

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE

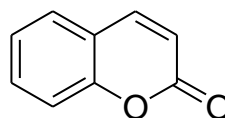
Chimica Organica- Laboratorio

Esercitazione n°1

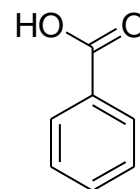
SEPARAZIONE DI SOSTANZE ORGANICHE IN MISCELA

Scopo dell'esperienza:

Separazione di una miscela a due componenti
per estrazione liquido-liquido e analisi
cromatografica dell'efficienza di estrazione.



cumarina



acido benzoico

TEORIA

Estrazione liquido-liquido

L'**estrazione liquido-liquido** è un'importante tecnica di **separazione** e **purificazione** in chimica organica. Questa tecnica sfrutta la differente **solubilità** di una sostanza tra due **solventi immiscibili**. Si effettua dibattendo un **solvente organico** insolubile in acqua (ad es. l'etere etilico, l'acetato di etile o il diclorometano) con **acqua** o una **soluzione acquosa**. L'agitazione mescola temporaneamente i due liquidi immiscibili e permette il **trasferimento selettivo dei soluti**. Successivamente i due liquidi immiscibili si separeranno formando due **fasi**, che saranno raccolte separatamente. Il liquido organico, contenente le sostanze estratte, viene poi allontanato per distillazione. Molte sostanze sono solubili in entrambi i solventi ed esse si distribuiscono tra le due fasi in modo tale che la loro concentrazione in ciascun solvente sia direttamente proporzionale alla solubilità in quel solvente:

$$\frac{C_O}{C_W} = K \frac{S_O}{S_W}$$

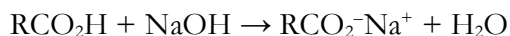
Dove: C_O è la concentrazione della sostanza nella fase organica, C_w è la concentrazione della sostanza nella fase acquosa, S_O è la solubilità della sostanza nel solvente organico, S_w è la solubilità della sostanza nel solvente acquoso.

Il rapporto C_O/C_W è noto come **coefficiente di distribuzione o di ripartizione** (K). Il coefficiente per due liquidi per una data sostanza è costante ad una data temperatura. Esso può assumere diversi valori, a seconda della sostanza e dei solventi utilizzati. Se $K > 100$ tutta la sostanza è disciolta nella fase organica e questo significa che basta una sola estrazione per trasferire tutta la sostanza dalla fase acquosa alla fase organica. D'altra parte, se $K < 0,01$, tutta la sostanza sarà disciolta nella fase acquosa. Poiché K assume valori compresi tra 0,1 e 10, occorrono diverse estrazioni per un completo trasferimento.

È possibile in alcuni casi realizzare l'estrazione utilizzando delle reazioni chimiche facilmente invertibili, come le reazioni acido-base. I composti organici neutri sono generalmente più solubili in solvente organico che in H_2O . I sali sono generalmente più solubili in H_2O che in solvente organico. Nel caso di acidi e basi organiche invece la solubilità dei composti nel solvente organico e nell' H_2O dipende dal pH della soluzione acquosa.

Una soluzione acquosa diluita di acido può essere usata per separare per estrazione i composti basici dalle sostanze neutre o acide. Una soluzione acquosa diluita di base, al contrario, può essere usata per separare per estrazione i composti acidi dalle sostanze neutre o basiche.

Per esempio, l'idrossido di sodio diluito trasforma gli acidi organici nei corrispondenti sali di sodio:



Se un particolare acido non è solubile in acqua, il suo sale di sodio, più polare, generalmente lo è.

Quando, in un solvente organico, una miscela di un composto neutro e di un composto acido insolubile in acqua viene trattata sotto agitazione con una soluzione diluita di idrossido di sodio, si ottiene il sale di sodio del composto acido, che è solubile nella fase acquosa, mentre il composto neutro rimane nella fase organica. Una volta separate le due fasi è possibile recuperare l'acido di partenza acidificando la fase acquosa con un acido forte e riestraendola con il solvente organico.

Cromatografia su strato sottile

La cromatografia è una tecnica utile nella separazione e analisi di composti puri o in miscela, basata sulla distribuzione differenziale delle sostanze attraverso due fasi: la fase stazionaria e la fase mobile. Tra le possibili applicazioni, oltre alla purificazione di sostanze organiche a partire da miscele complesse, l'utilizzo per l'identificazione di composti mediante confronto con degli standard noti.

Nella cromatografia su strato sottile (TLC: *thin layer chromatography*) la fase stazionaria consiste in una superficie inerte di vetro o alluminio (lastra) ricoperta di uno strato di fase solida (silice nell'esperienza in questione). La miscela campione è applicata alla base della lastrina che, a sua volta, è posta in un bagno

di solvente (fase mobile liquida) in una camera chiusa. Il liquido risale lentamente lungo la lastrina provocando una separazione cromatografica ascendente. Quando l'eluente si avvicina alla sommità della lastra, questa è rimossa dalla camera e lasciata asciugare. Si procede quindi alla lettura della separazione cromatografica mediante sistemi (chimici o fisici) di rilevamento e al calcolo del fattore di ritenzione (R_f). Questo parametro (R_f), dato dal rapporto della distanza percorsa dall'analita con la distanza percorsa dal solvente, è caratteristico di ogni singolo composto organico in un determinato sistema cromatografico.

MATERIALE OCCORRENTE	
Da prelevare dal cassetto del laboratorio:	
1 imbuto separatore	2 beute da 100 mL
2 cilindri graduati da 10 mL	3 beute da 50 mL
1 cilindro graduato da 50 mL	2 beute da 25 mL
1 imbuto di vetro	Navicella per pesata in polietilene
1 bottiglia a spruzzetta in polietilene	1 camera cromatografica
Occhiali di protezione	Guanti
Occhiali di protezione UV	
Consegnato dal docente nel corso dell'esperienza:	
Cartina indicatrice	Capillari per cromatografia
Lastre cromatografiche di gel di silice	Carta da filtro
Spatole	Pipette Pasteur
Da prelevare nel corso dell'esperienza su indicazione del docente:	
Cumarina	Diclorometano
Acido benzoico	Esano
NaOH	Acetato di etile (AcOEt)
HCl 5M	Solfato di sodio anidro
A carico dello studente:	
1 matita	1 righello



Imbuto separatore



Beuta



Cilindro graduato



*Camera e lastra
cromatografica*

STRUMENTI ED APPARECCHI UTILIZZATI

Bilancia analitica
Bilancia tecnica
Lampada UV
Sostegno metallico \varnothing 13 mm
Morsetto
Supporto ad anello per imbuto separatore

NORME DI SICUREZZA

Le norme di sicurezza saranno illustrate a lezione dal docente.

Le schede di sicurezza sono riportate in appendice.

Per qualsiasi dubbio sarà necessario rivolgersi al docente o ai tutor.

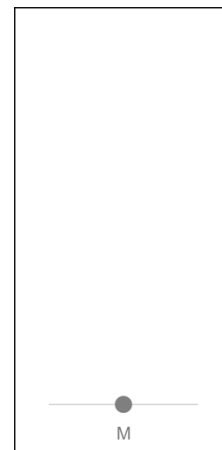
ESECUZIONE

A) Operazioni preliminari

A1) Preparazione della miscela di acido benzoico e cumarina

- Pesare, separatamente, 100 mg di acido benzoico e 100 mg di cumarina e unirli in una beuta da 50 mL. I due composti vanno pesati su bilancia analitica con l'ausilio di una navicella per pesata, prelevandoli con le spatole fornite dai tutor. Registrare i pesi reali, poiché saranno necessari per calcolare la resa dell'estrazione.

- Solubilizzare la miscela dei due composti con 10 mL di diclorometano. Questa operazione va effettuata sotto cappa, misurando i 10 mL con un cilindro graduato del volume appropriato. Il solvente va aggiunto alla beuta contenente la miscela. Se necessario, agitare la beuta per favorire la solubilizzazione dei composti.
- Prima di procedere con il passaggio successivo, prelevare una piccola quantità di soluzione e applicarlo su una lastra cromatografica. Sulla lastra va innanzitutto tracciata finemente una riga a matita a circa 1,0 cm dall'estremità inferiore (e dai lati) e poi segnati tre punti equidistanti tra loro (che corrisponderanno ai punti in cui si applicheranno i campioni). Sul punto centrale, va applicata la soluzione della miscela con l'ausilio di un capillare per cromatografia. Siglare il punto con una M (=miscela). Questa lastra sarà poi utilizzata per le operazioni descritte in **D**.



A2) Preparazione di una soluzione di NaOH 2M

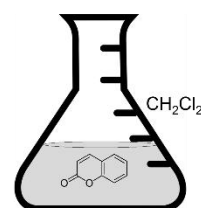
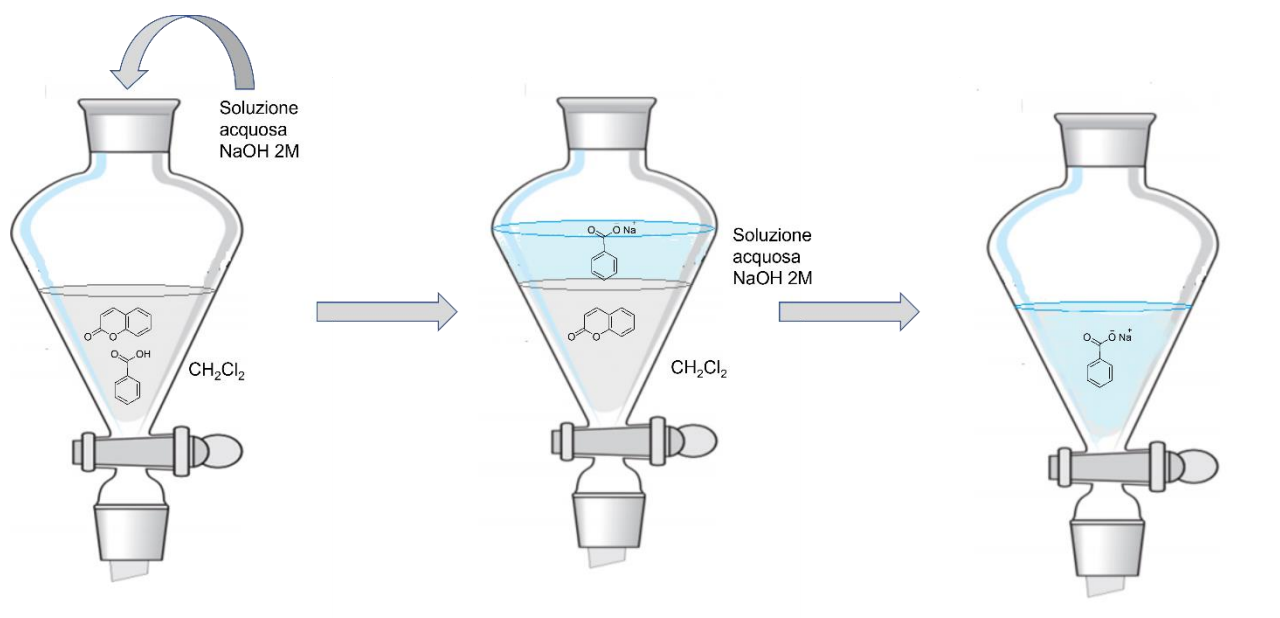
- Pesare, in una beuta da 50 mL, la quantità di NaOH necessaria per preparare una soluzione circa 2M ($V=15$ mL). Tale quantità andrà pesata su bilancia tecnica e dovrà essere preventivamente calcolata, tenendo conto che $M = n/V$, dove n è il numero di moli e V è il volume espresso in L.
- Aggiungere la quantità di acqua necessaria e favorire la solubilizzazione dell'idrossido di sodio agitando la beuta e facendo molta attenzione a non versare il contenuto. NaOH è corrosivo, per cui sarà necessario indossare i guanti e gli occhiali di protezione. NB: per preparare soluzioni a titolo noto andrebbe usato un matraccio, ma in questo caso non è necessario quel grado di accuratezza.

B) Separazione dell'acido benzoico dalla cumarina

Entrambi i componenti della miscela (cumarina e acido benzoico) sono solubili in diclorometano. Quindi, il loro coefficiente di ripartizione tra acqua e diclorometano è a favore di quest'ultimo. Mentre la cumarina non presenta gruppi ionizzabili, l'acido benzoico ha un gruppo carbossilico ed è quindi acido ($pK_a=4,20$). Di conseguenza, per poterli separare, sarà possibile sfruttare una reazione acido-base. Infatti, per la separazione, utilizzeremo la soluzione di idrossido di sodio preparata in A2.

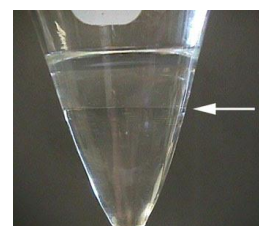
In tal modo, avremo la formazione del benzoato di sodio (cioè il sale di sodio dell'acido benzoico), che ha un coefficiente di ripartizione a favore dell'acqua. Quindi, a seguito di questa separazione, otterremo

due fasi: una (quella organica) che conterrà la cumarina e un'altra (quella acquosa) che conterrà il benzoato di sodio.



Procedimento:

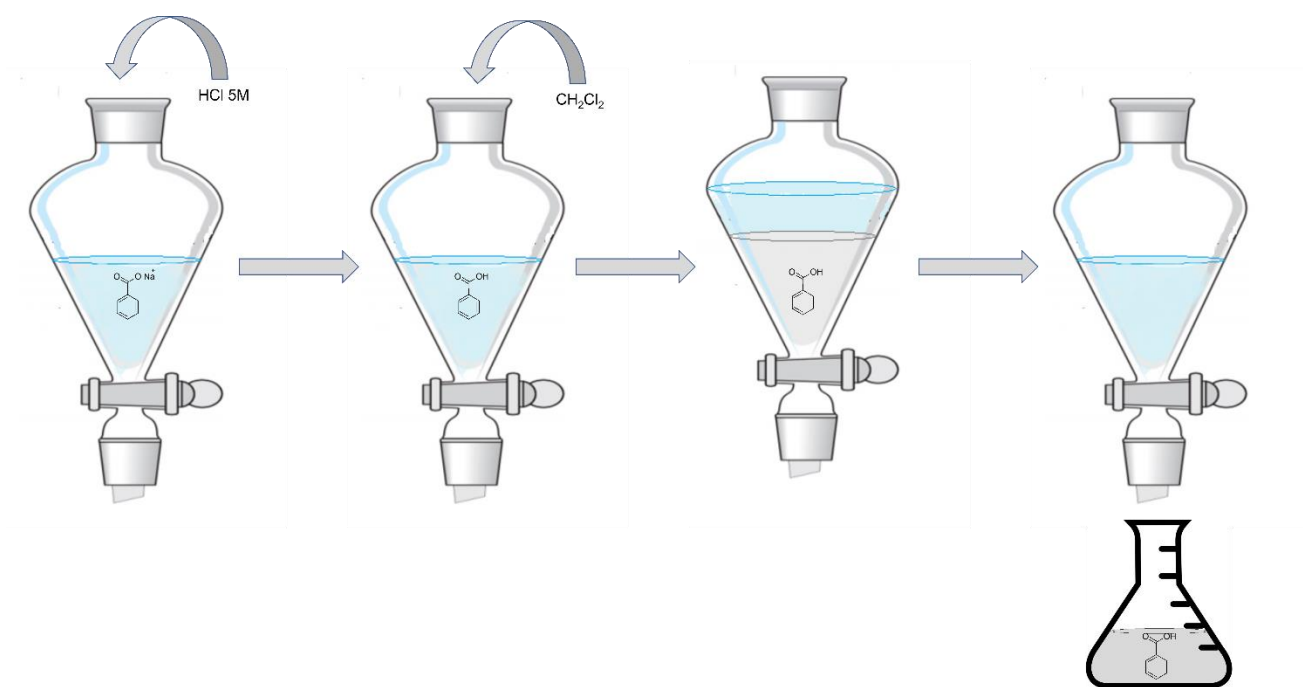
- Versare la soluzione di acido benzoico e cumarina in diclorometano (preparata come descritto in **A1**) in un imbuto separatore.
- Sciacquare il contenitore della miscela con 5 mL di diclorometano, che andranno versati nell'imbuto separatore.
- Per estrarre il componente acido dalla miscela, dibattere la soluzione in diclorometano con 15 mL della soluzione di NaOH preparata in **A2**.
- Aspettare che le due fasi siano ben separate e versare la fase inferiore (fase in diclorometano) attraverso il rubinetto. NB: il diclorometano si stratifica nella parte inferiore dell'imbuto separatore, poiché ha una densità maggiore rispetto all'acqua.



- La fase acquosa (che resta nell'imbuto separatore) viene riestratta con altri 10 mL di diclorometano, semplicemente aggiungendo questa quantità di solvente e dibattendo di nuovo la soluzione.
- Dopo che le fasi si sono separate per bene, aggiungere la fase inferiore nella beuta contenente la fase organica della prima estrazione.
- Nella soluzione in diclorometano (che ora dovrebbe contenere solo la cumarina) si aggiunge tanto solfato di sodio anidro da coprire il fondo della beuta e si lascia riposare per 5 minuti agitando di tanto in tanto la beuta con un movimento rotatorio. In questo modo si allontanano le tracce di acqua residua dalla soluzione.
- Filtrare la soluzione in una beuta da 50 mL precedentemente tarata, utilizzando l'imbuto pulito e asciutto e un filtro a pieghe. Etichettare opportunamente la beuta.

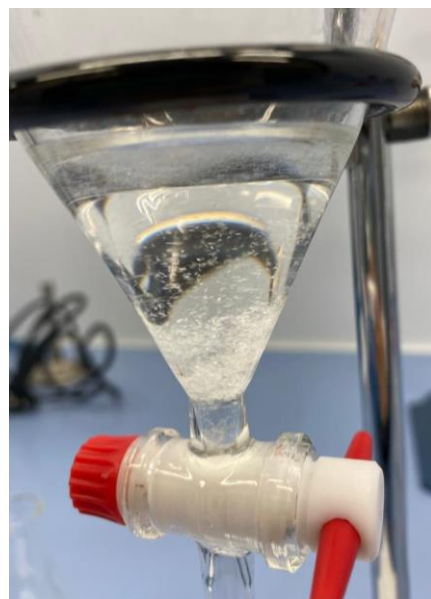
C) Estrazione dell'acido benzoico dalla fase acquosa

Per poter allontanare l'acido benzoico dalla soluzione di idrossido di sodio, è possibile ancora una volta sfruttare le sue proprietà acido-base. Acidificando la soluzione e ponendoci a valori di $\text{pH} < \text{pK}_a$, l'acido benzoico sarà presente in soluzione nella sua forma acida (protonata), che avrà di nuovo un coefficiente di ripartizione a favore del diclorometano. Quindi, dibattendo la fase acquosa col solvente organico, sarà possibile estrarre l'acido benzoico.



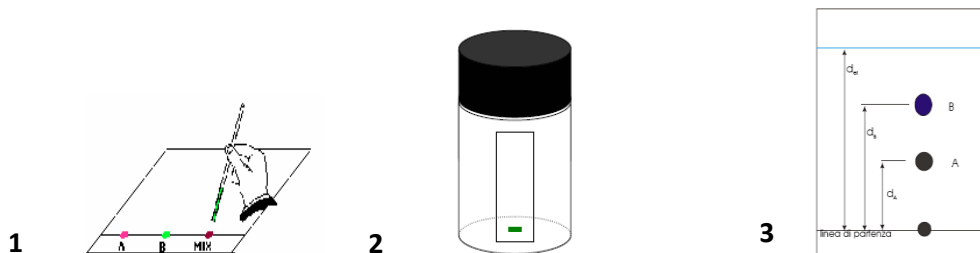
Procedimento:

- Acidificare l'estratto alcalino (fase acquosa) aggiungendo, poco alla volta, dell'acido cloridrico 5M con l'ausilio di una pipetta Pasteur fino al punto in cui si osserva la formazione di un precipitato come mostrato in figura (l'acido benzoico è poco solubile in acqua).
- Controllare che la soluzione sia acida con l'ausilio di una cartina indicatrice.
- Aggiungere 15 mL di diclorometano e dibattere la soluzione.
- Aspettare che le due fasi siano ben separate e versare la fase inferiore (fase in diclorometano) attraverso il rubinetto.
- Nella soluzione in diclorometano (che ora dovrebbe contenere l'acido benzoico) si aggiunge tanto solfato di sodio anidro da coprire il fondo della beuta e si lascia riposare per 5 minuti agitando di tanto in tanto la beuta con un movimento rotatorio.
- Filtrare la soluzione in una beuta da 25 mL, utilizzando l'imbuto pulito e asciutto e un filtro a pieghe. Etichettare opportunamente la beuta.

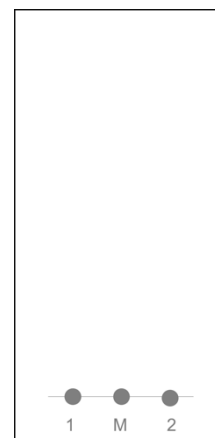


D) Analisi della efficienza di separazione mediante TLC

- Preparare 10 mL del sistema eluente acetato di etile/esano 2:8 utilizzando un cilindro da 10 mL e aggiungendo i volumi appropriati dei due solventi.
- Versare il sistema eluente in una camera cromatografica. Dopo averla chiusa accuratamente, lasciare che essa si ambienta.



- Applicare le due fasi in diclorometano sottoforma di piccoli punti a destra e a sinistra della miscela precedentemente caricata (**A1**) con l'ausilio di un capillare per cromatografia (**1**). Siglare i due punti.
- Porre in eluizione la lastra (**2**). Quando il solvente avrà raggiunto una distanza di circa 1.0 cm dal bordo superiore della lastra estrarre, asciugare ed esaminare in luce UV: cerchiare a matita le bande osservate e calcolare i valori di R_f dei vari componenti (**3**). NB: nell'osservare la lastra alla luce UV, sarà necessario indossare gli opportuni occhiali di protezione.
- Valutare l'efficienza di separazione.




E) Calcolo della resa

Consegnare le beute contenenti le due fasi in diclorometano, opportunamente etichettate, al docente o ai tutor, che provvederanno ad allontanare il solvente. Nel corso dell'esperienza di laboratorio successiva, sarà possibile pesare i campioni e valutare la resa dell'estrazione.


Appendice: Schede di sicurezza

ACETATO DI ETILE - Elementi dell'etichetta*

Pittogramma	
Avvertenza	Pericolo
Indicazioni di pericolo	H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili. H319 Provoca grave irritazione oculare. H336 Può provocare sonnolenza o vertigini.
Consigli di prudenza	P210 Tenere lontano da fonti di calore/scintille/fiamme libere/superfici riscaldate. - Non fumare. P261 Evitare di respirare la polvere/ i fumi/ i gas/ la nebbia/ i vapori/ gli aerosol. P305 + P351 + P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare
Descrizioni supplementari del rischio	EUH066 L'esposizione ripetuta può provocare secchezza o screpolature della pelle.


*Etichettatura secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008

ESANO - Elementi dell'etichetta*

Pittogramma	
Avvertenza	Pericolo
Indicazioni di pericolo	H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili. H304 Può essere letale in caso di ingestione e di penetrazione nelle vie respiratorie. H315 Provoca irritazione cutanea. H336 Può provocare sonnolenza o vertigini. H361f Sospettato di nuocere alla fertilità. H373 Può provocare danni agli organi in caso di esposizione prolungata o ripetuta. H411 Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
Consigli di prudenza	P201 Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso. P210 Tenere lontano da fonti di calore, superfici riscaldate, scintille, fiamme e altre fonti di innesco. Vietato fumare. P273 Non disperdere nell'ambiente. P301 + P310 in caso di ingestione: contattare Immediatamente un centro antiveneni o un medico P308 + P313 in caso di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico. P331 NON provocare il vomito.
Descrizioni supplementari del rischio	nessuna


*Etichettatura secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008

CUMARINA - Elementi dell'etichetta*

Pittogramma	
Avvertenza	Pericolo
Indicazioni di pericolo	H301 Tossico se ingerito.
Consigli di prudenza	P301 + P310 in caso di ingestione: contattare immediatamente un centro antiveneni o un medico
Descrizioni supplementari del rischio	nessuna

*Etichettatura secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008

ACIDO BENZOICO - Elementi dell'etichetta*

Pittogramma	
Avvertenza	Pericolo
Indicazioni di pericolo	H315 Provoca irritazione cutanea. H318 Provoca gravi lesioni oculari. H372 Provoca danni agli organi (Polmoni) in caso di esposizione prolungata o ripetuta se inalato.
Consigli di prudenza	P280 Proteggere gli occhi/ il viso. P305 + P351 + P338 + P310 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. P314 In caso di malessere, consultare un medico.
Descrizioni supplementari del rischio	nessuna

*Etichettatura secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008