

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

**«МИРЭА – Российский технологический университет»**

# РТУ МИРЭА

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ**

**по дисциплине «Химия биологически активных веществ»**

## 19.03.01 «Биотехнология»

**Квалификация выпускника - бакалавр**

Москва 2021

СОДЕРЖАНИЕ

1. Правила работы в лаборатории органической химии и в микробиологической лаборатории 8
	1. Особенности работы с взрывоопасными, легковоспламеняющимися и токсичными веществами 10
	2. Правила работы под уменьшенным давлением 13
	3. Правила работы с электроприборами 14
	4. Действия при возникновении пожара 14
	5. Оказание первой помощи при ожогах и других несчастных случаях

|  |  |
| --- | --- |
|   | 15  |
| 1.6. Правила работы в микробиологической лаборатории  | 16  |
| 1.7. Контрольные вопросы по теме «Правила работы в лаборатории»  | 19  |
| 2. Очистка жидких веществ. Перегонка  | 20  |
| 2.1. Общие положения  | 20  |
| 2.2. Перегонка при атмосферном давлении  | 22  |
| 2.3. Перегонка при пониженном давлении (вакуумная перегонка)  | 25  |
| 2.4. Удаление растворителя с помощью роторного испарителя  |   | 28  |
| 2.5. Контрольные вопросы по теме «Перегонка»  |   |   |   | 30  |
| 3. Экстракция  |   |   |   | 32  |
| 3.1. Основы процесса экстракции  |   |   |   | 32  |
| 3.2. Экстракция в системе «жидкость-жидкость»  |   |   |   | 32  |
|  3.2.1. Простая экстракция  |   |   |   | 32  |
|  3.2.2. Непрерывная экстракция  |   |   |   | 34  |
| 3.3. Экстракция твердых веществ  |   |   |   | 35  |
|  3.3.1. Простая экстракция  |   |   |   | 35  |
|  3.3.2. Непрерывная экстракция  |   |   |   | 36  |
| 3.4. Высушивание органических растворов  |   |   |   | 36  |
| 3.5. Контрольные вопросы по теме «Экстракция»  |   |   |   | 38  |
| 4. Кристаллизация  |   |   |   | 38  |
| 4.1. Общие принципы  |   |   |   | 38  |
| 4.2. Выбор растворителя для кристаллизации  |   |   |   | 40  |
|  4.2.1.Общие закономерности  |   |   |   | 40 |
|  4.2.2. Пробные кристаллизации  |   |   |   | 42 |
| 4.3. Проведение кристаллизации  |   |   |   | 43  |
|  4.3.1 Растворение твердого вещества  |   |   |   | 43  |
|  4.3.2. Образование кристаллов  |   |   |   | 45  |
|  4.3.3. Отделение кристаллов  |   |   |   | 47  |
|  4.3.4. Сушка кристаллов  |   |   |   | 49  |
| 4.4. Определение температуры плавления  |   |   |   | 50  |
| 4.5. Контрольные вопросы по теме «Кристаллизация»  |   |   | 51  |
| Список рекомендуемой литературы  |   |   | 65  |

Проникновение в тайны природы на молекулярном уровне требует глубоких знаний биологии, биохимии, биоорганической химии, химической технологии. Биоорганическая химия изучает строение и биологические функции важнейших компонентов живой материи, в первую очередь биополимеров и биорегуляторов, уделяя главное внимание выяснению закономерностей взаимосвязи между структурой и биологическим действием. Круг интересов биоорганической химии необычайно широк – это и мир веществ, выделяемых из живой природы и играющих важную роль в жизнедеятельности, и мир искусственно получаемых органических соединений, обладающих биологической активностью.

Основные задачи биоорганической химии:

* выделение в индивидуальном состоянии изучаемых соединений с помощью кристаллизации, перегонки, различных видов хроматографии, электрофореза, ультрафильтрации, ультрацентрифугирования и других методов;
* установление структуры, включая пространственное строение, на основе подходов органической и физико-органической химии с применением масс- спектрометрии, различных видов оптической спектроскопии (ИК-, УФ-, лазерной и др.), рентгеноструктурного анализа, ядерного магнитного резонанса, электронного парамагнитного резонанса, дисперсии оптического вращения, кругового дихроизма и т.п.;
* химический синтез и химическая модификация изучаемых соединений, включая полный синтез, синтез аналогов и производных, - с целью подтверждения структуры, выяснения связи строения и биологической функции, получения практически значимых препаратов;
* биологическое тестирование полученных соединений в условиях *in vitro* и *in vivo.*

В арсенал основных методов исследования входят методы органической химии, однако для решения структурно-функциональных задач привлекаются и различные физические, физико-химические, математические и другие методы.

Данный практикум предназначен для студентов бакалавриата, приступающих к работам в области биоорганической химии, химии природных соединений и их аналогов, для ознакомления с основными подходами к решению задач по выделению, синтезу, очистке таких веществ, определению их строения и свойств с использованием всего комплекса методов органической и биоорганической химии.

## 1. Правила работы в лаборатории органической химии и в микробиологической лаборатории

Независимо от характера выполняемых работ (очистка растворителей, жидких или твердых реагентов, органический синтез, биохимическое исследование, культивирование микроорганизмов) каждый студент, работающий в лаборатории, обязан **строго** соблюдать следующие общие правила:

1. Нельзя работать одному в лаборатории;
2. Необходимо соблюдать чистоту, порядок, тишину, правила техники безопасности;
3. Каждый работающий должен знать, где находятся в лаборатории средства противопожарной защиты: огнетушители, ящик с песком, асбестовое одеяло, аптечка с медикаментами;
4. Недопустимо в лаборатории курить, принимать пищу, пить воду из химической посуды;
5. До начала работы преподаватель проводит подробный инструктаж по технике безопасности. Студент допускается к работе после сдачи экзамена по технике безопасности;
6. Каждый студент должен работать на постоянном месте. Для защиты кожных покровов используют рабочий халат, а если необходимо – перчатки, защитные очки или маску, фартук;
7. На рабочем столе не должно быть посторонних предметов, в том числе портфелей и сумок;
8. Приступая к работе, необходимо заранее изучить свойства используемых и синтезируемых веществ, обсудить с преподавателем план работы и схему прибора;
9. Использовать для работы только чистую химическую посуду. Посуду следует мыть сразу по окончании опыта;
10. Категорически запрещается оставлять действующие приборы без присмотра;
11. Недопустимо выливать **все** использованные реактивы (и органические вещества, и неорганические) в раковину, выбрасывать в мусоропровод и контейнеры для мусора. Сливы необходимо собирать в специальные подписанные емкости;

11. По окончании работы необходимо выключить газ, воду, электроприборы, привести в порядок рабочее место.

### 1.1. Особенности работы с взрывоопасными, легковоспламеняющимися и токсичными веществами

**РАБОТА С ОГНЕ- И ВЗРЫВООПАСНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ**

1. Работа с огне- и взрывоопасными веществами должна проводиться в вытяжном шкафу. Используйте защитные экраны, глаза защищайте очками со стеклами триплекс. Нагревать, хранить, переливать легковоспламеняющиеся вещества нельзя вблизи огня и включенных электроплиток;
2. Нагревать легковоспламеняющиеся жидкости можно в колбах, снабженных водяными холодильниками на предварительно нагретых водяных банях или на специальных колбонагревателях, можно использовать роторные испарители;
3. Нельзя проводить перегонку досуха;
4. Органические растворители (диоксан, диэтиловый эфир, тетрагидрофуран и др.) перед использованием в работе необходимо проверить на содержание в них пероксидов;

**РАБОТА С МЕТАЛЛИЧЕСКИМ НАТРИЕМ**

При работе с металлическим натрием и калием необходимо соблюдать особую осторожность:

1. Не допускать соприкосновения их с водой (произойдет взрыв!) и галогенсодержащими соединениями (хлороформом, бромистым этилом, бромоформом и др.); нельзя использовать натрий для осушивания карбонильных соединений, кислот, спиртов, нитросоединений;
2. Все работы с натрием проводят в защитных очках вдали от открытых водопроводных кранов, водоструйных насосов и других источников воды; 3. Хранить металлический натрий можно в толстостенной стеклянной посуде с корковой пробкой под слоем обезвоженного керосина, инертного высококипящего углеводорода или трансформаторного масла. Банки с натрием помещают в специальные ящики, хранение в которых полностью исключает контакт с водой;

4. Берут металлический натрий только сухим пинцетом, помещают на сухую фильтровальную бумагу, очищают скальпелем, а затем вводят в реакцию. Обрезки натрия, фильтровальную бумагу, посуду, в которой проводили опыты с натрием, заливают этиловым спиртом.

**РАБОТА С ТОКСИЧНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ**

К токсичным веществам относятся сильно ядовитые вещества (диметилсульфат, цианиды калия и натрия, фосген, галогенпроизводные фосфора и др.), а также вещества, способные вызвать раздражение и ожоги кожи и глаз (фенолы, галогенонитросоединения, бром, непредельные карбонильные соединения, алифатические галогенокислоты, гидразины и др.) 1. Работать с токсичными веществами следует в вытяжном шкафу под контролем преподавателя;

2. Обязательно защищайте руки перчатками, а глаза – очками.

**РАБОТА С КИСЛОТАМИ И ЩЕЛОЧАМИ**

1. Все работы с сильными кислотами и щелочами надо проводить в защитных очках и резиновых перчатках;
2. Разбавлять серную кислоту можно только в жаростойкой посуде, приливая кислоту к воде, а не наоборот, так как происходит выделение теплоты и разбрызгивание.
3. Растворять гидроксиды натрия и калия в воде следует медленным прибавлением их к воде. Твердую щелочь надо брать только шпателем;
4. Нельзя выливать в раковины остатки кислот и щелочей. Их сливают в специальные подписанные склянки.

**РАБОТА С МЕТАЛЛИЧЕСКОЙ РТУТЬЮ**

1. Все приборы, содержащие ртуть, должны быть помещены на подносы;
2. Запрещается держать ртуть в открытых приборах;
3. Отходы ртути собираются в специальные толстостенные банки, закрытые пробкой;
4. Разлитую ртуть собирают механически, а затем поверхность заливают концентрированным раствором хлорного железа или засыпают серой. Работу по дегазации ртути проводят в противогазе под контролем преподавателя.

### 1.2. Правила работы под уменьшенным давлением

1. При работе с любыми стеклянными приборами (установки для перегонки, эксикаторы, колбы Бунзена и др.), находящимися под вакуумом, обязательно надеть защитные очки или маски.
2. Эксикаторы и колбы Бунзена, находящиеся под вакуумом, необходимо поставить в специальный ящик или завернуть в полотенце.
3. Нельзя использовать плоскодонные колбы и посуду из тонкого стекла для работы под вакуумом.

### 1.3. Правила работы с электроприборами

1. Все электроприборы должны быть заземлены.
2. Перед началом эксплуатации электроприбора ознакомьтесь с инструкцией по его эксплуатации и пройдите инструктаж у преподавателя.
3. Перед включением электроприбора убедитесь в целостности **всех** электропроводов и соединений. При обнаружении нарушения изолирующего покрытия проводов обратитесь к преподавателю.

### 1.4. Действия при возникновении пожара

1. Мгновенно поставьте в известность преподавателя и окружающих. Вызовите пожарную охрану (телефон 01).
2. Сразу выключите газ, электроприборы, тягу.
3. Быстро уберите все взрыво- и пожароопасные вещества подальше от зоны огня.
4. Очаг пожара засыпьте песком или закройте войлочным или асбестовым одеялом. Не следует заливать пламя водой, т.к. это приводит к расширению зоны пожара.
5. Если не удается ликвидировать очаг возгорания с помощью песка или одеяла, используйте огнетушитель. Универсальным является порошковый огнетушитель.
6. При загорании на ком-либо одежды нужно быстро накрыть пострадавшего войлочным одеялом. Нельзя пострадавшему бежать! Можно потушить на себе одежду обливанием водой или быстрым перекатыванием по полу.

***1.5. Оказание первой помощи при ожогах и других несчастных случаях***1. При термических ожогах немедленно делают обильные примочки спиртовыми растворами таннина, этиловым спиртом или розовым раствором перманганата калия.

1. При ожогах кислотами необходимо сразу промыть обожженное место большим количеством воды, а затем – 3%-ным раствором питьевой соды.
2. При ожогах щелочами необходимо обильно промыть обожженное место большим количеством проточной воды, а затем ~3%-ным раствором уксусной кислоты и опять большим количеством воды.
3. При попадании кислоты или щелочи в глаз следует сразу же сообщить преподавателю или другому студенту и с их помощью промывать глаз длительное время (3-5 мин) проточной водой, направляя струю прямо в глаз. Затем промыть глаз раствором питьевой соды (при попадании кислот) или борной кислоты (при попадании щелочей). **После этого немедленно обратиться к врачу!**
4. При ожогах фенолом обрабатывают пораженное место спиртом.
5. При ожогах бромом бром быстро смывают спиртом и смазывают пораженное место мазью от ожогов.
6. **После оказания первой помощи пострадавшего необходимо доставить в медпункт.**

### 1.6. Правила работы в микробиологической лаборатории

Работа в микробиологической лаборатории требует строгого соблюдения специальных правил, обеспечивающих, с одной стороны, сохранение чистоты культуры микроорганизмов, а с другой стороны – защиту персонала от патогенных или условно патогенных микроорганизмов. Кроме этого, клетки как сапрофитных, так и патогенных микроорганизмов могут являться аллергенами для некоторых людей.

При работе в микробиологической лаборатории должны соблюдаться следующие правила:

1. Вся работа выполняется в чистом халате. Длинные волосы должны быть подобраны во избежание их попадания в пламя горелки.
2. На посуде, применяющейся для культивирования микроорганизмов (пробирках, колбах, чашках Петри, матрасах), должны быть сделаны надписи, содержащие родовое и видовое название культуры, дату засева, фамилию студента.
3. Пересевы микроорганизмов осуществляют в специальных шкафах – **ламинарах**, снабженных ультрафиолетовыми лампами и ламинарным потоком стерильного воздуха, - **вблизи пламени** горелки.
4. Бактериологические петли, используемые для пересева микроорганизмов с твердых сред, прокаливают в пламени горелки (металлические) или опускают в этиловый спирт и поджигают (стеклянные). Стеклянную посуду и питательные среды предварительной стерилизуют в сушильных шкафах и в автоклавах соответственно.
5. Поверхность стола ламинара дезинфицируют как перед работой, так и после ее окончания, протирая 3%-ным раствором хлорамина, лизола или 70%-ным раствором изопропилового или этилового спирта. Растворы этих спиртов могут применяться и для дезинфекции рук.
6. Подготовка помещения включает влажную уборку и тщательную вентиляцию с последующим облучением ультрафиолетовым светом бактерицидных ламп (от 30 мин до нескольких часов в зависимости от степени загрязненности воздуха). Ультрафиолетовые лучи опасны, поэтому при включенной ультрафиолетовой лампе в помещении находиться нельзя.
7. Все предметы, использованные при работе с живыми культурами, должны быть обеззаражены обжиганием в пламени горелки, дезинфекцией или стерилизацией в автоклаве.
8. Все засеянные пробирки, колбы, чашки и матрасы помещают в термостат для культивирования.
9. В лаборатории строго запрещается курение и прием пищи.
10. Полученные данные должны быть зафиксированы в журнале для лабораторных работ. Записи должны содержать: название работы, дату, название объектов исследования, условия проведения опытов, методы анализов, полученные результаты и выводы из них.
11. В конце занятия каждый студент должен привести в порядок рабочее место.

### 1.7. Контрольные вопросы по теме «Правила работы в лаборатории»

1. С какими веществами необходимо работать в вытяжном шкафу (под тягой)?
2. Как нужно организовать рабочее место для работы с легковоспламеняющимися веществами?
3. С какими веществами металлический натрий реагирует со взрывом?
4. Как поступают с отходами, обрезками металлического натрия?
5. Какие сильно токсичные вещества вы знаете?
6. Как приготовить водные растворы кислот и щелочей из концентрированных кислот и твердых щелочей соответственно?
7. Ваши действия при разливе металлической ртути.
8. Какую посуду можно использовать для работы под вакуумом?
9. Каким основным требованиям должно соответствовать

электрооборудование, чтобы его можно было эксплуатировать?

1. Произошло возгорание органического вещества под тягой. Ваши действия.

## 2. ОЧИСТКА ЖИДКИХ ВЕЩЕСТВ. ПЕРЕГОНКА

### 2.1. Общие положения

Перегонка является наиболее важным и широко используемым методом очистки органических жидкостей и разделения жидких смесей. Этот метод заключается в кипячении и выпаривании жидкости с последующей конденсацией паров в дистиллят. Разделение двух жидкостей с разницей температур кипения 50 - 70°С или более можно осуществить простой перегонкой (разд.2.2), но если эта разница меньше, необходима фракционная перегонка на более сложном приборе. Некоторые жидкости с высокими температурами кипения в процессе перегонки при атмосферном давлении разлагаются.

При снижении давления температура кипения понижается, что позволяет перегонять высококипящие жидкости и масла легко и безопасно. Этот метод называется вакуумной перегонкой (разд. 2.3).

**! *Меры безопасности***. *Так как большинство органических жидкостей легко воспламеняется, перегонять их следует с большой осторожностью. Наибольшую опасность представляют легко летучие вещества (например, эфир с т.кип. 35°С). При перегонке таких соединений нельзя допускать, чтобы их пары контактировали с открытым пламенем, искрящими моторчиками, биметаллическими силовыми регуляторами, источниками инфракрасного излучения или какими-либо другими источниками возгорания. Опасны также пероксиды, образующиеся при контакте с воздухом некоторых соединений, особенно эфиров и углеводородов. Жидкости, содержащие пероксиды, НЕЛЬЗЯ перегонять без предварительного их удаления.*

### 2.2. Перегонка при атмосферном давлении

Прибор для простой перегонки в собранном виде показан на рис.1.

Растворы большого объема обычно перегоняют в круглодонных колбах, а образцы объемом до 100 мл - в грушевидных. Необходимо подобрать колбу такого размера, чтобы в начале перегонки она была заполнена не более чем на две трети. Колбу подсоединяют к холодильнику при помощи простой насадки

(насадки Вюрца). При перегонке жидкостей с высокой температурой кипения полезно обернуть насадку лентой из стекловолокна (или асбестовым шнуром). Термометр для измерения температуры перегонки вставляют в насадку. Для правильного измерения температуры шарик термометра необходимо полностью погрузить в пары чуть ниже уровня бокового отвода.

Выбор типа холодильника в каждом конкретном случае определяется температурой кипения перегоняемой жидкости.



Рис.1. Перегонка при атмосферном давлении

1 - нагревательная баня, 2 - отгонная колба, 3 -насадка Вюрца, 4 - термометр, 5 - холодильник Либиха, 6 - алонж, 7 - приемная колба, 8 - подставка

Простой холодильник Либиха применяется для перегонки жидкостей с температурами кипения выше 50°С, но для перегонки легколетучих жидкостей, например эфира (*т.кип.* 35°С), необходим холодильник с двойной поверхностью охлаждения (холодильник Дэвиса). Вода подается в нижний отвод холодильника и выходит в верхний. При температуре кипения 150°С и выше вполне достаточно воздушного холодильника.

Переходник, соединяющий холодильник с приемной колбой (называемый "алонжем"), должен сообщаться с атмосферой. В противном случае давление в системе может возрасти и разрушить прибор. Если необходимо провести перегонку без доступа влаги, к отводному отверстию на алонже можно при помощи короткого резинового шланга присоединить неплотно набитую хлоркальциевую трубку или использовать специальный алонж. Для равномерного кипения в колбу помещают «кипелки» (кусочки пористого керамического материала).

Для перегонки органических жидкостей перегонную колбу нужно погрузить в какую-либо нагревательную баню или колбонагреватель. Тип бани и природа источника тепла в значительной степени зависят от того, что перегоняется. На водяной бане с электрическим обогревом можно перегонять жидкости с температурой кипения до 80° С. При перегонке эфира или других летучих легковоспламеняющихся жидкостей необходимо, чтобы вблизи не было открытого пламени или другого источника возгорания.

**! *Меры безопасности.***

*Летучие легковоспламеняющиеся жидкости типа диэтилового или петролейного эфира всегда следует перегонять в вытяжном шкафу, а не просто на лабораторном столе.*

Для перегонки жидкостей с температурой кипения свыше 80°С требуется масляная баня. Верхний температурный предел для масляных бань составляет примерно 250°С (с силиконовой жидкостью). Когда прибор уже собран, его перемещение вверх или вниз затруднено, поэтому в самом начале сборки прибор следует устанавливать на правильной высоте. Она определяется высотой, на которой установлена баня или колбонагреватель, поэтому нужно начинать сборку именно с этого конца с установки перегонной колбы на правильной высоте.

### 2.3. Перегонка при пониженном давлении (вакуумная перегонка)

Понижение давления до менее чем 30 мм рт. ст.[[1]](#footnote-1) значительно снижает температуру кипения, что позволяет проводить перегонку без разложения. Обычно используются два типа вакуумных насосов. Во-первых, водяной насос (известный как лабораторный водоструйный насос или аспиратор), понижающий давление до 10-20 мм рт. ст., что позволяет снизить температуру кипения на 100-125°С. Во-вторых, ротационный масляный насос, дающий давление до 0,01 мм рт. ст. Ниже 30 мм рт. ст. при каждом понижении давления в 2 раза температура кипения снижается примерно на 10°С.

***! Меры безопасности.*** *При всех вакуумных перегонках соблюдайте все меры предосторожности по работе с вакуумными системами.*

*ПРИБОРЫ.* Типичная установка для перегонки при пониженном давлении имеет несколько важных отличий от установки для перегонки при атмосферном давлении. В данном случае используют те же перегонные колбы, но снабженные двугорлой насадкой Кляйзена, одно горло которой предназначено для термометра, а другое для капилляра. Небольшие объемы жидкостей (100 мл или менее) удобнее перегонять в колбе Кляйзена (перегонная колба вместе с насадкой)

В колбу опускают тонко вытянутый капилляр, так чтобы он не доходил до ее дна примерно на 2-3 мм. Когда система находится под вакуумом, через капилляр пропускают воздух (или азот); при этом образуется поток очень мелких пузырьков, которые способствуют спокойному кипению ("кипелки" не работают под вакуумом). В тех случаях, когда перегоняемая жидкость чувствительна к окислению, в капилляр при низком давлении (0,07 кг/см2) подается азот.

Для каждой перегонки необходимо вытягивать новый капилляр. Он должен быть как можно тоньше, но тем не менее пропускать поток мелких пузырьков без потери вакуума.

Холодильник Либиха подсоединяют к приемнику "алонж с несколькими отводами"*,* обычно известный как "паук", позволяющий поворачивать каждую колбу в положение для приема дистиллята. Перегонную колбу следует нагревать на масляной бане. При сборке приборов удобно пользоваться пластиковыми хомутиками или резиночками для скрепления колб с алонжем ("пауком") и "паука" с холодильником. В противном случае они могут упасть еще до подключения вакуума. Для систем, работающих при давлении водоструйного насоса (10-20 мм рт. ст.), вакуумную смазку обычно не наносят (за исключением места вращения "паука"), но для перегонки при высоком вакууме, когда применяется масляный насос, необходима умеренная вакуумная смазка.

После того как будет достигнуто требуемое давление, можно приступать к нагреванию масляной бани. При сборке дистиллята записывайте давление и температурный интервал для каждой фракции. По завершении перегонки уберите источник нагревания и дайте прибору остыть, перед тем как стравить вакуум.

*Вакуум стравливают не путем отключения насоса, а открыванием крана в системе для впуска воздуха.*

Примите все необходимые меры, чтобы приемные колбы не упали при стравливании вакуума.

### 2.4 Удаление растворителя с помощью роторного испарителя

Роторный испаритель - это по существу устройство для быстрого удаления растворителей отгонкой их в вакууме (рис.2).

При его использовании соблюдают следующую последовательность операций. Помещают раствор, подлежащий выпариванию, в круглодонную колбу соответствующего размера (заполненную не более чем наполовину).

Подсоединяют ее к каналу, по которому будут удаляться пары растворителя, используя при необходимости переходник. В том случае, если вакуум создается с помощью водоструйного насоса, нет необходимости смазывать шлифы.



Рис.2. Роторный испаритель

1-приемная колба, 2-холодильник, 3- моторчик, 4- отгонная колба, 5- водяная баня

Убедитесь, что приемная колба пуста и тоже закреплена. На этой стадии водяная баня должна быть холодной. Поднимают баню таким образом, чтобы колба на одну треть погрузилась в воду, подключают воду к холодильнику и затем включают водоструйный насос. Пока набирается вакуум, включают моторчик, чтобы колба, в которой проводят выпаривание, вращалась. Когда вакуум стабилизируется, медленно нагревают водяную баню до тех пор, пока не начнет отгоняться растворитель. Во избежание вспенивания и выброса раствора не перегревайте баню.

*Важно соблюдать перечисленную выше последовательность: НИКОГДА не погружайте колбу испарителя в ГОРЯЧУЮ водяную баню, поскольку это, как правило, приводит к бурному кипению, вспениванию и выбросу раствора в приемник.*

Подключение испарителя к водоструйному насосу создает вакуум, позволяющий легко удалить "летучие" растворители с температурой кипения до 100°С при температуре бани до 50-60°С.

### 2.5. Контрольные вопросы по теме «Перегонка»

1. Кратко сформулируйте теоретические основы перегонки.
2. Из чего состоит прибор для перегонки при атмосферном давлении?
3. В чем отличие перегонки в вакууме от перегонки при атмосферном давлении?
4. Как осуществляют выбор типов холодильников, используемых для перегонки?
5. Какие нагревательные элементы используют при перегонке?
6. Какие приборы используют для получения вакуума (водоструйный и масляный насосы) и определения его величины?
7. Используя [5,7,9], найдите информацию по способам очистки следующих растворителей:
* углеводороды (гексан, бензол);
* хлорпроизводные (хлороформ, дихлорэтан);
* простые эфиры (диэтиловый эфир, диоксан);
* спирты (метанол, этанол);
* сложные эфиры (этилацетат);
* кетоны (ацетон);
* нитрилы (ацетонитрил);
* амиды (диметилформамид);
* амины (триэтиламин);

Информацию внесите в свой лабораторный журнал.

1. Какие осушающие агенты используют для растворителей различных классов?
2. Какое устройство имеет вакуумный роторный испаритель? Расскажите о порядке работы с роторным испарителем.

## 3. Экстракция

### 3.1 Основы процесса экстракции

Под экстракцией понимают перемещение вещества из исходной фазы в фазу экстрагента. Полученный в результате экстракт не должен смешиваться с исходной фазой. Повышают эффективность экстракции путем добавления к исходной фазе свежих порций экстрагента (многократная экстракция) или увеличивая поверхность контакта фаз (встряхивая жидкость или измельчая твердые вещества).

### 3.2. Экстракция в системе «жидкость-жидкость»

#### 3.2.1. Простая экстракция

Существуют два основных вида экстракции:

1) экстракция водой для удаления из смеси водорастворимого вещества (обычно неорганического) и 2) экстракция водным раствором кислоты или щелочи, чтобы удалить из органического слоя соответственно органические основания или органические кислоты

Большинство простых экстракций выполняют в делительной воронке

(рис. 3.).



 а б

Рис. 3. Экстракция с использованием делительной воронки а - делительная воронка, б – положение для стравливания избыточного давления

Сама процедура включает в себя смешение органического раствора (в растворителе, не смешивающемся с водой) с водой (водной кислотой или щелочью), встряхивание воронки, чтобы полностью перемешать оба слоя, отстаивание смеси, пока оба слоя не разделятся снова, и затем отделение нижнего слоя в другой сосуд. Смешение позволяет веществу перейти из одного слоя в другой в зависимости от его относительной растворимости в каждом из них.

Процесс экстракции обычно повторяют несколько раз, объединяя порции экстракта для дальнейшей обработки. Важно во всех случаях хранить оба слоя до завершения работы.

***! Меры безопасности.*** *Не трясите воронку вблизи от своего лица.*

*ВЫСАЛИВАНИЕ.* В некоторых случаях экстракция водой усложняется тем, что требуемое органическое соединение слегка растворяется в воде, и поэтому некоторая его часть остается в обоих слоях, тогда как в идеальном случае оно должно полностью перейти в органический слой. В таких случаях растворимость органического соединения в воде заметно снижается в присутствии растворенных солей, обычно хлорида натрия для нейтральных или основных веществ или сульфата аммония - для кислых веществ. Этот эффект можно использовать в различных вариантах экстракции, и в экспериментальных методиках обычно указывается, требуется ли высаливание.

#### 3.2.2. Непрерывная экстракция

Экстракция с использованием делительной воронки дает удовлетворительные результаты только тогда, когда выделяемое соединение имеет такой высокий коэффициент распределения, что оно переходит почти полностью в тот или иной слой. Однако некоторые органические соединения типа карбоновых или сульфокислот легко растворяются как в органических растворителях, так и в воде. Такие вещества можно экстрагировать из водного раствора только непрерывной экстракцией. Она применяется в случае растворителей, которые тяжелее воды (например, дихлорметана). Растворитель непрерывно отгоняется в холодильник, где он конденсируется и затем проходит через водный раствор в виде мелких капелек, собирается на дне и возвращается в колбу. При прохождении через водный слой растворитель экстрагирует немного извлекаемого соединения, которое затем по мере экстракции накапливается в колбе. Несколько видоизмененный способ применяется в том случае, когда растворители легче воды.

### 3.3. Экстракция твердых веществ

#### 3.3.1. Простая экстракция

Иногда необходимо извлечь твердый органический продукт из твердой смеси, содержащей другие вещества (обычно неорганические), которые не растворяются ни в органических растворителях, ни в воде. Если извлекаемое вещество легко растворяется в органическом растворителе, то поступают следующим образом: смесь сначала измельчают в ступке, затем добавляют растворитель, перемешивают и отделяют нерастворившуюся часть фильтрованием.

#### 3.3.2. Непрерывная экстракция

Если органическое твердое вещество труднорастворимо, проводят непрерывную экстракцию в экстракторе Сокслета (рис.4). Смесь помещают в пористую гильзу. Растворитель перегоняют в экстракционную камеру; когда она заполнится, растворитель через сифон поступает обратно в колбу. В результате многократного повторения этого цикла твердое вещество переносится в колбу.

***3.4. Высушивание органических растворов.***

По окончании водной экстракции органический слой содержит некоторое количество воды. Ее можно удалить добавлением небольшого количества порошкообразного неорганического осушителя, который затем удаляют фильтрованием.



 Рис.4. Экстрактор Сокслета для непрерывной экстракции твердых веществ.

1-холодильник, 2- пористая гильза, 3- растворитель

Для этой цели используют многие осушители, но наиболее эффективными являются порошкообразные молекулярные сита (тип 4А). В качестве осушителя общецелевого назначения предпочитают безводные сульфат магния или натрия; они дешевы, эффективны и нейтральны по отношению к большинству функциональных групп.

Процедура сушки заключается в следующем: органический раствор помещают в коническую колбу и добавляют примерно 1 г сульфата магния или натрия на 10 мл раствора. Смесь оставляют на 25-30 минут, время от времени помешивая или встряхивая, а затем фильтруют под вакуумом.

### 3.5 Контрольные вопросы по теме «Экстракция»

1. В чем сущность метода экстракции жидкостей?
2. Какие требования предъявляют к экстрагенту?
3. Как производят извлечение веществ из растворов методом а) простой экстракции; б) непрерывной экстракции?
4. Что представляет собой экстрактор Сокслета?

## 4. КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ

Кристаллизация - наиболее общий метод очистки органических твердых веществ, не слишком загрязненных другими веществами. В тех случаях, когда присутствуют заметные количества других соединений (примерно 5-10% и более), обычно необходимо разделять смесь хроматографически (гл. 6).

### 4.1. Общие принципы

Метод основывается на том, что растворимость твердых соединений в горячих растворителях намного выше, чем в холодных. Таким образом, если вы приготовите насыщенный горячий раствор соединения А и дадите ему остыть, он станет пересыщенным и соединение А выделится в виде кристаллов. Если соединение А не очищено, скажем содержит несколько процентов другого соединения В, тогда примесь также растворится в горячем растворителе, но при охлаждении раствор не будет пересыщен соединением В (потому что оно присутствует в малой концентрации), которое останется в растворе, в то время как основной компонент, соединение А, закристаллизуется. Таким образом, чистое кристаллическое соединение А можно отфильтровать, тогда как примесь соединения В останется в фильтрате (обычно известном как маточный раствор).

На практике метод кристаллизации состоит из следующих пяти стадий: 1) растворение твердого вещества в минимальном объеме кипящего растворителя; 2) фильтрование горячего раствора для удаления нерастворимых примесей (если они присутствуют); 3) охлаждение раствора и после кристаллизации части твердого вещества выдерживание его до полной кристаллизации; 4) отделение кристаллов от маточного раствора фильтрованием и 5) высушивание кристаллов. Для того чтобы достичь абсолютной чистоты, может потребоваться многократная перекристаллизация.

### 4.2. Выбор растворителя для кристаллизации

Успех кристаллизации зависит в значительной степени от правильного выбора растворителя. Идеальный растворитель - тот, в котором очищаемое вещество легко растворяется при нагревании, но лишь умеренно на холоду и в котором очень хорошо растворимы примеси.

#### 4.2.1. Общие закономерности

Некоторые свойства растворителей, используемых в качестве экстрагентов, приведены в табл.1.

На практике растворитель подбирают путем серии пробных кристаллизаций. Наиболее известен принцип "подобное растворяется в подобном", т.е. полярные соединения более растворимы в полярных растворителях, чем в неполярных, и наоборот. Например, полярное соединение, содержащее гидроксильную (ОН) группу, вероятно, растворимо в метаноле (СН3ОН), но хуже растворится последовательно в этаноле (С2Н5ОН) и в высших спиртах, полярность которых убывает по мере удлинения углеводородной цепи.

**Таблица 1.** Растворители, используемые при кристаллизации

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Растворительа  | Т кип ,°С  | Диэлектрическая проницаемо | Растворимость в воде,  |
| Пентан  | 36  | 2  | 0,03  |
| Гексан\*  | 69  | 1,9  | Нераств.  |
| Петролейный  | 60-80  | ~2  | Нераств.  |
| Циклогексан\*  | 81  | 2  | Сл. раств.  |
| Толуол  | 110  | 2,4  | Сл. раств.  |
| Диэтиловый  | 35  | 4,3  | 7,5  |
| Этилацетат\*  | 77  | 6  | 9  |
| Уксусная  | 118  | 6,2  | Раств.  |
| Дихлорметан  | 40  | 9,1  | 2  |
| Пропанол-2\*  | 82  | 18  | Раств.  |
| Ацетон\*  | 56  | 21  | Раств.  |
| Этанол\*  | 78  | 25  | Раств.  |
| Метанол  | 65  | 34  | Раств.  |
| Диметилформа | 154  | 38  | Раств.  |
| Диметилсульфоксид  | 189  | 45  | Раств.  |
| Вода\*  | 100  | 80  |   |

а Растворители, помеченные звездочкой, прежде всего рекомендуются для

пробной кристаллизации (см. текст).

Сильнополярные соединения, например, с несколькими гидроксильными

(ОН) группами либо с карбоксильной (COОH) или сульфокислотной (SO3H) группой частично растворимы в воде. Растворимость в воде ухудшается при наличии таких гидрофобных групп, как углеводородные цепи или кольца.

Обычно лучше всего подбирать растворитель с широким температурным интервалом, так чтобы различие в растворимости между холодным и горячим растворителем было как можно больше.

#### 4.2.2. Пробные кристаллизации

Растворители, отмеченные звездочкой в табл.1, прежде всего рекомендуются для пробной кристаллизации, которую проводят следующим образом: ~50 мг твердого вещества помещают в пробирку (7,5x10 мм) и при перемешивании по каплям добавляют 0,25 - 0,5 мл растворителя. Если твердое вещество растворяется на холоду, то растворитель, очевидно, подходит только в качестве "хорошего" растворителя в смеси двух растворителей (см. ниже). Если же оно не растворяется, нагрейте пробирку на водяной бане, встряхивая ее при этом до тех пор, пока растворитель не закипит. Если твердое вещество растворилось не полностью, добавьте еще несколько небольших порций растворителя до общего объема примерно 1,5 мл. Если часть твердого вещества все же не растворится, то следует попробовать другой растворитель. При получении прозрачного раствора дайте ему остыть.

Небольшой выход кристаллов означает, что данный растворитель не подходит из-за высокой растворимости в нем на холоду. Повторите процесс с несколькими растворителями и выберите тот из них, который дает наибольший выход кристаллов.

В некоторых случаях может оказаться так, что ни один растворитель не подойдет. Тогда необходимо использовать смесь двух растворителей, в одном из которых вещество растворяется легко, а в другом лишь умеренно. Оба растворителя, конечно, должны полностью смешиваться друг с другом и по возможности иметь близкие температуры кипения.

### 4.3. Проведение кристаллизации

#### 4.3.1 Растворение твердого вещества

Твердое вещество необходимо растворять в минимальном объеме кипящего растворителя в круглодонной колбе (лучше грушевидной формы), к которой подсоединен обратный холодильник (рис. 5).

*МЕТОДИКА.* Взвесьте вещество, которое необходимо перекристаллизовать, и через воронку для сыпучих тел перенесите его в колбу.



Рис. 5. Прибор для кристаллизации

2,1 – ввод и вывод воды; 3 – колба с кристаллизуемым веществом; 4 – водяная баня

Добавьте ровно столько растворителя, чтобы покрыть им твердое вещество, но недостаточное для его полного растворения при кипении.

Добавьте несколько гранул «кипелок». Подсоедините обратный холодильник. Установите колбу и холодильник на водяную баню или на колбонагреватель. Нагревайте смесь до тех пор, пока не начнется равномерное кипение растворителя с конденсацией в обратном холодильнике. Спустя несколько минут часть твердого вещества должна раствориться. Продолжайте добавлять через обратный холодильник небольшие порции растворителя до тех пор, пока твердое вещество не растворится полностью. Это нужно делать медленно, давая растворителю покипеть в течение нескольких минут после каждого добавления, чтобы твердое вещество успело раствориться. Помните, что необходимо использовать минимальный объем растворителя. Запишите объем израсходованного растворителя.

Если раствор прозрачен (нет взвешенных твердых веществ) и слабо окрашен смолистыми примесями, то его следует оставить (гранулы «кипелок» вынимают шпателем или удаляют декантированием раствора в другую коническую колбу) для кристаллизации.

#### 4.3.2. Образование кристаллов

Насыщенному горячему раствору дают остыть до комнатной температуры, и после охлаждения из него обычно выпадают кристаллы. Этот процесс может быть медленным, и поэтому раствору следует дать постоять при комнатной температуре в течение некоторого времени, внимательно наблюдая, пока не завершится кристаллизация. Обычно при медленном охлаждении образуются крупные кристаллы, а при быстром - очень мелкие, порошкообразные. Природа соединения и растворителя также оказывают значительное влияние на кристаллизацию. Быстрое охлаждение может привести к образованию масел (см. ниже).

*ПРОБЛЕМЫ: КРИСТАЛЛЫ НЕ ОБРАЗУЮТСЯ.* Это обычно происходит из-за отсутствия подходящих центров, инициирующих образование кристалла, и чаще всего случается с растворами, очищенными от пыли горячим фильтрованием. Вызвать кристаллизацию можно несколькими способами. Лучшим из них является добавка "затравочного" кристалла ("затравки") того же самого вещества. Другой способ - это потереть острой стеклянной палочкой по внутренней стенке колбы на уровне жидкости, что приводит к образованию неровностей на стеклянной поверхности, которые служат центрами роста кристаллов.

*ПРОБЛЕМЫ: ОБРАЗУЮТСЯ МАСЛА.*

Низкоплавкие вещества могут выделяться не в виде кристаллов, а в виде масла особенно при быстром охлаждении раствора. Для того чтобы предотвратить образование масел, необходимо экспериментировать с разбавлением, введением затравки и очень медленным охлаждением.

#### 4.3.3. Отделение кристаллов

После завершения кристаллизации кристаллы отделяют от холодного маточного раствора вакуумным фильтрованием. Обычно используют два типа фильтровальных воронок: а) со стеклянной пористой пластинкой (воронки Шота), в которых не нужна фильтровальная бумага; б) воронки типа Бюхнера и Хирша с сетчатой пластинкой, на которую укладывают фильтровальную бумагу.

Фильтровальная воронка соединяется с фильтровальной колбой (Бунзена) (рис.6). Процесс фильтрования обеспечивается вакуумным водоструйным насосом.



Рис. 6. Прибор для фильтрования

1- колба Бунзена (для фильтрата), 2 – воронка Бюхнера.

*ПРОЦЕСС ФИЛЬТРОВАНИЯ*

При фильтровании через воронку Бюхнера или Хирша фильтровальная бумага на дне воронки должна покрывать всю сетчатую пластинку, не загибаясь у стенок. Фильтровальную бумагу необходимо слегка смочить чистым растворителем, чтобы она прилипла к перфорированному дну. Подайте к системе слабый вакуум. Плавно вращая кристаллизационную колбу с кристаллами и маточным раствором, аккуратно вылейте смесь в воронку. Подсос должен быть таким, чтобы через фильтр проходила ровная струя фильтрата. Когда фильтрование закончится, стравите вакуум и, если необходимо, снова залейте часть маточного раствора в кристаллизационную колбу, чтобы смыть кристаллы, прилипшие к стенкам.

После того как все кристаллы будут перенесены на воронку, их промывают небольшой порцией холодного чистого растворителя. Для этого надо убрать подсос, добавить растворитель, чтобы он только покрыл кристаллы, слегка перемешать шпателем и подключить снова слабый вакуум. Промывание кристаллов следует делать с большой осторожностью, так как это может привести к значительным потерям, если кристаллы заметно растворимы в холодном растворителе.

Наконец, покройте воронку часовым стеклом для защиты кристаллов от пыли и подсоедините вакуум, чтобы удалить как можно больше растворителя.

### 4.3.4.Сушка кристаллов

*ПРИ КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ*

Большинство образцов можно эффективно высушить при комнатной температуре, используя вакуум для удаления следов оставшегося растворителя. После удаления максимально возможного количества растворителя с использованием фильтровальной воронки перенесите кристаллы во взвешенный кристаллизатор и покройте его часовым стеклом. Подберите кристаллизатор такого размера, чтобы кристаллы покрывали его дно сравнительно тонким слоем. Очень маленькие образцы можно высушивать в пробирке, покрытой кусочком алюминиевой фольги с проколотыми в ней отверстиями. Поместите кристаллизатор (или пробирку) в вакуумный эксикатор. Установите предохранительное покрытие над эксикатором (или обмотайте его полотенцем) и вакуумируйте его. Большинство растворителей с *т.кип*. до 80°С легко улетучивается в вакууме водоструйного насоса, для менее летучих растворителей типа толуола, пропанола, бутанола и т. п. требуется более высокий вакуум, создаваемый масляным насосом. После сушки в течение 0,5-1 часа стравите вакуум, взвесьте образец и определите его температуру плавления. Поскольку небольшие следы растворителя могут понизить *т.пл.,* стоит повторить процедуру сушки еще в течение 0,5 часа и снова определить *т.пл.*

*ПРИ ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ*

Иногда необходимо высушить кристаллы при повышенной температуре, например, при использовании для кристаллизации из очень нелетучего растворителя или при подготовке образца для аналитических целей. И снова эту процедуру осуществляют в вакууме. Большие количества вещества можно высушить в кристаллизаторе, помещенном в вакуумный сушильный шкаф.

Меньшие количества высушивают в лодочке в сушильном пистолете.

### 4.4. Определение температуры плавления

Температура плавления дает ценную информацию о чистоте твердого вещества, так как присутствие примесей понижает температуру плавления (*т.пл*.) и расширяет интервал температур плавления. Ее следует измерять как до, так и после кристаллизации вещества. По достижении максимального значения *т.пл.,* которая не изменяется при дальнейшей перекристаллизации, можно судить о чистоте соединения. Этот прием известен как "кристаллизация до постоянной *т.пл*.".

***4.5. Контрольные вопросы по теме «Кристаллизация»*** 1. Какие виды кристаллизации, как метода очистки твердых веществ, вы знаете?

1. Сформулируйте принципы подбора растворителей при кристаллизации.
2. Какие вы знаете приемы, вызывающие начало кристаллизации?
3. Расскажите о методе фильтрования и его применении для отделения осадков. 5. Как температура плавления кристаллического вещества связана с его чистотой?.

## Список рекомендуемой литературы

1. Сильверстейн, Р. Спектрометрическая идентификация органических соединений // Р. Сильверстейн, Ф. Вебстер, Д. Кимл ; под ред. Н. Сергеева ; пер. с англ. Н. Сергеева, Б. Тарасевича. М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. - 560 с.
2. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс. Справочник биохимика.// М.: Мир. 1991.
3. Свойства органических соединений. Справочник. Под ред. Потехина А.А.// Л.: Химия. 1984.
4. Гордон А., Форд Р. Спутник химика.// М.: Мир. 1976.
5. Шарп Дж., Госни И., Роули А. Практикум по органической химии. М.:

Мир.1993.

1. Серей А. Справочник по органическим реакциям. Именные реакции в органической химии.// М.: ГНТИ хим.лит. 1962.
2. Беккер Г., Бергер В., Домшке Г. и др. Органикум. Практикум по органической химии.// М.: Мир. 1979. Т.1,2.
3. Физер Л., Физер М. Реагенты для органической химии.// М.: Мир. 1971. Т.1-

5.

1. Лабораторная техника органичеcкой химии. Под ред. Кейла Б.// М.: Мир. 1966.
2. Титце Л., Айхер Т. Препаративная органическая химия. Реакции и синтезы в практикуме органической химии и научно-исследовательской лаборатории.// М.: Мир. 1999.
3. Практикум по органической химии. Синтез и идентификация органических соединений. Под ред. Гинзбурга О.Ф.//.М.: Высшая школа. 1989.
4. Робертс Дж. Кассерио М. Основы органической химии.// М.: Мир. 1978. Т.1,2.
5. Нифантьев И.Э., Ивченко П.В. Практикум по органической химии. Методическая разработка для студентов факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова. Москва. 2006.
1. - Давление дается в мм рт. ст., так как эту единицу получают прямо на ртутных манометрах и измерительных приборах Мак-Леода (760 мм рт. ст. = 1 атм; 1 мм рт. ст. = 1 торр = 133,3 Н/м2).

 [↑](#footnote-ref-1)