M., Kaneko J. J., Hirohara Katsuni, Kleiber Max, “Separation of Milk Components, Chromatographic Isolation of Citric Acid and Lactose from Skim Milk”. *J. Agric. Food Chem.*, 7 (1959), 638.
- Wohlk, *Zeitschr. F. Anal. Ch.* (1904) 670. „Odczynnik na cukier mleczny i maltozę”.
- Chemik Polski, nr 21, 24 (11) maja 1905r (V), 408.
- <http://cnx.org/content/m15591/latest/> (ekstrakcja karwonu).
- http://www.chemistry.mcmaster.ca/~chem2ob3/nhw_temp/old_old_labmanual/expt5/2ob3_exp5.html (laktoza).
- <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/ekstrakcja>
- http://pl.wikipedia.org/wiki/Plik:Soxhlet_mechanism.gif

- Bartkowiak A., Brylak W., „Hydrożelowe mikrokapsułki z udziałem naturalnych i chemicznie modyfikowanych chitozanów – właściwości mechaniczne i porowate”, *POLIMERY*, 51 (2006) 547.
- Wolski T., Hołderna-Kędzia E., Ludwiczuk A., „Ocena składu chemicznego oraz aktywności przeciwdrobnoustrojowej olejków eterycznych i preparatów galenowych otrzymywanych z liści rozmarynu i szalwii lekarskiej”, *Postępy Fitoterapii*, nr 4 (2001), 6-11.
- <http://www.kosmetyki-naturalne.biz/p/pl/133/olejek+imbirowy.html>
- Glinka R. *Receptura kosmetyczna*, wyd. I, Oficyna Wydawnicza MA Łódź 2003.
- Bagińska D.: Cudowny imbir, http://www.poradnikzdrowie.pl/zywienie/zasady-zywienia/cudowny-imbir-wlasciwosci-lecznicze-i-odchudzajace-imbiru_33621.html
- Nartowska J., „Imbir lekarski”, *Panacea* Nr 3 (24) (2008) 6-8.
- Clarke, R. J. “The Flavour of Coffee”. *Dev. Food Science*, 3B (1986) 1-47.
- <http://www.coffeeresearch.org/science/sourmain.htm>
- Forster M., *J. Chem. Educ.*, 55 (1978) 107-108.
- Mebane R.C., Rybolt T.R., *J. Chem. Educ.*, 62 (1985) 285-287.
- Curtright R.D., Rynearson J.A., Markwell J., *J. Chem. Educ.*, 71 (1994) 682.
- Curtright R.D., Rynearson J.A., Markwell J., *J. Chem. Educ.*, 73 (1996) 306.
- **Widma:**
SDBSWeb : <http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 22.10.2011)
<http://www.sigmaaldrich.com>
<http://webbook.nist.gov> (NIST Chemistry WebBook, 08.02.2016)