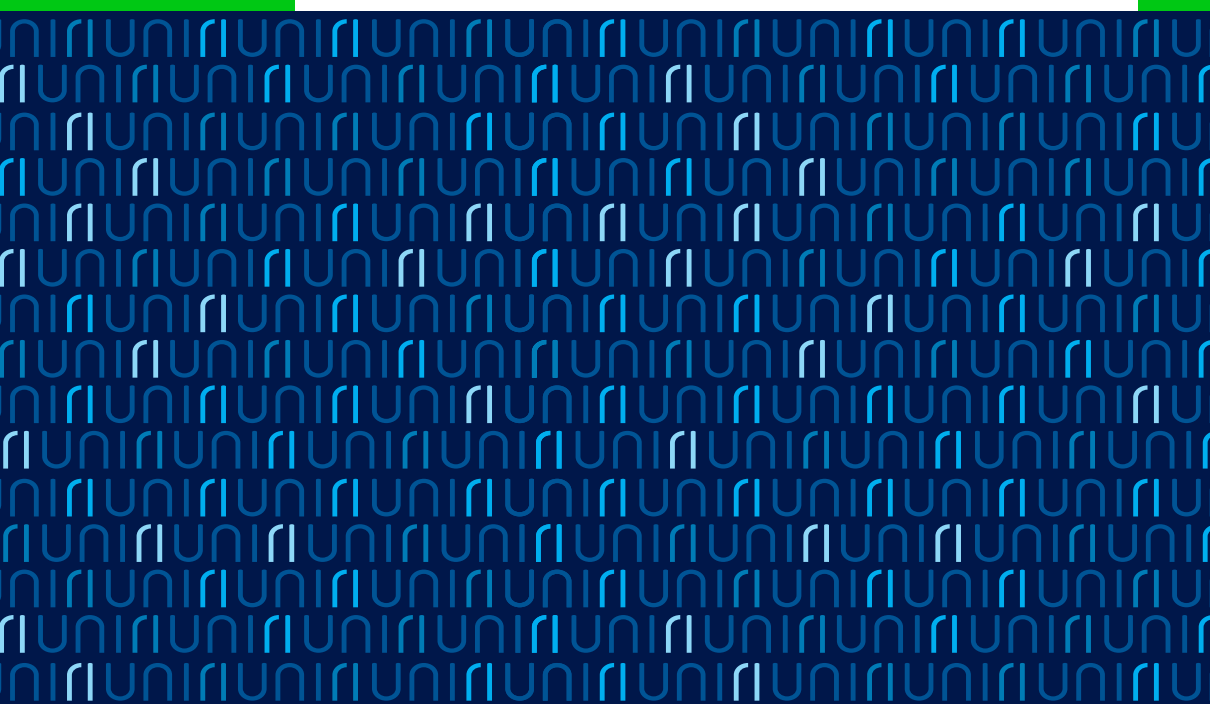


Nela Malatesti
Ana Filošević

Praktikum organske kemije

za studente II. godine preddiplomskog studija
Biotehnologija i istraživanje lijekova



Nela Malatesti

Ana Filošević

PRAKTIKUM ORGANSKE KEMIJE

za studente II. godine preddiplomskog studija
Biotehnologija i istraživanje lijekova

Izdavač:

Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju

Za izdavača:

prof. dr. sc. Snježana Prijic-Samaržija

Recenzenti:

doc. dr.sc. Gordana Čanadi Jurešić

doc. dr. sc. Karlo Wittine

Lektura:

Jelena Celcer, prof.

Grafička priprema i prijelom:

Sanja Jovanović

Mjesec i godina objavljivanja:

Studeni 2017.

ISBN 978-953-7720-32-2

Odlukom Povjerenstva za izdavačku djelatnost Sveučilišta u Rijeci KLASA: 602-09/17-01/08, URBROJ: 2170-57-03-17-3, ovo se djelo objavljuje kao izdanje Sveučilišta u Rijeci.

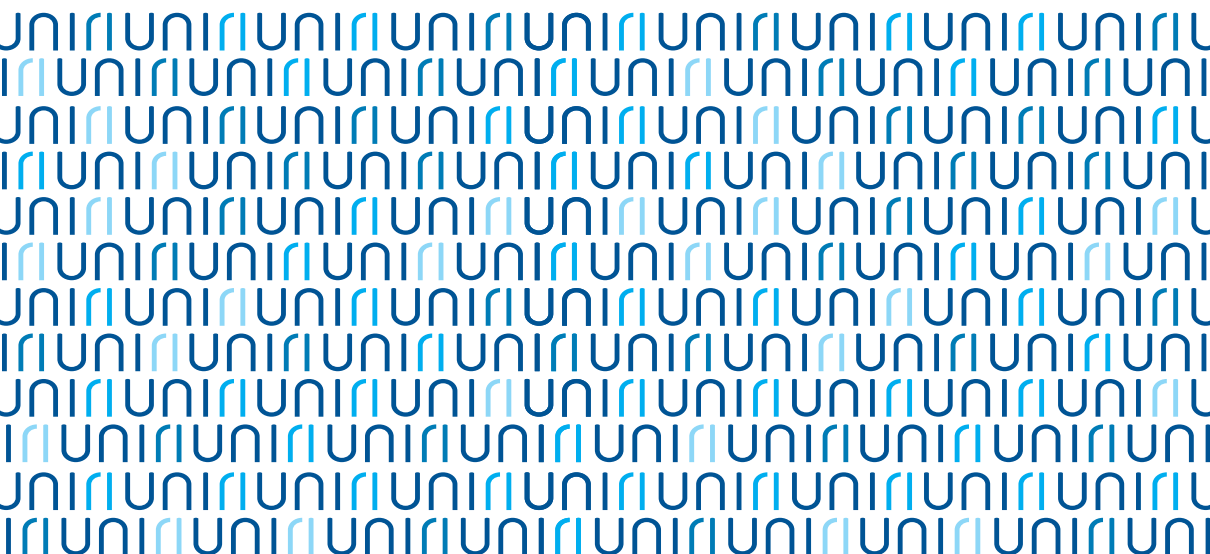
Tiskanje ovog udžbenika omogućeno je uz financijsku potporu Zaklade Sveučilišta u Rijeci temeljem Ugovora (br. N-IZ 6/2017). Mišljenja izražena u ovom udžbeniku su mišljenja autora i ne izražavaju nužno stajalište Zaklade Sveučilišta u Rijeci.



Nela Malatesti, doc. dr. sc.
Ana Filošević, mr. sc.

Praktikum organske kemije

za studente II. godine preddiplomskog studija
Biotehnologija i istraživanje lijekova



UVOD

Praktikum organske kemije izvodi se u okviru kolegija „Organska kemija” (BIL 201) i namijenjen je studentima II. godine preddiplomskog studija „Biotehnologija i istraživanje lijekova” koji se izvodi na Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci. Kolegij „Organske kemije” koncipiran je tako da se prvo izvode predavanja (45 sati) i seminari (15 sati), a nakon toga vježbe (60 sati). Usvajanje znanja iz područja organske kemije kontinuirano se prati prema planu i programu kolegija, među ostalim i polaganjem međuispita. Znanje se potom primjenjuje u obliku vježbi koje, dakle, zovemo Praktikumom organske kemije.

Većini studenata ovo je prvi susret s praktičnim radom u laboratoriju organske kemije, stoga su vježbe zamišljene tako da student(ica), nakon upoznavanja s mjerama sigurnog rada u laboratoriju, započne rad u Praktikumu osnovnim postupcima pročišćavanja i izolacija organskih spojeva. Na taj način postupno stječe potrebne vještine i sposobnosti koje dalje primjenjuje u složenijim postupcima i sintezama organskih spojeva. Većinu vježbi student(ica) izvodi samostalno, pojedine se vježbe izvode djelomično ili u potpunosti kao pokazne vježbe, a neke kao grupni rad. Od studenata se očekuje poznavanje teorije koja se vezuje uz pojedinu vježbu, razumijevanje onoga što će raditi i kako treba raditi na siguran način; sve to provjerava se ulaznim kolokvijem. Tek nakon uspješno položenog ulaznog kolokvija, student(ica) pristupa izvođenju vježbe, a nakon vježbe piše referat u kojem treba navesti opis postupka, rezultate te zaključak. U referatu također treba riješiti zadatak iz propisa koji upućuje na dodatno razmišljanje o onome što se radilo u vježbi.

Vježbe u ovim propisima odabrane su s ciljem savladavanja osnovnih vještina i usvajanja metoda rada u laboratoriju organske kemije, tematski se mogu uklopiti u profil studija na kojemu se izvode te pružaju čvrste temelje za nadogradnju i složenije postupke na višim praktikumima organske kemije. Vježbe su uglavnom preuzete iz udžbenika naših poznatih autora (vidi popis literature na posljednjoj stranici), ali su djelomično modificirane na temelju višegodišnje prakse izvođenja ovog Praktikuma te prilagođene zahtjevima studija i konkretnih uvjeta u našim Praktikumima. Stoga propisi sadržavaju i veliki broj vrlo specifičnih upozorenja studentima i naglasaka na poseban oprez u nekim postupcima koji se temelje na uočenim greškama koje studenti najčešće rade. U okviru mjera opreza i sigurnosti sve kemikalije koje se upotrebljavaju u praktikumu označene su s obzirom na moguće opasnosti kako bi studenti proveli odgovarajuće mjere predostrožnosti. Kad god je to bilo moguće, opasnije kemikalije zamijenjene su manje opasnim i/ili su upotrijebljene manje količine od originalne procedure kako bi se rizik što više umanjio. Pritom se vodilo računa o tome da vježbe i dalje budu funkcionalne te daju odgovarajuće rezultate. Također, ovisno o organizaciji Praktikuma, složenije i vremenski zahtjevnije vježbe izvode se u cijelosti ili modificirano, što ovisi i o pripremljenosti i interesu studenata, a propisi se mogu tome prilagoditi.

Teoretske osnove organske kemije tek su se neznatno mijenjale i pomalo nadopunjavale zadnjih nekoliko desetljeća, stoga je i ovdje navedena teoretska osnova poznata i lako dostupna u okviru manje ili više poznatih udžbenika organske kemije koji su se u tom razdoblju upotrebljavali. Ovdje se nastoji naglasiti nužnost razumijevanja mehanističkih principa reakcija koje su opisane te povezivanje teoretske osnove s rezultatima vježbi. Najznačajnije promjene vezane su uz sve moderniju tehnologiju i instrumente koji se upotrebljavaju za analizu i karakterizaciju organskih spojeva. Kako se tehnika nuklearne magnetske rezonancije (NMR) uči na višim kolegijima, ovdje se u vježbama ograničilo na upotrebu infracrvene spektroskopije (IR) i ultraljubičaste-vidljive (UV-vis) spektroskopije. Navedeni instrumenti (Agilent Cary 630 FTIR spektrofotometar i Cary 60 UV-Vis spektrofotometar) te sva ostala oprema koja se upotrebljava na Praktikum organske kemije nabavljena je u okviru projekta „Razvoj istraživačke infrastrukture na Kampusu Sveučilišta u Rijeci” koji je financiran iz Europskog fonda za regionalni razvoj (EFRR) te smo zahvalni što je možemo upotrebljavati.

Moje dosadašnje iskustvo pokazalo je da su studenti na ovim vježbama iznimno motivirani i angažirani te se nadam da će se takav pozitivan trend nastaviti i sa svim budućim generacijama.

Nela Malatesti

Rijeka, 2017.

SADRŽAJ

Mjere opreza i sigurnost u radu u laboratoriju organske kemije	9
Priprema za rad u praktikumu organske kemije	13
Vođenje laboratorijskog dnevnika i pisanje referata	17
Vježbe:	
1. Pročišćavanje krutine ekstrakcijom i prekrizacijom:	21
a) Ekstrakcija i taloženje	23
b) Prekrizacija	28
c) Određivanje temperature tališta	31
2. Kromatografija:	35
a) Tankoslojna kromatografija (TLC)	35
b) Kromatografija na stupcu (koloni)	37
3. Nukleofilna supstitucija prvog reda:	45
Sinteza <i>tert</i> -butil-klorida	45
4. Elektrofilna aromatska supstitucija – nitroziranje:	49
Sinteza <i>p</i> -nitrozofenola	49
5. Nukleofilna acilna supstitucija – esterifikacija:	55
Sinteza acetilsalicilne kiseline	55
6. Cannizzarova reakcija:	59
Sinteza benzojeve kiseline i benzil-alkohola	59
7. Aldolna kondenzacija:	65
Sinteza dibenzilidenacetona	65
8. Izolacija kazeina, albumina i laktoze iz mlijeka	69
Dokazivanje proteina i dokazivanje reduktivnih šećera	69
9. UV-vis i FTIR/ATR spektroskopija	77
DODATAK UZ VJEŽBE	79
I. Pročišćavanje tehničkog benzaldehida	79
II. Kvantitativno određivanje glukoze upotrebom Benedictova reagensa	79
III. Spektroskopija	80
PRILOG: Spektri	91
LITERATURA	107

MJERE OPREZA I SIGURNOST U RADU U LABORATORIJU ORGANSKE KEMIJE

Praktikum organske kemije najčešće nije prvi kemijski praktikum u kojemu studenti provode praktični dio svoje nastave. Ovisno o studijskom programu, praktikumu organske kemije najčešće prethode praktikumi opće i/ili analitičke kemije. Na tim se praktikumima studenti obično upoznaju s mjerama opreza i načinom sigurnog rada u laboratoriju, uče kako spriječiti nezgode i kako postupiti ako do nezgoda ipak dođe. Sve što nauče na prvim kemijskim praktikumima studenti trebaju primjenjivati i na praktikumu organske kemije.

Prije početka rada u laboratoriju student treba znati gdje je izlaz u slučaju opasnosti, gdje se nalazi aparat za gašenje požara i gdje se mogu isprati oči/koža u slučaju kontakta s opasnom kemikalijom.

Specifičnost organskog laboratorija jest to što su brojna otapala zapaljiva i/ili su njihove pare eksplozivne u smjesi sa zrakom. Zato pri radu s takvim tvarima u blizini ne smije biti upaljen plamenik ili drugi otvoreni izvor topline. Mnoge su tvari toksične, kancerogene, korozivne ili općenito štetne za zdravlje, stoga je najbolje svaku tvar tretirati kao opasnu, a za one tvari za koje postoje preporuke o načinu rukovanja valja slijediti te preporuke. Rad sa svim štetnim tvarima treba izvoditi u digestoru, a često je poželjno nositi i zaštitne rukavice. Boce s kemikalijama treba prenositi tako da se boca drži s obje ruke, pri čemu se jednom rukom drži vrat boce, a drugom se pridržava dno boce. Nakon upotrebe uvijek treba dobro začepiti sve vrste spremnika s kemikalijama, a ne samo, primjerice, nataknuti primjerice čep na vrh boce, što studenti ponekad rade, stvarajući tako opasne situacije. Općenito, student treba uvijek raditi oprezno i o svim nedoumicama **pitati voditelja laboratorija** (nastavnik i/ili asistent) i tehničara/laboranta.

Rad sa staklenim dijelovima i aparaturama

Staklene dijelove aparature treba dobro učvrstiti s pomoću hvataljki, ali bez pretjerivanja i prejaka stezanja koje može dovesti do lomljenja stakla. Uvijek treba dobro prethodno isplanirati sastavljanje (i rastavljanje!) aparature tako da se učvrste najvažniji dijelovi aparature na mjestima koja omogućavaju najveću stabilnost. Istovremeno treba voditi računa o tome da se kupelji ili grijača tijela ispod staklene aparature u svakom trenutku mogu lako ukloniti ili zamijeniti. Pri upotrebi plamenika i drugih grijaćih tijela treba paziti na to da su gumeni i električni dijelovi aparature na sigurnoj udaljenosti. Gumene cijevi treba spojiti na hladilo tako da ne dođe do prskanja vode i vodu nikad ne treba otvarati naglo. Naglo otvaranje i posljedično prskanje vode jedna je od najčešćih „nezgoda” u laboratoriju. Iako voda sama po sebi nije opasna, mokre površine u laboratoriju uvijek predstavljaju rizik! Uvijek treba provjeriti koja je ulazna cijev za hladilo, a koja izlazna jer je i to jedna od najčešćih pogrešaka studenata. Pri upotrebi lijevaka za odjeljivanje i lijevaka za dokapavanje

student treba provjeriti „curi“ li lijevak prije same upotrebe u eksperimentu. Naime, lijevci se peru tako da se plastični dijelovi (pipci) odvoje i potom se stakleni dio često suši u sušioniku, a plastični dijelovi izvan sušionika (i o tome treba voditi računa!). Često se događa da se nakon sušenja zamijene pipci za pojedine lijevke i tada se može dogoditi da zatvoreni lijevak propušta tekućinu zbog neodgovarajućeg pipca.

Općenito, uvijek treba biti oprezan kad se upotrebljava stakleno posuđe. Ako se nešto razbije, treba provjeriti s voditeljem laboratorija što učiniti u tom slučaju. U nekim slučajevima staklopuhač može popraviti razbijeno posuđe, a ako popravak nije moguć, treba provjeriti gdje je predviđeno odlaganje staklenog otpada. Ako student snosi štetu za razbijeno posuđe (ali i inače), treba voditi računa o tome da je posuđe s ubrušenim dijelovima dosta skuplje od istovrsnog posuđa bez brusa. Nekad su se bušili gumeni čepovi kroz koje su se onda mogle provući staklene cijevi i tako su se sastavljale aparature, primjerice za destilaciju, a danas se uglavnom upotrebljava stakleno posuđe s brusom određenih standardnih veličina koje pojednostavnjuje sastavljanje i rastavljanje aparatura. Kad se posuđe s brusom upotrebljava u sklopu vakuum-uređaja, dobro je uvijek namazati gornji dio brusa silikonskom masti kako ne bi došlo do sljepljivanja. Ne smije se pretjerivati s upotrebom silikonske masti i treba paziti da ona ne dospije u reakcijsku smjesu. Posuđe koje se upotrebljava pri sniženom tlaku ne smije imati oštećenja, što svakako treba provjeriti prije upotrebe.

Zabranjeno je jesti i piti u laboratoriju. Obavezno oprati ruke na izlasku iz praktikuma!

Čistoća

Važan dio sigurnog rada jest i biti uredan, paziti gdje se što ostavlja, odmah počistiti proliveno ili prosuto (pritom voditi računa o kojoj se kemikaliji radi!). Ne stavljati nepotrebne stvari na radnu površinu!

Za svaki termin Praktikumima imenuju se dežurni studenti. Dežurni su studenti odgovorni i kontroliraju je li svaki student svoje radno mjesto ostavio urednim i čistim – dok dežurni student i/ili voditelj laboratorija ne provjeri radno mjesto, ostali studenti ne smiju napustiti laboratorij. Pri odlaganju upotrijebljenih kemikalija ponovno treba voditi računa o vrsti kemikalije. U pravilu se nijedna kemikalija / nijedno otapalo organske prirode ne smije bacati u izljev, a to vrijedi i za koncentrirane kiseline i lužine! Studenti se trebaju obratiti tehničaru/laborantu koji će imati pripremljene odgovarajuće posude za otpad.

U laboratoriju je obavezno nošenje zaštitne kute i zaštitnih naočala. Zaštitna kuta mora imati duge rukave i dosezati barem do iznad koljena te treba biti zakopčana! Obuća ne smije imati otvore za prste, a obuća poput sandala i japanki nije dozvoljena. Dugu kosu treba svezati.

Gašenje požara

Ako tijekom rada dođe do manjeg požara, ne smije se puhati u plamen jer se tako raspiruje plamen. Otvor iz kojega izbija požar treba prekriti (primjerice, krpom ili satnim staklom za manje lokalne izvore požara u čaši i slično) kako bi se spriječio dovod kisika. U slučaju većeg požara za gašenje treba upotrijebiti pijesak ili aparat za gašenje.

Ako se zapalila zaštitna kuta, treba je odmah skinuti, ako je to moguće, i preklopiti tako da se ugasi vatra. Ako se zapale ostali dijelovi odjeće, treba upotrijebiti tuš, ali samo ako je blizu! Ne trčati jer se tako vatra raspiruje! Vatra na čovjeku može se ugasiti i umatanjem osobe u pokrivač te polijeganjem i valjanjem na podu. Zapaljena odjeća i kosa ne smiju se gasiti ugljikovim dioksidom zbog opasnosti od gušenja i opekline.

Zaštita oka

U laboratoriju obavezno treba nositi zaštitne naočale cijelo vrijeme. Umjesto njih dozvoljene su naočale s dioptrijom, ali ni u kojem slučaju nisu dozvoljene kontaktne leće. Ako neka kemikalija ipak dospije u oko, treba odmah početi ispirati mlazom mlake vode. Kiseline i većina drugih kemikalija iz oka se ispiru najmanje 15 minuta, a baze najmanje 30 minuta. U oko se poslije ispiranja ne smiju unositi sredstva za neutralizaciju.

Zaštita kože

Ako koncentrirana sumporna kiselina dospije na kožu, treba je suhom krpom odmah obrisati s kože, a zatim kožu isprati mlazom hladne vode te zasićenom otopinom natrijeva hidrogenkarbonata, NaHCO_3 . Pri razrjeđivanju i neutralizaciji koncentrirane sumporne kiseline razvija se velika količina topline, što može izazvati opekline. Zato koncentriranu kiselinu treba najprije obrisati suhom krpom, a tek zatim isprati mlazom hladne vode.

Jake baze brzo nagrizaju površinski sloj kože pa ih treba odmah ukloniti ispiranjem mlazom hladne vode. Ostatke lužine treba neutralizirati 2 %-tnom otopinom octene kiseline, CH_3COOH , ili 3 %-tnom otopinom borne kiseline, H_3BO_3 .

Pranje laboratorijskog posuđa

Pri pranju laboratorijskog posuđa treba znati prirodu onečišćenja kako bi se upotrijebilo odgovarajuće sredstvo za pranje. To je ujedno razlog zašto se iza sebe ne smije ostavljati prljavo posuđe i zašto je svaki student dužan oprati posuđe s kojim je radio/la. Najjednostavnije pranje jest ono s vodenom otopinom deterdženta. Pri pranju se upotrebljava spužva, a za tvrde nečistoće treba upotrijebiti četku (postoje odgovarajuće četke za epruvete, ali ih treba pažljivo upotrebljavati jer se prejakim guranjem četke često probija dno!). Osim tekućih deterdženata, mogu se upotrebljavati i abrazivna sredstva za čišćenje (pijesak, Vim i sl.). Ako ni to nije dovoljno, a nečistoća je lužnatog podrijetla, upotrebljavaju se razrijeđene otopine kiseline, odnosno razrijeđene

otopine lužina ako je nečistoća kiselog karaktera. Mnoge nečistoće mogu se ukloniti otapanjem u pogodnom organskom otapalu (etanol, aceton, petroleter i sl.), ali se to izbjegava jer su to skupe, hlapljive i zapaljive tvari koje doprinose onečišćenju okoliša.

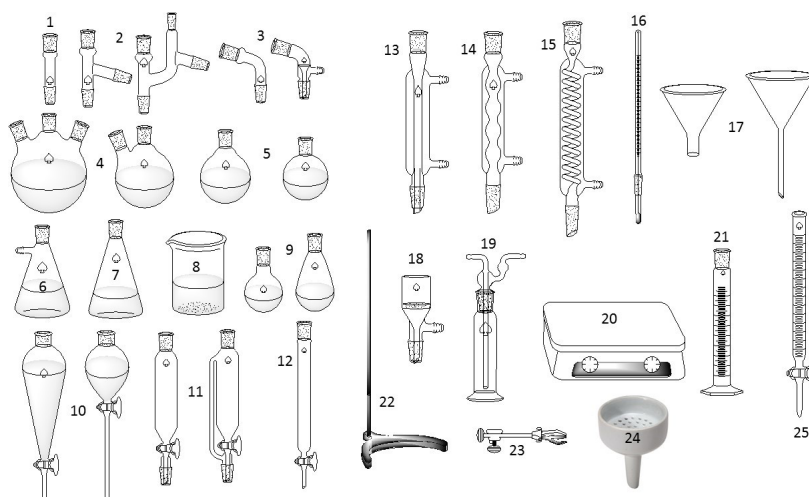
Također, postoje specijalne otopine za pranje laboratorijskog posuđa (Labex, Kemex) koje se mogu upotrijebiti u razrijeđenom ili koncentriranom obliku. Nakon pranja s bilo kojim sredstvom za pranje posuđe treba dobro isprati vodovodnom, a zatim obavezno i destiliranom vodom, ocijediti i sušiti u sušioniku na temperaturi od 100 do 110 °C. Graduirano stakleno posuđe suši se na temperaturi od 40 °C.

Kad se suši laboratorijsko posuđe i pribor koji ima i staklene i plastične dijelove, plastične dijelove treba odvojiti i osušiti izvan sušionika. Pritom, kao što je već rečeno, primjerice kod lijevka za odjeljivanje, treba voditi računa o tome da se ti dijelovi ne pomiješaju poslije sušenja, već da se svaki komad posuđa ponovno sastavi od jednakih dijelova od kojih je bio prvi put sastavljen.

PRIPREMA ZA RAD U PRAKTIKUMU ORGANSKE KEMIJE

Osnovno laboratorijsko posuđe i pribor; metode rada

Studenti su se s osnovnim posuđem i priborom trebali upoznati na Praktikumima opće i analitičke kemije te se očekuje da to znanje primjenjuju na Praktikumu organske kemije. Ovdje se navodi osnovno laboratorijsko posuđe i pribor koji se najčešće upotrebljavaju u laboratoriju organske kemije (slika 1). Prikazano laboratorijsko posuđe uglavnom je stakleno, izuzev Büchnerova lijevka (24) koji je najčešće porculanski, ali može biti i plastični. Također, većina je ovog posuđa s brusom, što omogućava lakše sastavljanje odgovarajućih aparatura. Metalni pribor uključuje stalke (22) i hvataljke („kleme“) s obujmicama („mufe“) (23).



Slika 1. Najvažnije laboratorijsko posuđe i pribor

Poveznice u aparaturnama različiti su adapteri (1), nastavci za destilaciju (2) i nastavci za hvatanje destilata – „lule“ (3) (za običnu i vakuumsku destilaciju). Reakcije se najčešće provode u okruglim tikvicama s okruglim dnom i s jednim (5) ili više „grla“ (4). Više grla na reakcijskoj tikvici omogućuje, primjerice, istodobno praćenje temperature reakcijske smjese i dokapavanje reagensa. Temperatura se može pratiti s pomoću termometra s brusom (16) ili termometra bez brusa koji se umetne u jedno grlo tikvice s pomoću odgovarajućeg adaptera.

Danas se u laboratorijima sve manje upotrebljavaju termometri punjeni ži-
vom, a najviše se upotrebljavaju oni punjeni alkoholom. Reagensi se dokapavaju s pomoću lijevaka za dokapavanje (11), od kojih se lijevak s dodatnom cjevčicom za izjednačavanje tlakova upotrebljava kad je potreban zatvoren reakcijski sustav. Lijevci za odjeljivanje (10) upotrebljavaju se uglavnom za

ekstrakcije. Erlenmeyerove tikvice (7) i čaše (8) mogu se naći u svakom kemijskom laboratoriju, i to u različitim veličinama/volumenima te za različite svrhe. Odmjerno posuđe, kao što su menzure (21) i birete (25), također se upotrebljavaju u svim kemijskim laboratorijima. Boca za odsisavanje (6) najčešće se upotrebljava zajedno s Büchnerovim lijevkom (24) za filtraciju pri sniženom tlaku. Za filtraciju pri sniženom tlaku može se upotrijebiti i lijevak s poroznim dnom (18), a za filtraciju pri atmosferskom tlaku mogu se upotrebljavati obični stakleni lijevci. Obični lijevci (17) mogu biti i plastični, a oni s kratkim vratom mogu se upotrebljavati za dodavanje praškastog materijala. Okrugle i kruškolike tikvice (9) obično se upotrebljavaju za uparavanje otapala na rotacijskom uparivaču. Dugačke cijevi različitih duljina i promjera i s pipcem na donjem suženom dijelu (12) često se upotrebljavaju za izvođenje gravitacijske kromatografije na stupcu. U aparaturnama za refluksiranje (= zagrijavanje otopine do temperature vrenja) te za različite destilacije upotrebljavaju se hladila: najjednostavnije je Liebigovo hladilo (13) s ravnom unutarnjom cijevi koje se upotrebljava pri jednostavnim destilacijama, a bez medija za hlađenje može se upotrebljavati i kao zračno hladilo; Allihnovo hladilo (14) poznatije je kao hladilo za refluksiranje, a Grahamovo hladilo (15) ima spiralnu unutarnju cijev. Kod svih navedenih hladila pare otapala koje treba hladiti prolaze kroz unutarnju cijev, dok medij za hlađenje ispunjava vanjsku cijev hladila. Kod rotacijskih uparivača obično se upotrebljava (Dimrothovo) hladilo u kojemu pare prolaze kroz vanjsku cijev, a medij za hlađenje kroz unutarnju. U laboratoriju se još može naći boca ispiralica (19) (Drechselova boca) koja se upotrebljava za pranje i sušenje plina. Konačno, za miješanje reakcijskih smjesa najčešće se upotrebljavaju magnetske miješalice (20) s pločama za zagrijavanje ili bez njih.

Tijekom ovog Praktikum studentski će u sklopu pojedinih vježbi i sinteza primjenjivati osnovne metode i tehnike rada koje se primjenjuju za čišćenje, izolaciju i identifikaciju organskih spojeva (filtracija, ekstrakcija, prekrystalizacija, destilacija, kromatografija, mjerenje temperature taljenja i vrenja, spektroskopske metode). Veći dio tih metoda i tehnika studenti su upoznali i primjenjivali na prethodnim kemijskim praktikumima. U ovoj skripti detaljnije se opisuju postupci koji su najznačajniji za primjenu u organskoj kemiji. Očekuje se da student dobro prouči svaku metodu koja će se primjenjivati u određenoj vježbi prije izvođenja same vježbe. Poznavanje teoretske osnove tih metoda trebat će pokazati u okviru ulaznih kolokvija.

Osobni pribor i zaštitna oprema

Student na Praktikum treba donijeti:

- bijelu zaštitnu kutu (dugi rukavi!) i zaštitne naočale
- gumene rukavice (zaštita protiv kemikalija!, preporučuju se nitrilne)
- dvije krpe

- upaljač i/ili šibice
- škariće
- pincetu
- stare (čiste!) boćice od lijekova (ili slično) za konaćne produkte reakcija (20 - 100 ml)
- marker za staklo
- naljepnice
- veliku bilježnicu s crtama – za vođenje laboratorijskog dnevnika tijekom izvođenja vježbi i za pisanje referata (može biti u istoj bilježnici, ali odvojeno).

Prisprema za ulazne kolokvije

Prije početka rada u Praktikumu i izvođenja određene vježbe, student se treba pripremiti za polaganje ulaznog kolokvija. Studentima koji ne polože ulazni kolokvij neće biti dozvoljeno izvođenje vježbe. Naime, od vježbe nema koristi ako se ne razumije što se i zašto se radi. Usto, takav rad može biti i opasan i za onog koji radi i za druge.

Studentu je za pripremu ulaznog kolokvija potreban ovaj udžbenik. Obavezno treba proučiti cjelokupni opis vježbe, što uključuje teoretski uvod u vježbu i sam opis postupka. Također, preporučuje se proćitati literaturu navedenu na kraju ovog udžbenika kao i bilo koji udžbenik organske kemije kako bi se bolje razumjela teorijska podloga vježbe koja će se raditi.

Osim ućenja teoretskog dijela vježbi, student se treba pripremiti i za sigurno rukovanje kemikalijama. Stoga će se na svakom ulaznom kolokviju provjeravati i poznavanje opasnosti i sigurnosnih mjera vezanih za sve kemikalije koje se upotrebljavaju u vježbi. Te podatke student treba potražiti u okviru „Sigurnosno-tehničkog lista” (*engl.* (Material) Safety Data Sheet, (M)SDS) koji se može lako pronaći na internetskim stranicama, primjerice na stranici: <http://www.sigmaaldrich.com/european-export.html> (odabrati pod Country – Croatia kako bi se dobio dokument na hrvatskom jeziku). Posebnu pozornost treba obratiti na oznake upozorenja, izjave opasnosti i mjere predostrožnosti, mjere prve pomoći, prikladna sredstva za gašenje požara te uvjete koje treba izbjeđavati (stabilnost i reaktivnost). Najvažnije opasnosti i rizici vezani uz upotrebu određene kemikalije u ovom su udžbeniku istaknuti u popisu materijala/kemikalija potrebnih za pojedinu vježbu te se očekuje da student o tome vodi računa prije samog početka i tijekom rada.

Oznaćavanje boćice s produktom dobivenim na kraju vježbe

Na kraju vježbe svaki proćišćeni i osušeni produkt sinteze ili izolacije iz prirodnog materijala treba pohraniti u odgovarajuću boćicu za uzorak i predati voditelju laboratorija. Boćice trebaju donijeti sami studenti prije početka Praktikuma. Obično se upotrebljavaju prazne boćice lijekova koje treba oprati

i osušiti. Čistu i osušenu bočicu treba izvagati, prvo praznu, a onda s produktom. Na bočicu treba naljepiti naljepnicu sa sljedećim podacima:

Datum završetka vježbe	Ime i prezime studenta/ice
Broj vježbe i naziv spoja	
t_v ili $t_t = \text{od} - \text{do } ^\circ\text{C}$	B. masa bočice s uzorkom / g <u>T.</u> masa čiste prazne bočice /g N. masa čistog uzorka / g

VOĐENJE LABORATORIJSKOG DNEVNIKA I PISANJE REFERATA

Tijekom izvođenja vježbe student treba voditi **laboratorijski dnevnik**. Vođenje laboratorijskog dnevnika obuhvaća bilježenje važnih podataka tijekom samog Praktikum, primjerice treba zapisati točne količine upotrijebljenih kemikalija, izmjerene temperature taljenja i vrenja, opažanja kao što su promjene boje, miris, oslobađanje plina i slično te svako odstupanje od postupka opisanog u propisima. Nakon izrade svake pojedine vježbe piše se izvještaj o provedenoj vježbi = **referat**. Referati se pišu u dopisnu knjigu ili bilježnicu na crte A4 formata. Referati i laboratorijski dnevnik mogu se pisati u istoj bilježnici, ali ih treba jasno odvojiti. Laboratorijski dnevnik čine zabilješke koje služe samom studentu kao podsjetnik za pisanje referata, stoga se pišu običnom olovkom i u obliku natuknica. Laboratorijski dnevnik u pravilu se ne pregledava i ne ocjenjuje pa nije potrebno posebno paziti na urednost, već samo na točnost zapisanih podataka. S druge strane, referati se pregledavaju i ocjenjuju pa trebaju biti uredni i što detaljniji; pišu se kemijskom olovkom, osim aparatura koje se crtaju običnom olovkom. Referati se trebaju predati nakon svake završene vježbe, a na kraju Praktikum student treba nastavniku za pohranu predati kopije svih pregledanih i ocijenjenih referata za sve vježbe.

Na početku svakog referata, odnosno u njegovu zaglavlju, treba napisati **datum te broj i naslov vježbe**. Nakon zaglavlja pišu se upotrijebljene **kemikalije** i njihove količine, ali se ne prepisuje popis posuđa i pribor. Upotrijebljeno posuđe i pribor mogu se navesti u opisu vježbe, primjerice značajno je da li se zagrijavalo plamenikom ili grijaćom pločom; je li se odsisavanje kristala izvelo preko Büchnerova lijevka ili lijevka po Hirschu itd. Nakon popisa kemikalija opisuje se **postupak**. Izvještaj se vodi u prvom licu jednine te student opisuje postupak svojim riječima i točno onako kako se postupak provodio. Ne smije se prepisivati postupak iz propisa te će student biti kažnjen smanjivanjem ocjene pokaže li se da je doslovce prepisao postupak iz propisa. U opisu postupka potrebno je zabilježiti točnu masu upotrijebljenih reagensa i veličinu laboratorijskog posuđa te vrijeme utrošeno na rad. Jednako se tako bilježe moguća potrebna odstupanja od propisa, učinjene greške, nezgode koje rezultiraju gubitkom (dijela) produkta i slično.

Nakon opisanog postupka crtaju se (običnom olovkom!) **skice** upotrijebljene **aparature**. Uz aparaturu treba napisati naslov, primjerice „Aparatura za destilaciju etera“, a na slici označiti najvažnije dijelove. Ne treba crtati detalje poput gumenih cijevi hladila spojenih na vodu, odnosno izljev, ali treba naznačiti mjesto ulaska i izlaska vode iz hladila (npr. strelicama). Treba naznačiti stalke i hvataljke s obujmicama, ali ništa ne treba crtati „trodimenzionalno“. Nakon crteža pišu se **kemijska jednadžba reakcije, mehanizmi i račun** te konačno **iskorištenje reakcije**, dakle, eksperimentalni podatci. Osnova za ovaj račun jest teorijsko iskorištenje reakcije. Ono se izračunava prema reak-

tantu koji je u manjku s obzirom na stehiometriju reakcije. Zatim se u postotcima izračunava omjer literaturnog (ako postoji!) i teorijskog iskorištenja, vlastitog i teorijskog, te vlastitog i literaturnog iskorištenja. Pri izolacijama prirodnih spojeva u postotcima se navodi omjer vlastitog i literaturnog iskorištenja. Također treba navesti izmjerene temperature taljenja i/ili vrenja te treba priložiti snimljene spektre. Nakon eksperimentalnih podataka pišu se **opažanja** – ono što se posebno želi izdvojiti i naglasiti o reakciji, odnosno eksperimentu koji se provodio. Potrebno je zapisati sve uočene promjene i zapažanja, primjerice promjenu boje tijekom reakcije, miris, oslobađanje plinovitog produkta, taloženje i slično. Slijedi **zaključak** – nekoliko rečenica o onome što se naučilo ili potvrdilo/dokazalo izvođenjem vježbe. Na kraju referata treba riješiti dodatni **pismeni zadatak** iz skripte.

Primjer pisanja referata (*piše se kemijskom olovkom*):

Datum izvođenja vježbe

3. Nukleofilna acilna supstitucija – esterifikacija

Sinteza metil-benzoata

KEMIKALIJE:

benzojeva kiselina	6,1 g (0,05 mol)
metanol	12,5 ml (9,88 g, 0,31 mol)
konc. H ₂ SO ₄	1,5 ml (katalizator) itd.

POSTUPAK: Opisati postupak u 1. LICU JEDNINE onako kako ste zaista radili – ne doslovce prepisivati propise!!! Posebno naglasiti svaka odstupanja, neočekivane situacije ili nezgode, točne očitane temperature, posuđe i pribor koji su stvarno upotrijebljeni i sl.

SKICA APARATURE: Nacrtao olovkom, naznačiti glavne dijelove, navesti naziv aparature (npr. Aparatura za filtraciju pri sniženim tlakom; Aparatura za jednostavnu destilaciju itd.).

MEHANIZAM REAKCIJE: Napisati točan i što detaljniji mehanizam reakcije (npr. mehanizam nukleofilne acilne supstitucije za dobivanje estera, *ovdje* metil-benzoata).

EKSPERIMENTALNI PODATCI: npr. račun iskorištenja (vlastito u odnosu na teorijsko i u odnosu na literaturno, ako postoji), temperature taljenja ili vrelišta, snimljeni spektri spojeva (IR, UV), tablice itd.

OPAŽANJA: promjene boje i drugi uočeni učinci/promjene, posebni uvjeti reakcije ili bilo što je važno za komentirati i naglasiti.

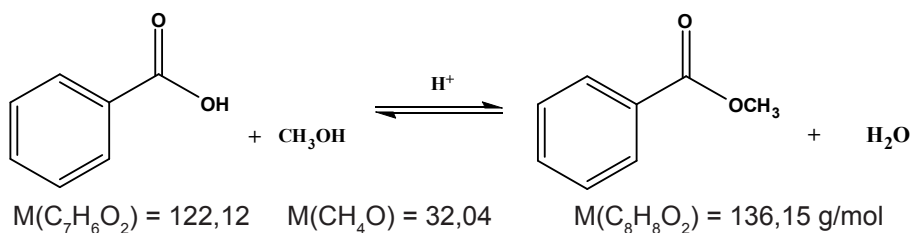
ZAKLJUČAK: nekoliko rečenica o onome što je najznačajnije u vježbi te što ste naučili i usvojili izvođenjem određenog eksperimenta. Traži se vlastiti osvrt na izvedenu vježbu!

ZADATAK: Samostalno riješiti zadatak iz skripte koji se traži na kraju vježbe. Pri rješavanju zadatka treba se koristiti cjelokupnom literaturom koja se preporučuje za kolegij, ali i ostalim dostupnim izvorima, primjerice internetskim stranicama. Glavni cilj ovog zadatka jest samostalno rješavanje, stoga će se svako prepisivanje kažnjavati, i to prvenstveno smanjivanjem ocjene referata!

Primjer računa iskorištenja

Izračunati iskorištenje reakcije esterifikacije u sintezi metil-benzoata: vlastito prema teoretskom te vlastito prema literaturnom.

Jednadžba reakcije:



Kemikalije:

benzojeva kiselina	6,1 g (0,05 mol)
metanol	12,5 ml (9,88 g, 0,31 mol)
konc. H_2SO_4	1,5 ml (katalizator)

Izračunati iskorištenja ako je student dobio u vježbi **4,6 g**, a literaturno iskorištenje $m_{lit} = 6 \text{ g}$.

Račun:

Metanol se upotrebljava u suvišku pa se iskorištenje računa prema benzojevoj kiselini (0,05 mol). Iz jednadžbe reakcije vidi se da 1 mol benzojeve kiseline daje 1 mol metil-benzoata (estera) pa je $n(\text{estera}) = 0,05 \text{ mol}$.

Teoretska masa metil-benzoata:

$$m_t = n \times M = 0,05 \text{ mol} \times 136,15 \text{ g/mol} = 6,8075 \text{ g}$$

$$\text{Iskorištenje (literaturno/teoretsko)} \eta = 6 / 6,8075 = 88 \%$$

$$\text{Iskorištenje (vlastito/teoretsko)} \eta = 4,6 / 6,8075 = 67,6 \%$$

$$\text{Iskorištenje (vlastito/literaturno)} \eta = 4,6 / 6 = 76,7 \%$$

1. Pročišćavanje krutine [1] [2]

U okviru sinteze novih organskih spojeva ili izolacije prirodnih materijala organski kemičar najčešće se susreće s problemom dobivanja čistog spoja iz heterogenih ili homogenih smjesa. Metode koje upotrebljava u rješavanju ovog problema uključuju klasične postupke kao što su prekrystalizacija, filtriranje, razne vrste destilacija, ekstrakcija i kromatografske metode.

Nakon sinteze ili izolacije nekog organskog spoja te njegova pročišćavanja slijedi identifikacija pročišćenog spoja. Ako se radi o spoju koji je već opisan u kemijskoj literaturi, treba odrediti fizikalna svojstva (talište, vrelište, indeks loma, R_f -vrijednost) pripravljene supstancije i usporediti ih s podatcima iz literature.

Identifikacija novog spoja koji nije opisan u literaturi mnogo je zahtjevnija i prvi je preduvjet da tvar bude što čišća. Struktura novog spoja određuje se primjenom različitih eksperimentalnih, najviše spektroskopskih, metoda. Primjerice, primjenom infracrvene spektroskopije (IR) utvrđuje se koje su funkcionalne skupine prisutne u spoju, a ponekad je korisno utvrditi i koje funkcionalne skupine sigurno nisu prisutne, što se također potvrđuje snimanjem IR spektra. Tijekom određivanja strukture organskog spoja neophodna je spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR), posebice ^1H (protonska) i ^{13}C NMR. Za spojeve koji apsorbiraju u ultraljubičastom (UV) i vidljivom (vis) dijelu elektromagnetskog spektra primjenjuje se i UV/vis spektroskopija. Elementarnom analizom određuju se maseni udjeli elemenata u spoju, a masena spektrometrija (MS) može dati informaciju o molarnoj masi spoja, ali i o nekim značajkama strukture, ovisno o MS metodi koja se upotrebljava. Kristalografskom analizom s pomoću x-zraka može se odrediti raspored svih atoma u prostoru, dakle, „stereokemija” spoja.

Valja napomenuti da su uglavnom sve metode identifikacije komplementarne, što znači da se na osnovi samo jedne metode ne može utvrditi je li doista riječ o pretpostavljenoj strukturi nekog spoja. Ispitivana tvar može se sigurno identificirati samo razmatranjem skupa podataka, i to fizikalnih konstanti tvari, kemijskih osobina, te interpretacijom spektara spoja. U okviru ovog Praktikumma pretpostavlja se da se studenti prvi put susreću s organskom kemijom u praktikumu, stoga nije predviđeno utvrđivanje strukture novih spojeva, ali će se nastojati da studenti upoznaju iz prve ruke što više spektroskopskih metoda snimanjem i analizom spektara poznatih spojeva koji se priređuju u vježbama ovog Praktikumma.

Jedan od najčešćih postupaka u kemijskom laboratoriju, pa tako i organskom, jest filtracija. Stoga će se studenti prije izvođenja predviđenih vježbi upoznati (ili podsjetiti) s tim postupkom te prirediti nekoliko filter-papira za vježbe koje će izvesti tijekom ovog praktikuma, a koje uključuju filtriranje preko nabranog (naboranog) filter-papira pri vrućoj prekrystalizaciji (slika 2) te odsisavanje kristala preko Büchnerova lijevka (slika 3).



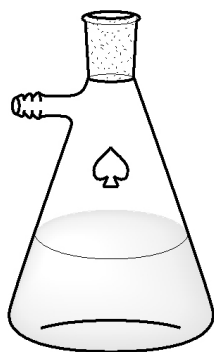
Slika 2. Nabrani filter-papir za vruće filtriranje

Filtracija je postupak odvajanja krute od tekuće faze neke heterogene smjese preko filter-papira. U pravilu se razlikuju dvije osnovne vrste filtracija: ona u kojoj filtracija služi kako bi se izdvojio produkt koji je iskristalizirao ili istaložio iz otopine te ona u kojoj je željeni produkt dio filtrata (tekuće faze), a iz te se otopine želi ukloniti neke krute nečistoće ili sredstvo za sušenje (primjerice, magnezijev sulfat, $MgSO_4$). Ovisno o cilju filtracije, odabiremo način na koji se ona provodi. Filtracija se najjednostavnije može provesti s pomoću gravitacije tako da se smjesa ulije u obični lijevak s filter-papirom u obliku stošca. Na ovaj način možemo skupljati kristale produkta na filter-papiru. Kod vruće filtracije na filter-papiru želimo zadržati krute, netopljive nečistoće, a vrući filtrat treba što brže proći kroz lijevak kako se produkt ne bi počeo kristalizirati na filter-papiru. Tada se najčešće upotrebljava nabrani filter-papir (slika 2) koji ima mnogo veću površinu od stožastog, čime se postiže brža filtracija.

Kad želimo skupiti kristale produkta, filtrat se može još učinkovitije i brže ukloniti **filtracijom pri sniženom tlaku** koji se postiže primjenom vakuumske sisaljke ili vakuumske pumpe. Aparatura za filtraciju pri sniženom tlaku sastoji se od Büchnerova lijevka koji je gumenim prstenom pričvršćen na bocu (ili epruvetu) za odsisavanje (slika 3a), a između odsisne boce/epruvete i vakuumske sisaljke ili pumpe uvijek treba biti zaštitna (npr. Wulffova) boca (slika 3b). Za male količine krutog produkta umjesto Büchnerova lijevka obično se upotrebljava Hirschov lijevak koji, kao i Büchnerov, ima rupičasto dno, ali nagnute stijenke lijevka (kao kod običnog lijevka). Kad se priprema okrugli filter-papir, treba paziti na to da mu promjer bude manji od promjera Büchnerova/Hirschova lijevka (papir ne smije dirati stijenke lijevka!), ali papir treba prekriti perforaciju lijevka. Danas se za filtraciju pri sniženom tlaku sve više

upotrebljavaju stakleni lijevci s poroznim dnom („sinter” lijevci) u kojima filter-papir nije potreban, već se odabire lijevak s potrebnom manjom ili većom poroznošću, ovisno o tome je li krutina koja se skuplja u obliku krupnijih čestica ili finog taloga.

Pri izvođenju filtracije pri sniženom tlaku treba voditi računa o redosljedu radnji. Kad se upotrebljava vodena sisaljka, najprije se otvara voda koja protječe kroz vodenu sisaljku, zatim se zatvara pipac na zaštitnoj boci koji omogućava stvaranje vakuuma i tek se onda boca (ili epruveta) za odsisavanje priključuje na vakuum i započinje se s filtracijom. Kaša s kristalima koji se žele skupiti odsisavanjem prebacuje se u lijevak, a stvoreni podtlak povlači filtrat u odsisnu bocu/epruvetu. Kristali u lijevku mogu se pritiskati špatulom ili staklenim čepom kako bi se dodatno ubrzalo uklanjanje filtrata. Kristali se mogu prati malim količinama otapala, ali tako da se prije svakog dodavanja otapala isključi veza s vakuumom i da se vakuum ponovno priključi nakon dodavanja otapala. Kad je filtracija završena, najprije se izjednači tlak sustava s vanjskim tlakom (otvaranjem pipca na zaštitnoj boci), a tek se na kraju prekida mlaz vode. U protivnome voda iz sisaljke može doći u filtrat, a upravo zaštitna boca služi kao dodatna zaštita da se to ne dogodi. Umjesto vodene sisaljke, za stvaranje vakuuma često se upotrebljava vakuumska pumpa. Filtracija pri sniženom tlaku u radu s vakuumskom pumpom slična je prethodno opisanom postupku s vodenom sisaljkom. Razlika je u tome što otvaranje vodenog mlaza u sisaljci odgovara uključivanju pumpe ili otvaranju vakuum-ventila (u sustavima u kojima je više radnih mjesta povezano i priključeno na rad jedne pumpe).



a)



b)

Slika 3. a) Boca za odsisavanje; b) Aparatura za filtraciju pri sniženom tlaku

a) Ekstrakcija i taloženje

Ekstrakcija je vrlo važan postupak izolacije i čišćenja organskih tvari, a podrazumijeva prevođenje tvari iz krute ili tekuće faze u neko otapalo. Kad govorimo o ekstrakciji kao postupku za izolaciju produkta, to obično podrazumijeva da se produkt iz reakcijske smjese prevodi, odnosno ekstrahira, u odgovarajuće otapalo, a nečistoće ostaju u polaznoj fazi. Nasuprot tome, čišćenje

produkta ekstrakcijom obično znači da se nusprodukti i ostale nečistoće odgovarajućim otapalom uklanjaju iz reakcijske smjese. Za provođenje učinkovite ekstrakcije u oba slučaja otapalo se ne smije miješati s polaznom fazom i tvar koja se želi prenijeti treba u tom otapalu biti topljivija nego u polaznoj fazi. Organski se spojevi uglavnom mnogo bolje otapaju u organskim otapalima nego u vodi pa se iz vodenih otopina ili suspenzija sirove tvari ekstrahiraju u organsku fazu. Ako se ekstrahira iz tekuće faze, govori se o ekstrakciji tekuće-tekuće, a u slučaju prijenosa tvari iz čvrste faze, riječ je o ekstrakciji čvrsto-tekuće (najčešće se upotrebljava pri izolaciji prirodnih materijala).

Pri ekstrakciji tekuće-tekuće, tvar se raspodjeli između dviju tekućih faza, od kojih je jedna obično vodena, a druga organsko otapalo, i koje se uzajamno ne miješaju. Omjer (množinskih ili masenih) koncentracija tvari u dvama takvim otapalima stalan je i naziva se **Nernstovim zakonom razdjeljenja**:

$$K = c_1 / c_2$$

pri čemu je:

K – koeficijent razdjeljenja ili distribucije
(konstantan pri određenoj temperaturi),

c₁, c₂ – koncentracije tvari u dvama otapalima.

Nernstov zakon vrijedi samo za idealne uvjete, za male koncentracije i kad otopljena tvar u obje faze ima jednak stupanj asocijacije. Osim toga, pri izboru organskog otapala za ekstrakciju treba voditi računa da su ispunjeni i sljedeći uvjeti:

- otapalo ne smije reagirati s tvarima koje se žele ekstrahirati (mora biti kemijski inertno prema tim tvarima)
- organska tvar koja se ekstrahira treba biti što topljivija u tom otapalu (što veći c_1), a što manje u drugom, odnosno treba biti što veća vrijednost koeficijenta razdjeljenja
- otapalo treba imati što veću razliku u gustoći od polazne faze
- otapalo ne smije imati previsoko vrelište kako bi se moglo lakše ukloniti (do 100 °C)
- prednost se uvijek daje otapalima koja su jeftinija, a manje štetna i opasna.

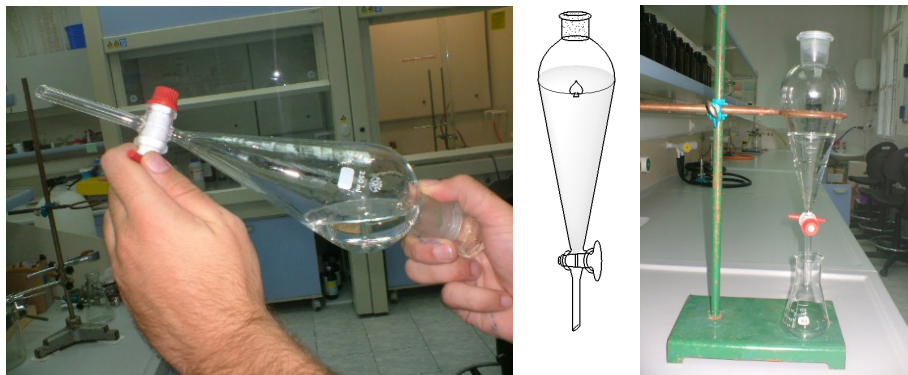
Ekstrakcija tekuće-tekuće izvodi se u lijevku za odjeljivanje gdje je velika dodirna površina između tekućih faza. Izmućkavanjem se dodirna površina između faza dodatno povećava pa se takvim postupkom pospješuje brzi prijelaz tvari iz jedne faze u drugu. S obzirom na to da se tvar raspodjeljuje u dvije faze tako da je konačan omjer koncentracija te tvari u dvije faze uvijek isti (Nernstov zakon!), bolji učinak postiže se višestrukom ekstrakcijom manjim obrocima otapala nego jednokratnom upotrebom cijele količine otapala. U pravilu se ekstrakcija ponavlja tri, a minimalno dva puta.

Dvije tekuće faze u lijevku za odjeljivanje trebaju se mučkati dovoljno snažno kako bi se omogućio prijelaz tvari, ali ne prejako kako se ne bi stvorila emulzija. Kod tekućih faza, gdje se primijeti stvaranje emulzije, lijevak treba nježno njihati umjesto jakog mućkanja njegova sadržaja. Ako je u lijevku za odjeljivanje već nastala emulzija, ona se može izbistriti zasićenjem vodene faze natrijevim kloridom ili se lijevak jednostavno ostavi stajati dulje vrijeme. Pri ekstrakciji tvari koje su djelomično topljive u vodi, natrijev klorid (ili neka druga anorganska sol dobro topljiva u vodi) često se dodaje i prije stvaranja emulzije kako bi se ona spriječila i kako bi se smanjila topljivost te tvari u vodi (tzv. izoljavanje iz vodene otopine). Naime, tada se vrijednost konstante razdjeljenja K povećava uslijed povećanja ionske jakosti vodenog sloja.

Pri punjenju lijevka za odjeljivanje treba voditi računa o ukupnom volumenu otopine koji ne smije biti veći od 2/3 volumena lijevka. Nakon punjenja lijevak se začepi i preokrene tako da se jednom rukom stalno pridržava gornji dio s čepom, dok je donji dio lijevka s ispusnom cijevi i pipcem okrenut prema gore (slika 4). Potom se radi izmućkavanje, a povremeno je potrebno otvarati pipac kako bi se izjednačili unutarnji i vanjski tlak. Nakon nekoliko izmućkavanja i otvaranja pipca (ispusna cijev uvijek je okrenuta prema gore!) lijevak se ponovo okrene u normalan položaj i stavi na metalni prsten te odčepi. Treba napomenuti da studenti dosta često stave lijevak na metalni prsten nakon mućkanja, ali zaborave maknuti čep. Zbog toga se nekad dogodi da čep odleti uslijed pritiska para otapala u lijevku, a nekad se studenti čude zašto otvaranjem pipca na lijevku otapalo ne izlazi, a ne primjećuju da nisu maknuli čep. Nakon vidljivog odjeljivanja faza donji se sloj ispusti u čašu ili tikvicu otvaranjem pipca, a gornji se sloj izlije preko gornjeg otvora u drugu posudu. Pritom treba razmišljati o tome što se nalazi u gornjem, a što u donjem sloju, odnosno je li organsko otapalo koje odvajamo veće ili manje gustoće od vode, konačno, da bismo znali koji sloj skupljamo, a koji bacamo. Otapala lakša (tj. manje gustoće) od vode primjerice su dietil-eter i benzen, a teža su klorirana otapala kao što su diklormetan i kloroform. Sve organske faze dobivene višestrukom ekstrakcijom (rekli smo da se ekstrakcija izvodi najmanje dva, a najčešće tri puta!) spajaju se i suše sredstvima za sušenje (npr. $MgSO_4$, Na_2SO_4 , $CaCl_2$). Naime, tijekom ekstrakcije organskih tvari nekim otapalom iz vodene otopine ili suspenzije, kao i nakon pranja tekućina i otopina, uvijek se otapa i određena količina vode u organskoj fazi pa tu vodu treba ukloniti sušenjem. Organsko otapalo „suši” se tako da mu se izravno doda sredstvo za sušenje u potrebnoj količini. Koliko sredstva za sušenje treba dodati ovisi o samom uzorku i koliko zaostale vode zadržava. U pravilu, uvijek je bolje dodati malo više sredstva za sušenje, nego premalo. **Sredstva za sušenje** anorganske su soli poput natrijeva sulfata koja za ovu svrhu trebaju biti bezvodna, a koja imaju veliki afinitet za vezanje vode. Zato su sredstva za sušenje najčešće u obliku finog praha dok su suha, a kad u uzorku vežu vodu, stvaraju se njihove nakupine. Tako se može vizualno procijeniti koliko sredstva za sušenje treba dodati jer se dodaje onoliko za koliko se vidi da stvara „grudice”. Kad više nema slobodne vode

koja bi se vezala, svaka dodatna količina sredstva za sušenje ponovo ostaje praškasta u uzorku. Prije svakog novog dodavanja sredstva za sušenje treba pomiješati sadržaj tikvice. Tikvica s otapalom koje se suši treba biti dobro zatvorena cijelo vrijeme tijekom sušenja (15 – 30 minuta).

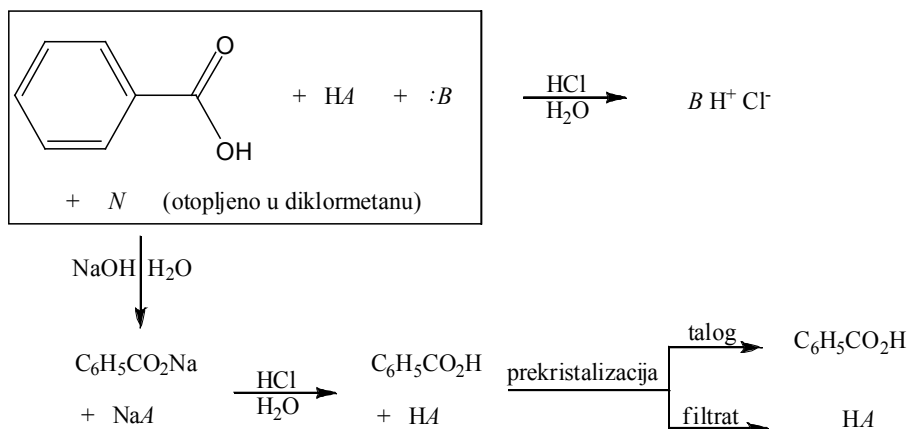
Kod tzv. **ekstrakcije reaktivnom otopinom** izmučkanje se izvodi razrijeđenim otopinama lužina, odnosno kiselina da bi se uklonile kisele, odnosno bazične primjese. Pritom treba imati na umu da se pri pranju otopinama Na_2CO_3 ili NaHCO_3 razvija CO_2 te se nastali plin mora često i oprezno ispuštati otvaranjem pipca.



Slika 4. Rad s lijevkom za odjeljivanje (ekstrakcija)

U ovoj vježbi student treba pročistiti benzojevu kiselinu za koju se pretpostavlja da sadržava organska onečišćenja baznog (B), neutralnog (N) i kiselog karaktera (HA).

Shema postupka za pročišćavanje benzojeve kiseline:



Kemikalije:

sirova benzojeva kiselina	2,5 g	nadražuje dišni sustav, opasno za oči
diklormetan	25 ml	nadražujuće, otrovno (kancerogeno?)
HCl ($c = 6 \text{ mol/l}$)	20 ml +	za prevođenje benzoata u benzojevu kiselinu izaziva opekline, nadražuje dišni sustav
NaOH ($c = 3 \text{ mol/l}$)	20 ml	izaziva teške opekline
lakmus-papir		
led		

Pribor:

Lijevak za odjeljivanje od 100 ml; čaše od 100 do 250 ml; menzure; stakleni štapić; Büchnerov lijevak; odsisna boca.

Postupak:

Iz uzorka sirove benzojeve kiseline odvoji se nekoliko miligrama (koliko stane na vrh spatule) i stavi u kapilaru za određivanje tališta. Kapilara se spremi za treći dio ove vježbe (c) određivanje temperature tališta). Ostatak dobivenog uzorka točno se izvaži i vrijednost odvage zapiše se u laboratorijski dnevnik, a potom se uzorak stavi u lijevak za odjeljivanje od 100 ml. U lijevak se doda 25 ml diklormetana (radi se u digestoru i s rukavicama!) i, mučkajući krutine, otopi. Zatim se doda 10 ml solne kiseline ($c = 6 \text{ mol/l}$) i sadržaj se izmučka prema prethodno opisanom postupku. Nakon vidljivog razdvajanja dviju tekućih faza u lijevku, donji se sloj (= diklormetan koji sadržava benzojevu kiselinu te neutralne i kisele nečistoće) ispusti u čašu, a gornji, odnosno vodeni sloj odbaci se (sadržava bazne nečistoće prevedene u soli topljive u vodi). Ekstrakcija se ponovi još jednom tako što se diklormetanski sloj vrati u lijevak i doda se novih 10 ml solne kiseline. Sljedeći je korak pranje diklormetanskog sloja od zaostatka kiseline. Dakle, nakon što se odbacio i drugi vodeni kiseli ekstrakt, ponovno se u lijevak vrati diklormetanski sloj kojemu se doda 10 ml vode. Nakon izmučkavanja, slojevi se odijele kao kod prve dvije ekstrakcije i ponovno se baca gornji, vodeni sloj. Isti postupak pranja vodom treba ponoviti još jednom. Diklormetanski sloj potom se vraća u lijevak i dodaje se 10 ml natrijeva hidroksida ($c = 3 \text{ mol/l}$). Nakon izmučkavanja i razdvajanja faza donji sloj (sadržava diklormetan i u njemu otopljene neutralne nečistoće) ispusti se u čašu, a gornji se sloj, koji predstavlja vodeni bazični ekstrakt (sadržava natrijevu sol benzojeve kiseline), prebaci u čistu čašu od 100 ml. Diklormetanski sloj još se jednom vraća u lijevak i ponovno se dodaje 10 ml NaOH te se sadržaj izmučka. Donji, diklormetanski sloj ispusti se u čašu i ovaj put baci u pripremljenu bocu za organski otpad. Gornji sloj, bazični vodeni ekstrakt, spoji se s onim iz prethodne ekstrakcije. U tu se čašu potom stavi nekoliko komadića leda (ili se čaša hladi izvana) i, uz miješanje staklenim štapićem, postupno

zakiseli solnom kiselinom ($c = 6 \text{ mol/l}$) do pH 3 – 4 (provjerava se lakmus-papir). Treba razmisliti koliko će solne kiseline trebati dodati za potpuno taloženje (obratiti pozornost na koncentracije i volumene korištenih otopina!) i dodati odmah njezin veći dio, uz oprezno miješanje štapićem i hlađenjem. Tek onda postupno dodavati zadnji dio solne kiseline i štapićem provjeravati pH otopine na lakmus-papiru.

Kad se istaloži sva benzojeva kiselina, kristali se odvajaju s pomoću Büchnerova lijevka prema prethodno opisanom postupku **filtracije pri sniženom tlaku** (slika 3). Kristale (ili talog) benzojeve kiseline treba ispirati u Büchnerovu lijevku s malo hladne vode. Ne zaboravite da prije svakog dodavanja vode za ispiranje kristala treba isključiti dovod vakuuma! Kad se ponovno uključi vakuum, kristale treba dobro pritiskati spatulom ili staklenim čepom kako bi se istisnuo višak vode. Nakon završene filtracije kristale/talog treba prenijeti na lađicu od grubog filter-papira i osušiti do kraja u eksikatoru (Studenti često prebacuju talog iz kojeg nije dovoljno istisnuta voda i onda sušenje traje predugo, stoga svakako treba biti ustrajan s istiskivanjem vode pri filtraciji!). Na lađici s kristalima treba naznačiti svoje prezime (ili inicijale) kako se uzorci ne bi pomiješali, ali nikako ne pisati kemijskom olovkom (može se napisati običnom olovkom, i to s vanjske strane lađice). Kad se talog osuši, ponovno se izdvoji nekoliko miligrama za određivanje tališta.

Zadatak:

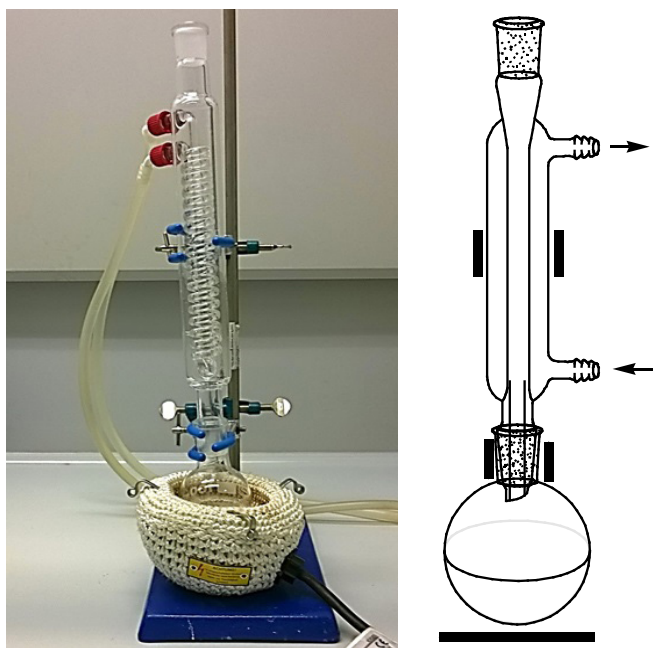
Skicirajte shemu, napišite odgovarajuće kemijske jednadžbe te opišite i objasnite kako biste ekstrakcijom pročistili **anilin** (u shemi označite sa „ PhNH_2 ”) od kiselih (označite sa „ RCOOH ”) i neutralnih nečistoća (označite sa „N”).

b) Prekristalizacija

Organski spojevi koji su pri sobnoj temperaturi krutine najčešće se pročišćavaju prekristalizacijom. Krutina se otopi u vrućem otapalu, a potom se otopina polagano hladi, pri čemu dolazi do kristalizacije pročišćenog produkta zbog njegove manje topljivosti pri nižim temperaturama. Nečistoće ostaju otopljene u hladnom otapalu, osim ako se radi o netopljivim nečistoćama. Netopljivih nečistoća rješavamo se brzom filtracijom vruće otopine. U slučaju obojenih nečistoća, vrućoj otopini dodaje se aktivni ugljen i vruća se otopina zatim profiltrira preko nabranog filter-papira kako bi se uklonile nečistoće adsorbirane na ugljenu. Nakon hlađenja otopine kristali se odvoje odsisavanjem.

Kristali se otapaju u minimalnoj količini otapala tako da se zagrijavanjem dobije zasićena otopina. Ako je otapalo voda, otapanje se izvodi u Erlenmeyerovoj tikvici, a tikvica se može zagrijavati plamenikom preko „azbestne” mrežice (više se ne smije upotrebljavati azbest, ali se još uvijek upotrebljava ovaj naziv!) ili izravno preko grijaće ploče ili magnetske miješalice. Otapanje se u organskim otapalima izvodi u okrugloj tikvici s povratnim hladilom (tzv. aparatura za reflukiranje; slika 5). Tikvica s organskim otapalom obično se zagrijava preko vode-

ne kupelji. Mogu se upotrebljavati i tzv. grijaće kape. Tvari se počinju zagrijavati s malom količinom otapala, a onda se otapalo postupno dodaje kroz hladilo sve dok se krutina ne otopi. Pri otapanju treba izbjegavati taljenje krutine, što se postiže polaganim grijanjem i intenzivnim miješanjem. Pri zagrijavanju plamenikom i grijaćom pločom u tikvicu obavezno treba staviti kamenčiće za vrenje. Ako je otopina obojena zbog prisutnih nečistoća, mora se obezbojiti. U tu se svrhu dodaje aktivni ugljen te se izvodi vruća filtracija (slika 2).



Slika 5. Aparatura za zagrijavanje s povratnim hladilom (refluksiranje)

Za uspješnu je prekrizaciju važan izbor otapala koje mora zadovoljavati sljedeće uvjete:

- tvar koja se želi prekrizirati treba imati što veću topljivost u vrućem otapalu, a što manju u hladnom
- prisutne nečistoće moraju ostati otopljene u hladnom otapalu ili se odvajaju kao potpuno netopljive vrućom filtracijom
- otapalo ne smije reagirati s tvarima koje se prekriziraju
- otapalo ne smije imati previsoko vrelište kako bi se poslije moglo lakše ukloniti sušenjem kristala
- prednost se uvijek daje otapalima koja su jeftinija, manje štetna i manje opasna.

Pri odabiru otapala kreće se od kemijskog načela „slično otapa slično”. Ako ne pronađemo otapalo koje zadovoljava prethodno navedene uvjete, izvodi

se prekrystalizacija iz dvaju otapala i to tako da se tvar najprije otopi u vrućem otapalu u kojem je dobro topljiva. Potom se u tu vruću otopinu do zamućenja dokapava otapalo u kojem je tvar slabo topljiva te hlađenjem nastupa kristalizacija. Obično se upotrebljavaju parovi otapala: etanol/voda, aceton/voda, diklormetan/heksan itd.

Ponekad se, unatoč tome što smo odabrali pogodno otapalo, hlađenjem vrućih otopina ne izlučuju kristali. Tada se kristalizacija može potaknuti trljanjem staklenim štapićem uz stijenku tikvice ili ubacivanjem kristalića čiste tvari. Zadnja mogućnost jest uparavanje dijela otapala jer se teško postiže uparavanje upravo potrebne količine otapala. Treba voditi računa o tome da je tvar koju prekrystaliziramo djelomično topljiva i u hladnom otapalu, što znači da će nakon hlađenja vruće zasićene otopine i nakon kristalizacije pročišćene tvari manji dio ostati otopljen. Zato se za prekrystalizaciju uzima minimalna količina otapala kako bi gubitci bili što manji. Potrebna količina otapala može se izračunati primjenom literaturnih podataka o topljivosti tvari pri temperaturi otapanja (najčešće jednaka vrelištu otapala) ili se, ako se radi o tvari za koju takvi podatci ne postoje, izvodi pokus topljivosti (pogodno otapalo jest ono kod kojeg se 100 mg supstancije može otopiti u manje od 3 ml vrijućeg otapala).

Primjer za račun teorijskog iskorištenja prekrystalizacije benzojeve kiseline iz vode:

- 1) Ako je potrebno 100 ml vode za otapanje 6,64 g benzojeve kiseline pri 100°C, za otapanje 5 g benzojeve kiseline pri 100°C potrebno je **75,3 ml** vode.
- 2) Ako iz literature znamo da će se pri 25°C u 100 ml vode otopiti 0,34 g benzojeve kiseline, to znači da će nakon hlađenja otopine 5 g benzojeve kiseline u **75,3 ml** vode pri 25°C ostati otopljeno 0,25 g benzojeve kiseline.
- 3) Teorijsko iskorištenje prekrystalizacije iznosi dakle $5\text{ g} - 0,25\text{ g} = 4,75\text{ g}$ benzojeve kiseline.

Kemikalije:

ekstrahirana benzojeva kiselina iz prethodnog postupka, aktivni ugljen.

Pribor:

2 Erlenmeyerove tikvice od 100 ili 200 ml; stakleni lijevak s kratkim vratom promjera 5 cm; menzura od 100 ml; Büchnerov lijevak promjera 5 cm; odsisna boca od 100 ili 200 ml.

Postupak:

Benzojeva se kiselina nakon sušenja izvaže i zabilježi se točna masa. Ovisno o masi, izračuna se odgovarajuća količina vode za prekrystalizaciju (6,64 g benzojeve kiseline otapa se u 100 ml vode pri 100°C). U Erlenmeyerovu tikvicu od 100 ml stavi se ekstrahirana benzojeva kiselina i doda se voda iz

menzure. Na Erlenmeyerovu tikvicu stavi se stakleni lijevak s kratkim vratom u kojem se nalazi nabrani filter-papir koji se malo navlaži. Zatim se tikvica zagrijava preko električne grijače ploče do vrenja uz povremeno potresanje. Ako se tvar nije sasvim otopila, treba postupno dodavati male količine vode, stalno zagrijavajući i potresajući, sve dok se sva benzojeva kiselina ne otopi. Tada se tikvica makne s grijače ploče da se otopina malo ohladi, a potom se doda aktivnog ugljena koliko stane na vrh spatule. Aktivni se ugljen nikako ne smije dodavati izravno u vruću smjesu jer bi došlo do pjenjenja i mogućeg izbacivanja smjese iz tikvice! Nakon dodavanja ugljena tikvicu vratiti na ploču i smjesu ponovno kuhati 2 – 3 minute. Zatim lijevak s vlažnim filter-papirom treba s ove tikvice prenijeti na drugu, pripremljenu Erlenmeyerovu tikvicu od 100 – 200 ml. Tikvica s vrućom otopinom obuhvati se oko grla svitkom (filter-)papira ili krpom i filtrira kroz lijevak kako bi se uklonio aktivni ugljen. Studentima se često dogodi da benzojeva kiselina počne kristalizirati već na filter-papiru tijekom same filtracije. Upravo se stoga lijevak s filter-papirom prethodno zagrijava, a dobro je i prethodno ugrijati tikvicu u koju se filtrira te vruću filtraciju provesti oprezno, ali brzo. Filtrat se nakon toga hladi polagano (barem pola sata) i bez potresanja, a nastali kristali prebace se na Büchnerov lijevak na kojem je navlaženi filter-papir i odsišu prema istom postupku koji je opisan kod ekstrakcije u prvom dijelu vježbe (str. 27. – 28.). Pri prebacivanju kristala upotrebljava se spatula, a zaostale se kristale sa stijenki tikvice ispere hladnom vodom na lijevak. Ispiranje hladnom vodom po potrebi se ponavlja nekoliko puta, ali svaki put treba voditi računa o tome da se dovod vakuuma isključi prije dodavanja vode, a tek onda ponovo uključi. Prekristalizirana benzojeva kiselina prenese se na lađicu od filter-papira i osuši do kraja u eksikatoru. Nakon sušenja ponovno se uzme dio uzorka na vrhu spatule za određivanje tališta čiste benzojeve kiseline. Ostatak uzorka usitni se, izvaže i spremi u etiketiranu bočicu – na etiketi su navedeni datum završetka vježbe, ime i prezime, naziv spoja, temperatura vrelišta/tališta, masa bočice bez uzorka **T** i s uzorkom **B** te razlika koja označava masu uzorka **N** (vidi str. 16.). Izračuna se teorijsko iskorištenje prekristalizacije (vidjeti primjer u uvodu vježbe) te iskorištenje vlastitog prema teorijskom.

Zadatak:

Opišite i objasnite cijeli postupak kako biste prekristalizacijom pročistili uzorak salicilne kiseline ($o\text{-HOC}_6\text{H}_4\text{COOH}$) koji sadržava vrlo male količine nečistoća, od kojih je jedna obojena. Masa uzorka jest 4,7 g, a topljivost salicilne kiseline u vodi iznosi 2,5 g/l pri 25 °C, odnosno 81,2 g/l pri 100 °C.

c) Određivanje temperature taljenja

Talište je važno fizikalno svojstvo krutine i predstavlja temperaturu pri kojoj se čvrsta i tekuća faza tog spoja nalaze u ravnoteži. Tališta čistih tvari konstantna su jer gotovo ne ovise o vanjskom tlaku s obzirom na to da je ravnotežni tlak para nad krutinom nizak. Stoga je talište jedan od važnih kriterija

u utvrđivanju čistoće nekog kristalnog spoja te jedan od kriterija za potvrdu strukture spoja kojem je od ranije poznata vrijednost tališta. Talište se obično mjeri tako što se tijekom postupnog zagrijavanja tvari bilježi raspon temperature od one pri kojoj se uoči stvaranje prvih kapljica oko kristala do one pri kojoj se uoči potpun prijelaz u tekućinu. Ti rasponi mogu biti i do nekoliko stupnjeva °C pa se preporučuje upotreba izraza *temperatura taljenja* t_t , odnosno *talište*, umjesto *točke taljenja*, što bi bio izravan prijevod izraza koji se obično upotrebljava u engleskom jeziku (*melting point*). Neke organske tvari tale se u širem intervalu uz raspad koji se zamjećuje po pjenjenju i/li karboniziranju pa se i to mora navesti uz temperaturu (*engl. decomp*). Također se često bilježi i otapalo koje se upotrijebilo za prekrizalizaciju ako je prethodilo mjerenju tališta. Naime, neke tvari mogu kristalizirati u više od jedne kristalne strukture (polimorfizam!) i te različite kristalne strukture iste tvari mogu imati različita tališta. Koja kristalna struktura nastaje pri prekrizalizaciji često ovisi o otapalu i tada je podatak o otapalu važan pri određivanju i bilježenju tališta.

Uzorak tvari koja ima više nečistoća/primjesa, ima niža tališta i tali se kroz širi temperaturni interval u usporedbi s istom tvari koja je čista ili s manje primjesa. Dakle, što je tvar čišća, to se može očekivati više talište i njegov uži temperaturni raspon. Na taj se način temperatura taljenja, osim za identifikaciju neke tvari (usporedbom tališta s literaturnim te uz ostale metode identifikacije), upotrebljava i za procjenu čistoće te tvari.

Thieleov uređaj (slika 6a) među najpoznatijim je uređajima za određivanje tališta tvari koje se tale do 200 °C. Puni se sumpornom kiselinom ili parafin-
skim uljem ($t_v > 300$ °C) u koje se uroni kapilarica s uzorkom. Tekućina se zagrijava plamenikom preko mrežice, a temperatura se prati termometrom koji je uronjen u tekućinu zajedno s kapilaricom. Za tvari s vrlo visokim talištima mogu se upotrijebiti aluminijski blokovi za zagrijavanje. Kod Fisher-Johnsovih uređaja (slika 6c) supstancija se stavlja između dva stakalca (mogu poslužiti pokrovna stakalca) koja se stave na metalni blok koji se potom zagrijava. Početak i otapanje kristala prate se povećano preko lupe te se istovremeno očitava vrijednost temperature na termometru. Konačno, danas je najjednostavnije temperaturu tališta mjeriti digitalnim uređajima (slika 6b).

Kemikalije:

sirova, ekstrahirana i prekrizalizirana benzojeva kiselina te konačni produkti iz vježbi 4, 5. i 7. (*p*-nitrozofenol, acetilsalicilna kiselina i dibenzilidenaceton).

Pribor:

staklene kapilare; termometar; plamenik; Thieleov uređaj i/li Fisher-Johnsov uređaj i/li Stuartov digitalni uređaj za određivanje tališta.

Priprema kapilarica s uzorkom:

Prije određivanja tališta tvar je potrebno dobro osušiti i usitniti u čistom tarioniku. Tvar se potom unosi u staklenu kapilaru koja je zataljena na jednom

kraju. Budući da je otvor kapilare uzak, potrebno je više puta otvorom kapilare zahvatiti uzorak, a zatim zataljenim krajem lagano lupkati po laboratorijskom stolu kako bi se dobio neprekinuti stupac tvari visine oko 2 mm. Ovo se još učinkovitije postiže propuštanjem kapilare kroz dulju staklenu cijev koja je okomito postavljena prema tvrdoj podlozi. Za sve uzorke treba napraviti prvo, brzo mjerenje kojim se određuje približna vrijednost tališta, a onda drugo mjerenje koje je precizno. Za mjerenje tališta sirove, ekstrahirane i prekristalizirane benzojeve kiseline priredi se po jedna kapilarica za svaki uzorak te jedna kapilarica za prvo, brzo mjerenje, dakle ukupno četiri (4) kapilarice. U kapilaricu za brzo mjerenje najbolje je staviti prekristaliziranu benzojevu kiselinu. Za sve ostale uzorke iz vježbi kojima se određuju tališta (*p*-nitrozofenol, acetilsalicilna kiselina i dibenzilidenaceton) treba prirediti po dvije kapilarice: uvijek jednu za brzo, a drugu za precizno mjerenje.

Postupak – Thieleov uređaj:

Pripremljena kapilara učvršćuje se „gumicom” na termometar koji se zatim uranja u tekućinu za zagrijavanje. Pritom se pazi da gumica ostane iznad tekućine. Sredina stupca tvari čije se talište mjeri treba se nalaziti na sredini živina rezervoara termometra koji treba smjestiti u središnji dio cijevi ispunjene tekućinom visokog vrelišta (sumporna kiselina ili parafinsko ulje). Thieleov aparat brzo se zagrijava preko bočne cijevi malim redukcijskim plamenom za približno određivanje tališta, a nakon toga se pričekava da se uređaj ohladi najmanje 10 °C ispod zabilježene prve, tj. približne vrijednosti tališta. Precizno mjerenje s drugom kapilaricom istog uzorka provodi se tako da se u prvom dijelu mjerenja može malo brže zagrijavati. Brzina zagrijavanja smanji se kad se dođe do vrijednosti koje su blizu (5 do 10 °C ispod) temperature tališta. U laboratorijski dnevnik treba zabilježiti raspon temperature tališta, što znači temperaturu početka taljenja i temperaturu pri kojoj je sva krutina prešla u tekuću fazu. Preostala dva uzorka benzojeve kiseline nakon jednog brzog i jednog preciznog mjerenja mogu se zajedno učvrstiti uz termometar i talište se može odrediti istodobno uz polagano zagrijavanje. Tako se bolje i točnije mogu uočiti razlike u talištima. Završetak svih preciznih mjerenja studenti trebaju izvoditi u prisutnosti nekog od asistenata ili laboranata!

Postupak – Stuartov digitalni uređaj:

Mjerenje se provodi prema uputama na uređaju. Kao i kod Thieleova uređaja, upotrebljavaju se kapilarice s uzorkom i radi se prvo, brzo mjerenje, a potom precizno. Kod Stuartova uređaja moguće je odabrati brzinu zagrijavanja pa se za brzo mjerenje preporučuje odabrati brzinu zagrijavanja od 10 °C u minuti, a za precizno mjerenje 1 – 2 °C u minuti. Zagrijavanje započinje pritiskom na tipku *Start*, a zaustavlja se pritiskom na tipku *Stop*. Pritiskom na tipku *Hold* može se zadržati vrijednost temperature na digitalnom displeju kad je potrebno očitati i zabilježiti temperaturu tališta. Ako se otprilike zna pri kojoj bi se temperaturi uzorak mogao rastaliti, može se upotrijebiti opcija *Plateau* – vrijednost koja se odabere znači da će se uređaj zagrijati do te temperature

brzinom od 20 °C u minuti, a potom se može krenuti s preciznim mjerenjem. Za vrijednost *Plateau* treba odabrati onu temperaturu koja je oko 10 °C ispod očekivane vrijednosti tališta.

Postupak – Fisher-Johnsov digitalni uređaj:

Nekoliko kristalića (manje od 1 mg) osušenog uzorka stavi se između dva stakalca (mogu se upotrijebiti pokrovna stakalca za mikroskopiranje) i sve zajedno se stavi na metalni blok za zagrijavanje. Preko uzorka namjesti se lupa i uređaj se upali (ujedno se uzorak osvijetli). Kontrolni gumb namjesti se na 100 i uzorak se brzo zagrije za približno određivanje tališta. Uređaj se nakon toga treba ohladiti na barem 10 – 15 °C ispod vrijednosti tališta. Tada treba odabrati sporije zagrijavanje za precizno određivanje temperature tališta prema dijagramu na slici 6d. Primjerice, ako se očekuje temperatura tališta na 130 °C, kontrolni gumb treba namjestiti na 54. Pratiti uzorak kroz povećalo i zabilježiti temperaturu kod prve pojave kapljice te kod potpunog prelaska krutine u tekuće stanje (raspon temperature tališta!)

Zadatak:

Napišite u nekoliko rečenica kako biste učenicima 5. i/ili 6. razreda osnovne škole objasnili što je temperatura taljenja neke tvari, kako se ona može izmjeriti i što nam ta vrijednost govori o nekoj tvari.



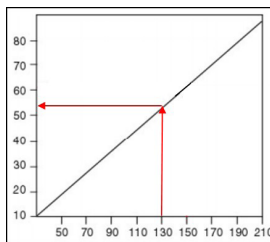
a)



b)



c)



d)

Slika 6. Uređaji za mjerenje temperature taljenja: a) Thieleov uređaj; b) digitalni uređaj za određivanje temperature taljenja (Stuart); c) Fisher-Johnsov uređaj; d) graf za usklađivanje brzine zagrijavanja na Fisher-Johnsovu uređaju s očekivanom temperaturom tališta

2. Kromatografija [1] [2]

Uz prethodno opisane, kromatografija je još jedna česta metoda pročišćavanja organskih spojeva i izolacije produkata iz reakcijskih smjesa. Kromatografijom se pojedine komponente odjeljuju iz smjese na temelju njihove različite adsorpcije na tzv. stacionarnoj fazi i/ili na temelju njihove različite distribucije između *stacionarne* i tzv. *mobilne faze (eluens)*. Stoga se kromatografija obično dijeli na adsorpcijsku i particijsku (razdjelnu). Pri adsorpcijskoj kromatografiji stacionarna je faza kruta, a mobilna faza tekuća (*kromatografija na stupcu, tankoslojna kromatografija, kromatografija na papiru*), dok je pri particijskoj kromatografiji stacionarna faza tekuća, a mobilna faza može biti tekuća ili plinovita (*plinska kromatografija, GC*).

Kromatografija se odvija uspostavljanjem dinamičke ravnoteže nekog spoja između stacionarne faze i eluensa. Dakle, dio neke tvari nalazi se adsorbiran i/ili razdijeljen na stacionarnoj fazi (kruta ili tekuća), a dio te tvari raspodijeljen je u mobilnoj fazi (tekuća ili plinovita). Gibanjem mobilne faze dolazi do narušavanja te ravnoteže i molekule putuju u smjeru gibanja eluensa. Različite vrste spojeva putuju različitim brzinama i tako dolazi do njihova razdvajanja i mogućnosti njihova odjeljivanja.

Na uspješnost kromatografije utječe veći broj različitih čimbenika kao što su veličina i oblik čestica adsorbensa (ako je stacionarna faza kruta), brzina i sastav mobilne faze, omjer mase tvari koja se odjeljuje i stacionarne faze, temperatura sustava itd. Jedan od najvažnijih faktora za uspješnu kromatografiju jest pravilan izbor stacionarne i mobilne faze. U adsorpcijskoj kromatografiji tvar se veže, odnosno adsorbira na krutu stacionarnu fazu. S obzirom na to da su stacionarne faze najčešće polarne (silikagel i Al_2O_3), polarne tvari iz smjese jače se adsorbiraju od manje polarnih, odnosno, nepolarnih tvari. Mobilna je faza otapalo ili smjesa otapala kojima se eluiraju pojedine tvari iz smjese sa stacionarne faze. Ovisno o polarosti otapala, razlikuje se njihova sposobnost eluiranja pojedinih tvari pa, prema poznatom pravilu „slično otapa slično”, polarna otapala lakše eluiraju polarne tvari, a nepolarna otapala nepolarne. Stoga pri izboru najprikladnijeg otapala (ili smjese otapala) treba voditi računa o tome gdje se pojedino otapalo nalazi u tzv. eluotropnom nizu otapala. *Eluotropni niz* najvažnijih otapala, počevši od najpolarnijeg otapala (voda) i u kojem se polarlost smanjuje u nizu, jest:

voda > metanol > etanol > propanol > aceton > piridin > etil-acetat > dietil-eter > kloroform > diklormetan > toluen > tetraklormetan > cikloheksan > petroleter, heksan.

a) Tankoslojna kromatografija (TLC = *thin layer chromatography*)

Tankoslojna kromatografija (TLC) vrsta je adsorpcijske kromatografije u kojoj se adsorbens (najčešće silikagel ili aluminijev oksid) nanosi u tankom sloju na staklenu ploču ili foliju, a eluens je otapalo koje se zbog kapilarnih

sila uspinje po krutom adsorbensu. Ta se metoda najčešće primjenjuje za brzo utvrđivanje (broja) različitih sastojaka smjesa, produkata neke reakcije ili izoliranog prirodnog materijala. Upotrebljava se za praćenje reakcije jer se na kromatogramu može pratiti postupno nestajanje reaktanata i stvaranje produkata. Naposljetku, prije svake kromatografije na stupcu treba s pomoću tankoslojne kromatografije pronaći otapalo optimalne polarnosti koje će dobro odvajati komponente.

Način izvođenja TLC-a opisan je u nastavku. Vrlo mala količina otopljenog uzorka nanese se kapilaram na adsorbens. Nakon što otapalo ishlapi (zato je poželjno upotrebljavati otapalo s niskim vrelištem!) pločica se uroni u otapalo u prozirnoj posudi s poklopcem kao na slici 7a. Količina otapala u posudi za TLC treba biti ona koja će prekriti dno i biti visine do 1 cm, a uzorak na pločici treba biti minimalno 1 cm od ruba – kad se pločica uroni u otapalo, uzorak mora ostati iznad razine otapala. Da bi se posuda dobro zasitila parama otapala i tako pospješilo uspinjanje otapala, često se stavlja i filter-papir urođen u otapalo. Mjesto na pločici na koje se nanosi uzorak označava se kao startna linija, a prije nego što se fronta otapala približi gornjem rubu pločice, pločica se vadi iz otapala i označava se frontna linija, odnosno razina koju je otapalo doseglo na pločici. Pločica se osuši i detektiraju se zone u kojima se nalaze pojedine komponente. Taj postupak zove se obrada kromatograma, a detekcija pojedinih komponenti kromatograma ovisi o tome jesu li one obojene. Mrlje obojenih tvari razdijeljene duž pločice možemo vidjeti već na dnevnom svjetlu (slika 7b). Bezbojne tvari promatraju se pod ultraljubičastim svjetlom (ako su „UV aktivne”, odnosno ako apsorbiraju UV zračenje) ili se učine vidljivim („vizualiziraju se”) prskanjem određenih reagensa, primjerice otopine sumporne kiseline (nakon čega pločicu treba malo zagrijati), otopine vanilina ili izlaganjem pločice parama joda. Kad se upotrebljava sumporna kiselina, na mjestima gdje su pojedine komponente ostat će crne mrlje zbog karbonizacije organskih spojeva. Tako se mogu detektirati gotovo svi organski spojevi, ali je nedostatak metode upotreba (prskanjem!) opasne kiseline. Također, izlaganje pločice parama joda treba raditi u digestoru, ali kromatogram će biti vidljiv samo za one spojeve koji reagiraju s jodom (primjerice adicijske reakcije!), s time da se i takvo obojenje stajanjem najčešće gubi (zato ga odmah treba označiti olovkom!). Za detekciju UV svjetlom upotrebljavaju se tankoslojne pločice kod kojih sloj stacionarne faze sadržava fluorescentni indikator. Ako se takva pločica osvijetli UV svjetlom, na mjestima gdje se nalazi adsorbirana tvar pojavljuju se tamne (ili fluorescentne) zone koje tada treba označiti olovkom.

Osnovni kriterij za identifikaciju spoja jest njegova brzina kretanja na pločici, što se izražava s pomoću R_f -vrijednosti. To je omjer udaljenosti od startne linije koju je prošla mrlja (x) i udaljenosti do koje je stigla fronta otapala (y), dakle $R_f = x / y$.



Slika 7. Aparatura za tankoslojnu kromatografiju (a) i kromatogram smjese pigmenata izoliranih iz špinata (b)

Tankoslojna kromatografija može se upotrebljavati i u preparativne svrhe. Tada se upotrebljavaju tzv. preparativne ploče (obično staklene) koje su pre-svučene debljim slojem krutog adsorbensa. Smjesa se nanosi na startnu liniju širinom cijele ploče, kromatogram se razvije, a nakon vađenja ploče iz otapala i detekcije pojedinih vrpca, slojevi na kojima se nalaze pojedine komponente sastružu se s ploče i ekstrahiraju otapalom. Silikagel se ukloni filtracijom, a otapalo se upari kako bi se izolirala čista komponenta.

b) Kromatografija na stupcu (koloni)

Kromatografija na stupcu vrsta je adsorpcijske kromatografije u kojoj se kao stacionarna faza najčešće upotrebljavaju silikagel ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) ili aluminijev oksid (aloks, Al_2O_3). Za razliku od tankoslojne kromatografije koja se uglavnom upotrebljava za identifikaciju sastojaka smjese, kromatografija na stupcu (koloni) primjenjuje se za njihovo odjeljivanje. Stacionarna se faza može dodavati u kolonu (= najčešće staklena cijev s pipcem ili zračno hladilo) suspendirana u otapalu ili se kao suhi prah polako dodaje u kolonu napunjenu otapalom. Silikagel se u kolonu uvijek ulijeva u obliku suspenzije koja se pripremi tako da se silikagel pomiješa u čaši s otapalom. Aluminijev oksid obično se dodaje praškast, odnosno nesuspendiran. U kolonu se ulije eluens, dok se aluminijev oksid lagano usipava, uz neprestano lupkanje kolone. Na dno kolone prije adsorbensa se obično stavlja vata ili staklena vuna, a na vrh dodanog adsorbensa tanak sloj pijeska ili filter-papir. Tanak sloj pijeska može se staviti i na vrh vate/staklene vune prije dodavanja adsorbensa. Kao mobilna faza upotrebljava se neko organsko otapalo ili smjesa otapala, a eluens protječe kroz kolonu pod utjecajem gravitacije.

Različite su tvari različito razdijeljene između eluensa i adsorbensa pa kolonom putuju različitom brzinom i postupno se razdvajaju. Pojedine se komponente, tako razdvojene, jedna za drugom eluiraju s kolone. Kad se radi o obojenim spojevima (primjerice biljni pigmenti), izvođenje kromatografije na koloni jednostavnije je jer se zone čistog spoja mogu lakše pratiti. Mnogo češće pojedine komponente nisu „vidljive” pa je potrebno skupljati eluat u

frakcijama malog volumena. Potom se sastav i čistoća svake frakcije provjere TLC-om ili plinskom kromatografijom. Tada se istovrsne frakcije spajaju, otapalo se ukloni uparavanjem i tako se izoliraju čiste komponente smjese.

Brzina kretanja tvari niz stupac ovisi o jakosti vezivanja tvari na stacionarnu fazu i o topljivosti te tvari u eluensu. Kao i kod TLC-a, kruti je adsorbens polaran (SiO_2 , Al_2O_3) pa se polarne tvari (karboksilne kiseline, amini, alkoholi) jače adsorbiraju od manje polarnih (alkil-halogenida, aldehida, ketona, estera). Upotrebom nepolarnog otapala kao eluensa nepolarne tvari putuju brže i tako se odvajaju od polarnih tvari koje zaostaju. Za eluiranje polarnih tvari treba upotrebljavati polarna otapala koja ih bolje otapaju. Osim polarosti, i molekulska masa tvari utječe na brzinu kretanja niz stupac (kromatografija na temelju veličine molekula upotrebljava se kod kromatografije isključenjem ili gel-filtracijom).

Prije razdvajanja smjese na koloni potrebno je pronaći odgovarajuće otapalo za eluiranje. Stoga prvo treba provesti TLC uzorka smjese. Optimalno otapalo jest ono kod kojeg su R_f vrijednosti najmanje polarne i najpolarnije tvari između 0,2 i 0,8, a razlika R_f -vrijednosti pojedinih komponenata $\geq 0,1$. Ako nema takva otapala, upotrebljava se smjesa otapala ili se otapalo mijenja tijekom razdvajanja. S kolone se najprije uklanjaju nepolarne tvari, što znači da eluiranje obično započinje nepolarnim otapalom, a zatim se postupnim povećavanjem polarosti otapala eluiraju polarne tvari. S druge strane, postoji *kromatografija s reverznom fazom* kod koje se kolona puni hidrofobnim adsorbensom i u tom je slučaju početni eluens vrlo polaran, najčešće je to smjesa vode i organskog otapala.

Da bi razdvajanje na koloni bilo uspješno, treba voditi računa o masi stacionarne faze (adsorbensa). Masa stacionarne faze trebala bi biti 25 – 30 puta veća od mase smjese. Ako se razdvajaju spojevi sličnih karakteristika, tada masa adsorbensa treba biti i veća i/ili kolona dulja (prema tablici 1).

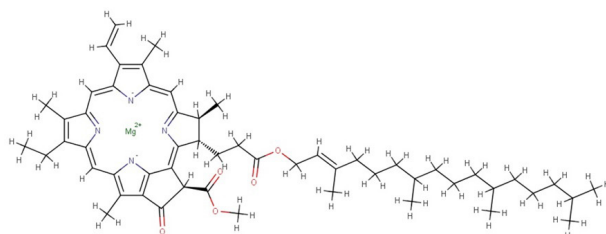
Masa uzorka/g	Masa adsorbensa/g	Duljina kolone/cm	Promjer kolone/cm
0,1	3	70 (30 – 50) ^a	0,7 (1,5 – 2) ^a
1	30	150 (75 – 100) ^a	1,5 (2 – 3,5) ^a
3	90	250 (100) ^a	2 (3 – 5) ^a

^a Za istu masu uzorka mogu se upotrebljavati i kraće kolone većeg promjera

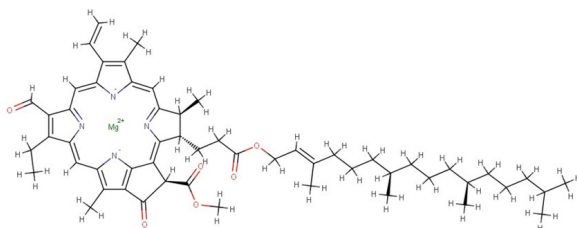
U pripremi kromatografske kolone veoma je važno kako se puni staklena cijev te podešavanje brzine protjecanja eluensa. Stacionarna faza mora biti jednolično i kompaktno raspoređena u cijevi. U suprotnome, brzina protjecanja otapala nije svugdje jednaka i tada nastaju razvučene i nepravilne zone. Neovisno o tome puni li se kolona suspenzijom adsorbensa u otapalu ili se adsorbens nesuspendiran dodaje u kolonu s otapalom, važno je da tijekom punjenja pipac na dnu kolone bude otvoren i da se tako osigura stalno protjecanje otapala kroz kolonu kako u stupcu adsorbensa ne bi zaostajali mjehurići zraka.

Nadalje, na vrh adsorbensa obično se stavi komadić filter-papira ili tanak sloj čistog pijeska kako se tijekom nanošenja uzorka, kao i tijekom eluiranja, ne bi poremetila ravna površina adsorbensa. U suprotnome bi se sve nepravilnosti s vrha adsorbensa prenijele na zonu putovanja uzorka i komponente se ne bi mogle dobro odijeliti.

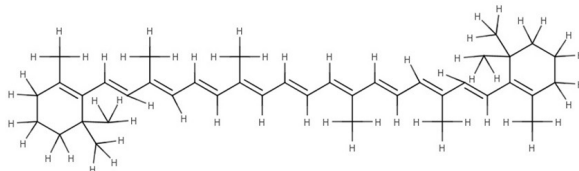
U sljedećoj su vježbi dane upute za TLC i kromatografiju na stupcu smjese biljnih pigmenata koji se izoliraju iz špinata (slika 8). Dio vježbe radi asistent (priprema uzorka, priprema kolone i nanošenje uzorka), a studenti sudjeluju u eluiranju i skupljanju frakcija tijekom kromatografije na stupcu te rade TLC (pojedinačno ili u grupi).



klorofil a



klorofil b



β-karoten

Slika 8. Strukturne formule najvažnijih biljnih pigmenata iz špinata

Kemikalije:

metanol	100 ml	lako zapaljivo, otrovno
petroleter (30 – 60 °C)	100 ml	lako zapaljivo, nadražujuće za kožu, otrovno
Na ₂ SO ₄ , bezvodni	za sušenje	
kloroform	za razvijanje kromatograma i za ekstrakciju po potrebi	jako otrovno, potencijalni kancerogen!
silikagel	10 g	ne udisati!
staklena vuna ili vata		
heksan	100 ml	lako zapaljivo, nadražujuće za kožu, otrovno
aceton	10 ml	lako zapaljivo, nadražuje oči

Alu-ploče silikagel za TLC

Pribor:

tarionik od 250 ml; 2 Erlenmeyerove tikvice od 250 ml; lijevak za odjeljivanje od 250 ml; tikvica s okruglim dnom od 250 ml; lijevak; kolona za kromatografiju, čaše.

Postupak:

Ekstrakcija pigmenata

U tarioniku (slika 9) se izgnječi otprilike 6 g smrznutog špinata u 50 ml metanola. Zgnječeni špinat treba dobro ocijediti i odvojiti otopinu metanola (koja sadržava vodu iz špinata!) te je predati tehničaru. Špinat se potom stavi u Erlenmeyerovu tikvicu u koju se doda 25 ml metanola i 35 ml petroletera te se sve zajedno miješa 5 minuta preko magnetske miješalice. Ekstrakt se profiltrira u lijevak za odjeljivanje, a kruti se ostatak ponovno miješa s još 25 ml metanola i 75 ml petroletera. I drugi se ekstrakt profiltrira u lijevak za odjeljivanje te se sadržaj lijevka izmučka. Ispusti se donji sloj (metanol koji sadržava vodu iz špinata) i vrati tehničaru, a gornji se sloj (sadržava pigmente!) dva puta izmučka s po 50 ml vode. Ako se pri mućkanju stvara emulzija, treba dodati malo kalcijeva klorida. Donji se vodeni slojevi odbace, a gornji se sloj suši 10 minuta u suhoj Erlenmeyerovoj tikvici preko bezvodnog natrijevog sulfata. Osušeni petroleterski ekstrakt profiltrira se preko nabranog filter-papira u tikvicu s okruglim dnom i otapalo uparava na rotacijskom uparivaču dok ne preostane oko 2 – 2,5 ml otopine (nikako ne do suhog!) koja se upotrebljava za kromatografiju.



Slika 9. Tarionik

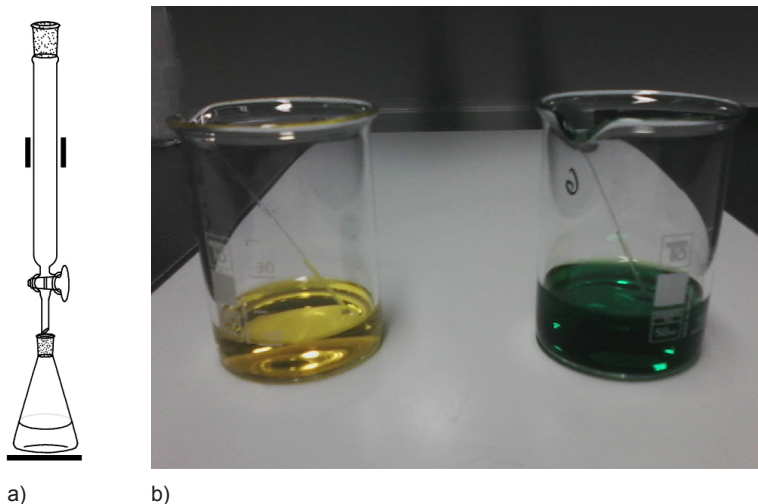
Tankoslojna kromatografija (TLC)

Prije odvajanja smjese kromatografijom na stupcu treba razviti kromatogram smjese TLC-om kako bi se utvrdile R_f -vrijednosti pojedinih komponenti. Na pločici se olovkom (upotrebljava se obična, ne tehnička olovka!) označi startna linija 1 – 1,5 cm od ruba pločice. Otopina (dobiveni ekstrakt) se uzima kapilarom i laganim dodirivanjem površine silikagela ispusti u jednu točku na pločici (na startnoj liniji!). Pritom se pazi da promjer nanesenog uzorka bude što manji. Kapilaru je potrebno držati okomito (ne pod kutom!) i treba više puta dodirnuti površinu silikagela (između dodavanja čekati da se mrlja osuši). Kad se uzorak na pločici posuši, pločica se uroni u čašu ili cilindar s razvijanjem (kloroform), a pritom se pazi da nacrtana startna linija bude iznad razine otapala u čaši. Dobro je u posudu prethodno staviti komad filter-papira uronjenog u otapalo da se prostor za kromatografiju zasiti njegovim parama. Posuda se poklopi i pusti da se otapalo (eluens) s pomoću kapilarnih sila diže uz pločicu i eluira sastojke smjese (= razvijanje kromatograma). Prije nego što otapalo dođe do vrha pločice, pločica se izvadi i olovkom označi do kuda se popelo otapalo (= frontna linija) i zatim se pločica osuši. Izračunaju se R_f -vrijednosti pojedinih komponenata na pločici, a onda se pločica pogleda i pod UV-svjetlom te se označe sve one mrlje koje se dotad nisu uočile. Potom se pristupi odjeljivanju smjese kromatografijom na stupcu. Nakon odjeljivanja pigmenta na koloni treba ponoviti TLC s odvojenim komponentama i usporediti s početnim TLC-om smjese! U referatu treba skicirati TLC pločicu, označiti sve mrlje (obojiti ih odgovarajućom bojom) i navesti njihove R_f -vrijednosti.

Priprema kolone za kromatografiju

U kolonu za kromatografiju dužine otprilike 40 cm i promjera 2 – 2,5 cm ulije se malo heksana na dno cijevi (kolona je zatvorena). Zatim se s pomoću dužeg staklenog štapića na dno cijevi stavi malo staklene vune ili vate, i to tako da se s pomoću cijevi istisne sav zrak. U zasebnoj čaši suspendira se 10 – 15 g silikagela u 30 – 40 ml otapala (eluensa). Eluens je smjesa acetona i heksana u omjeru 1 : 9. Nastala se suspenzija dobro promiješa (mora biti bez mjehurića!) te se preko običnog lijevka ulijeva u kolonu kojoj je pipac otvo-

ren tako da otapalo polagano kapa iz kolone. Laganim lupkanjem (gumenim čepom kapalice) po stijenkama kolone postiže se jednolično i gusto pakiranje nepokretne faze. Kad se adsorbens slegne, otapalo se ispusti do samog ruba stacionarne faze. Cijelo vrijeme treba paziti da iznad adsorbensa uvijek bude barem mala količina otapala, odnosno kolona nikad ne smije ostati suha.



Slika 10. Aparatura za kromatografiju na stupcu (a) i frakcije odvojene kromatografijom na stupcu smjese pigmenata iz špinata (b)

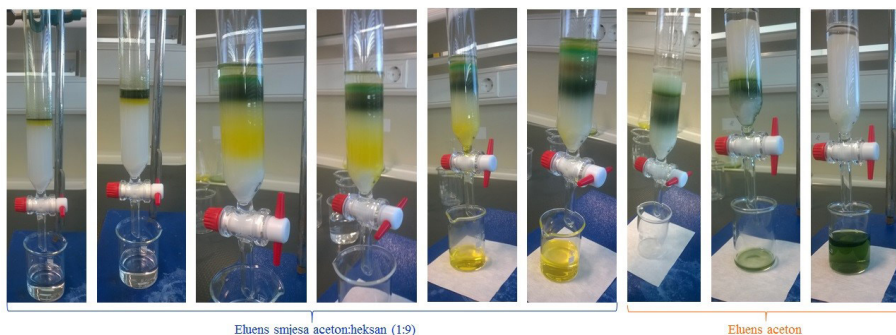
Nanošenje uzorka

Uzorak se kapalicom pažljivo ispusti uz stijenk kolone što bliže površini adsorbensa. Otvaranjem pipca podesi se sporo kapanje otapala iz kolone u Erlenmeyerovu tikvicu, pri čemu uzorak ulazi u stupac adsorbensa. Kad se sloj ekstrakta gotovo upije, stijenka se ispere s malo eluensa. Time se ekstrakt ujedno potpuno upije na adsorbens.

Eluiranje uzorka

Eluira se najprije smjesom aceton : heksan (1 : 9). Eluat se hvata u Erlenmeyerovu tikvicu. Kad se pojavi prva obojena kap, tikvica se zamijeni i eluira narančasta karotenoidna frakcija do gubitka obojenja. Nakon toga se eluens zamijeni čistim acetonom. Acetonom se nastavi eluirati zelena klorofilna frakcija. Istovrsne se frakcije spoje i prebace u tikvice s okruglim dnom te upare na rotacijskom uparivaču na volumene 2 – 3 ml.

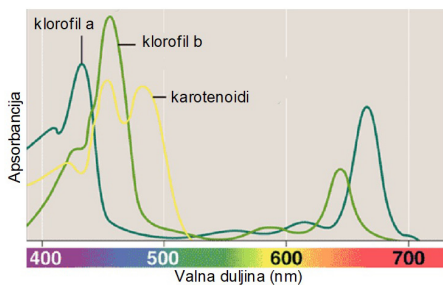
(U slučaju da se klorofil presporo eluira klorofilna se komponenta može izolirati tako da se još vlažan stupac silikagela, nakon odjeljivanja karotenoida, polako uz potresanje ispušta kroz gornji otvor kolone. Zeleno obojena zona izdvoji se i ekstrahira s 20 – 30 ml kloroforma ili diklormetana, profiltrira se i upari na mali volumen.)



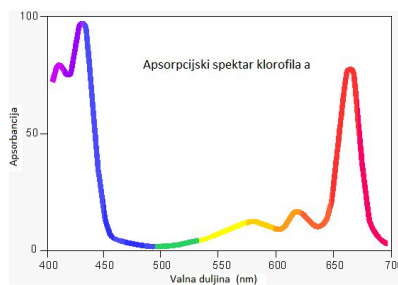
Slika 11. Eluiranje pigmenta iz špinata

Identifikacija izoliranih spojeva

Čistoća pojedinih frakcija potvrđuje se tankoslojnom kromatografijom (odmah nakon kromatografije na stupcu) te UV/vis spektroskopijom. Treba snimiti UV/vis spektar zelene (vježba 9), odnosno narančaste frakcije i usporediti sa spektrima na slici 12. Snimanjem apsorbancije na 642,5 i 660 nm mogu se točno identificirati klorofili *a* i *b*, dok β -karoten apsorbira pri 452 nm.



a)



b)

Slika 12. UV/vis spektar biljnih pigmenta: a) zajednički UV/vis spektar karotenoida (β -karoten), klorofila *a* i *b* [3]; b) UV/vis spektar klorofila *a* [4]

Zadatak:

Opišite kako biste napravili TLC smjese pigmenta ekstrahiranih iz (A) naribane mrkve ili (B) koncentrata rajčice te u nastavku odgovorite na sljedeća pitanja u vezi s jednim od ta dva ekstrakta (po izboru, A ili B):

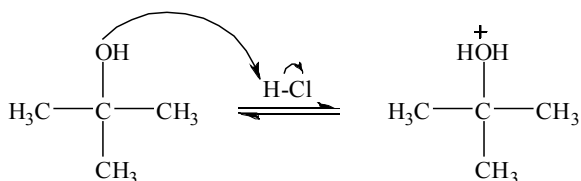
- 1) Koji pigment prevladava u ekstraktu, a koji je pigment drugi po zastupljenosti?
- 2) Nacrtajte strukture dvaju pigmenta koje ste naveli i usporedite njihovu polarnost. Za koji od ta dva pigmenta očekujete veću R_f vrijednost?
- 3) Za koji od dva pigmenta očekujete veće λ_{\max} vrijednosti u UV-Vis spektru i zašto?

3. Nukleofilna supstitucija prvog reda (S_N1): Sinteza *tert*-butil-klorida [5]

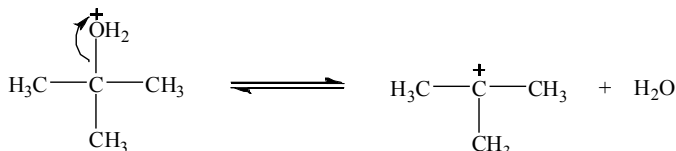
Hidroksilna skupina (OH) slaba je odlazeća skupina (*engl.* leaving group) te se često prevodi u alkil-halogenide kad je potrebna dobra odlazeća skupina. Postoje tri glavne metode za prevođenje alkohola u alkil-halogenide, ovisno o vrsti alkohola i potrebnom halogenidu. Reagensi koji se pritom mogu upotrijebiti jesu fosforov tribromid (PBr_3), tionil-klorid ($SOCl_2$) i halogenovodici (HX).

U ovoj vježbi priređuje se *tert*-butil-klorid iz tercijarnog alkohola, 2-metilpropan-2-ola (= *tert*-butanol) i HCl. Za razliku od alkohola, alkil-halogenid koji nastaje kao produkt reakcije je netopljiv je u reakcijskoj smjesi pa dolazi do zamućenja reakcijske smjese i produkt se može izdvojiti ekstrakcijom kao gornji sloj (*tert*-butil-klorid ima manju gustoću od vode!).

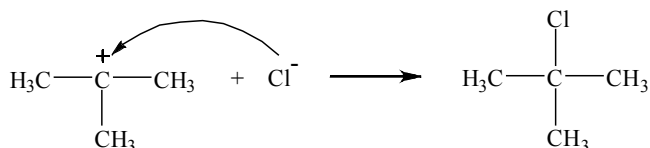
Mehanizam ove reakcije može se opisati kao monomolekulska nukleofilna supstitucija ili S_N1 -reakcija. Prvi korak te reakcije jest kiselo-bazna reakcija, odnosno protoniranje alkoholnog kisika, čime se dobije voda kao bolja odlazeća skupina od OH-skupine. Protoniranje je u ovoj reakciji moguće jer je reagens jaka mineralna kiselina, koncentrirana solna kiselina. Ovaj je korak brz i reverzibilan:



U sljedećem koraku dolazi do kidanja C-O veze, uz gubitak dobre odlazeće skupine (H_2O) te nastanak karbokationskog međuprodukta. Ovo je najsporiji i stoga stupanj koji određuje brzinu reakcije (kidanje veze jest endotermno). Središnji ugljikov atom u ovom stupnju prelazi iz četervalentnog u trovalentno stanje, odnosno iz tetraedarskog u planarni oblik (iz sp^3 -hibridiziranog ugljika u sp^2 -hibridizirani ugljik):



Drugi, brži stupanj reakcije jest napad nukleofilnog kloridnog iona na elektrofili karbokatjon i nastanak *tert*-butil-klorida.



Primarni se alkoholi teže prevode u alkil-halogenide od tercijarnih pa se za reakciju s primarnim alkoholom upotrebljava reaktivniji HBr umjesto HCl. Primjerice, butil-bromid može se dobiti *refluksiranjem* smjese butanola i koncentrirane otopine HBr. Mehanizam te reakcije opisuje se kao nukleofilna supstitucija drugog reda ili S_N2-reakcija.

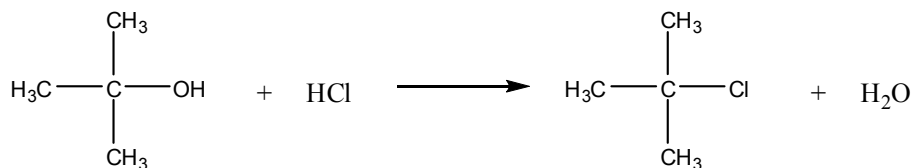
Opće karakteristike S_N1 i S_N2 reakcija, odnosno usporedba tih dvaju mehanizama, mogu se prikazati sljedećom tablicom:

	S _N 1	S _N 2
Mehanizam	dva stupnja	jedan stupanj
Kinetika	prvog reda	drugog reda
Nukleofilnost reagensa	nevažna za brzinu, nukleofil ne utječe na brzinu reakcije (neutralne molekule, može biti otapalo = solvatacija)	koncentracija nukleofila utječe na brzinu reakcije, bolji su jači nukleofili (anioni)
Struktura zasićenog C-atoma	povoljna rezonancijska stabilizacija 3 ^o >> 2 ^o > 1 ^o	nepovoljne steričke smetnje, reaktivnost CH ₃ > 1 ^o > 2 ^o > 3 ^o
Utjecaj otapala	pogoduju ionizirajuća otapala (polarna protonska otapala)	utjecaj otapala obično malen, vodikove veze inhibiraju nukleofil, zato su bolja polarna aprotionska otapala
Stereokemija	racemizacija do inverzije	inverzija
Uvjeti reakcije	obično kiseli ili neutralni	obično bazični ili neutralni
Pregradnje	moгуće pregradnje (nastaje stabilniji karbokation)	bez pregradnji

Fizikalna svojstva:

tert-Butil-klorid (C₄H₉Cl, M = 92,567) bezbojna je i zapaljiva tekućina gustoće 0,84 g cm⁻³; t_v = 50-52 °C; t_t = -26 °C i indeksa loma svjetlosti 1,385 pri 20 °C. Teško je topljiv u vodi, miješa se s alkoholom i eterom.

Kemijaska reakcija:



Kemikalije:

<i>tert</i> -butanol	9,9 ml (7,8 g; 0,11 mol)	zapaljivo
HCl (konc.)	35 ml	izaziva opekline, nadražuje dišni sustav
NaHCO ₃ (w = 5%)	5 mL	
MgSO ₄ , bezvodni	za sušenje	nadražujuće
CaCl ₂ , bezvodni	oko 1 g (za sušenje)	nadražuje oči

Pribor:

Erlenmeyerova tikvica od 200 ml s plutenim čepom; stakleni štapić; menzura (10 ml i 50 ml); lijevak za odjeljivanje od 100 ml; Erlenmeyerova tikvica od 50 ml sa staklenim čepom; tikvica s okruglim dnom od 25 ml; hladilo; lula; čaša za vodenu kupelj.

Postupak:

U Erlenmeyerovu tikvicu od 200 ml ulije se 35 ml koncentrirane solne kiseline. U radu s koncentriranom solnom kiselinom treba biti oprezan, upotrebljavati rukavice i paziti da ne dođe do izlivanja i prskanja. Potom se u tikvicu s kiselinom oprezno doda 9,9 ml *tert*-butanola. Temperatura tališta *tert*-butanola jest $t_f = 25 - 26$ °C, stoga je moguće da na sobnoj temperaturi bude u krutom stanju i tada bocu s alkoholom treba staviti u toplu vodenu kupelj dok se ne otopi. Nakon dodavanja alkohola u tikvicu s kiselinom smjesa se miješa oko 5 minuta, odnosno dok bistra reakcijska smjesa ne postane mutna zbog nastanka produkta koji se ne miješa s vodenom otopinom kiseline. Tikvica s reakcijskom smjesom lagano se začepi plutenim čepom i ostavi oko pola sata, uz često potresanje.

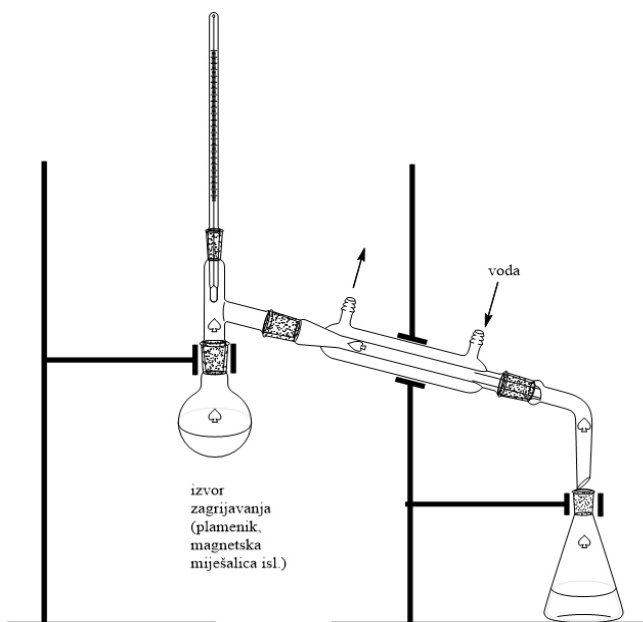
Nakon stajanja i jasno uočenih slojeva reakcijska se smjesa prelije u lijevak za odjeljivanje i odvoji se donji (vodeni) sloj. Gornjem sloju, koji sadržava produkt, doda se 5 ml razrijeđene otopine natrijeva bikarbonata (5 %-tna otopina), pozorno se izmučka uz često otvaranje pipca (razvija se plin – koji?) i ponovno se odvoji donji sloj. Sirovi *tert*-butil-klorid („gornji sloj”) prenese se u suhu Erlenmeyerovu tikvicu i suši preko magnezijeva sulfata ili kalcijeva klorida (oko 1 g) 15-ak minuta.

Osušeni *tert*-butil-klorid ulije se preko suhog nabranog filter-papira u tikvicu s okruglim dnom (Nakon sušenja organske frakcije preko magnezijeva sulfata ili drugog sredstva za sušenje treba ukloniti sredstvo za sušenje filtracijom. Nerijetko studenti navlaže filter-papir vodom misleći da će tako ubrzati filtraciju ili zato što su tako radili kod vruće filtracije u prvoj vježbi kod prekrizacije benzojeve kiseline iz vode, što je, naravno, ovdje pogrešno; za ovakvu filtraciju treba upotrijebiti SUHI nabrani filter-papir). Zatim se sastavi aparatura za jednostavnu destilaciju (slika 13). Za zagrijavanje tikvice upotrebljava se vodena kupelj, a skuplja se destilat s temperaturom vrenja 48 – 52 °C. Pritom

treba zabilježiti točnu temperaturu pri kojoj alkil-halogenid počne destilirati i raspon vrelišta. Destilat se hvata u suhu, prethodno izvaganu bočicu za uzorke. Literaturno iskorištenje reakcije za produkt jest 76 %.

Zadatak:

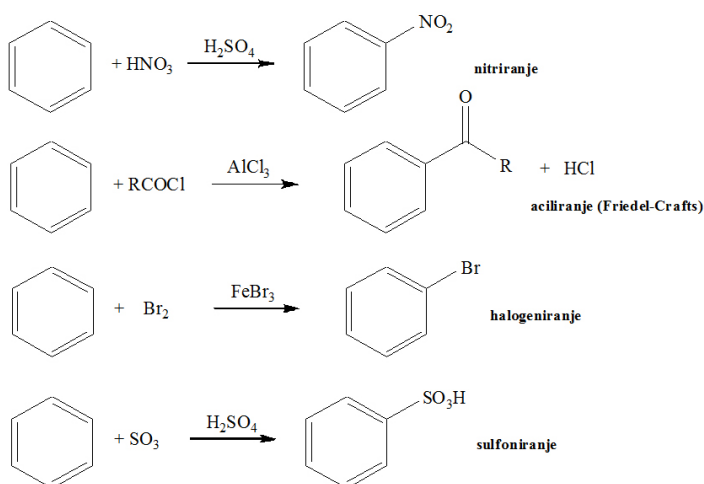
Opišite jedan primjer reakcije koja se u biološkom sustavu odvija S_N2 ili S_N1 mehanizmom. Objasnite jasno mehanizam i o čemu ovisi brzina te reakcije i naglasite značaj odabrane reakcije u živim sustavima (Možete odabrati primjer S_N2 ili S_N1 mehanizma ili po jedan primjer za oba mehanizma).



Slika 13. Aparatura za jednostavnu destilaciju (ako se destilira zapaljiva tekućina, onda se zagrijava preko vodene ili uljne kupelji, prethodna slika)

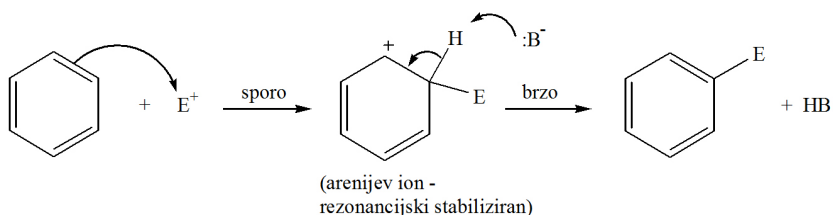
4. Elektrofila aromatska supstitucija – nitroziranje: Sinteza p-nitrozofenola [1] [2]

Karakteristične reakcije aromatskih spojeva jesu reakcije elektrofилne supstitucije. Najčešće i najpoznatije reakcije elektrofилne aromatske supstitucije (EAS) jesu *nitriranje*, *Friedel-Craftsovo alkiliranje*, *Friedel-Craftsovo aciliranje*, *halogeniranje* i *sulfoniranje*. Sve ove reakcije karakterizira upotreba kiselog katalizatora koji je potreban za dobivanje odgovarajućeg elektrofila. Tako je za nitriranje potrebna kiselina jača od dušične te se najčešće upotrebljava sumporna kiselina s pomoću koje nastaje nitronijev elektrofil (NO_2^+). Pri halogeniranju i Friedel-Craftsovim reakcijama upotrebljavaju se najčešće Lewisove kiseline (AlCl_3 , FeBr_3 i sl.), dok se sulfoniranje obično provodi s pomoću koncentrirane ili dimeće sumporne kiseline (oleuma).



Mehanizam:

Elektrofилne aromatske supstitucije reakcije su koje se odvijaju u dva stupnja. Prvi je korak sličan elektrofилnoj adiciji na alkene i uključuje napad elektrofila na π -elektronski sustav, pri čemu nastaje kationski međuprodukt (arenijev karbokation). Taj je korak spor i energetski nepovoljan (endoterman) jer se njime gubi aromatičnost, ali je arenijev ion ipak rezonancijski stabiliziran.



Kod reakcija adicija na alkene, u drugom stupnju, koji se odvija brzo, nukleofil napada nastali karbokation (=elektrofil) te nastaje stabilan adicijski produkt. Međutim, kod reakcija elektrofilne aromatske supstitucije, u drugom je stupnju energetski mnogo povoljnije odcjepljenje jednog protona, dakle eliminacija, jer se pritom ponovno uspostavlja aromatski sustav. I ovdje je taj drugi korak brz, ali je rezultat cijele reakcije supstitucija, stoga se reakcija naziva **elektrofilnom** (prvi je korak napad na elektrofil) **aromatskom** (odvija se kod aromatskih spojeva) **supstitucijom** (ukupni rezultat reakcije jest zamjena protona drugim elektrofilom).

Elektrofilna aromatska supstitucija benzena daje produkte u kojima je benzenska jezgra supstituirana i ti vezani supstituenti utječu na nove elektrofilne supstitucije tako što aktiviraju ili deaktiviraju aromatski prsten, odnosno imaju induktivan i/ili rezonancijski učinak. Općenito, elektron-donirajuće skupine aktiviraju benzenski prsten jer čine benzensku jezgru bogatijom elektronima, što olakšava napad elektrofila. Takve se reakcije obično mogu odvijati uz blaže uvjete i s boljim iskorištenjima. Suprotno tome, elektron-akceptorske skupine „odvode” elektrone i tako osiromašuju benzensku jezgru te se napad elektrofila odvija teže, odnosno sporije.

Aktivirajuće skupine, dakle one koje aktiviraju benzensku jezgru u reakcijama elektrofilne supstitucije, ujedno su i ortho- i para-usmjerivači, što znači da usmjeravaju vezanje drugog supstituenta u *ortho-* i *para-* položaje (*o,p*) na benzenskoj jezgri. S obzirom na to koliko su elektron-donori jaki, razlikujemo jako aktivirajuće skupine (amino-skupina, $-\text{NH}_2$; supstituirana amino-skupina, $-\text{NHR}$ ili $-\text{NR}''$; hidroksilna skupina; $-\text{OH}$, fenoksidna skupina, $-\text{O}^-$), umjereno aktivirajuće skupine (amidna, $-\text{NHCOR}$; alkoksidna, $-\text{OR}$) i slabo aktivirajuće skupine (alkilne, $-\text{R}$).

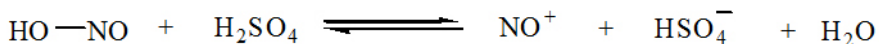
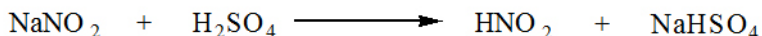
Deaktivirajuće skupine, dakle one koje deaktiviraju benzensku jezgru u reakcijama elektrofilne supstitucije, uglavnom su meta-usmjerivači i usmjeravaju vezanje drugog supstituenta u *meta-* položaj (*m*). Jače elektron-akceptorske skupine uglavnom su i jako deaktivirajuće skupine (nitro-skupina, $-\text{NO}_2$; kvaterne amonijeve soli, $-\text{NH}_3^+$, $-\text{NR}_3^+$ i sl.; trifluormetilna skupina, $-\text{CF}_3$; triklorometilna skupina, $-\text{CCl}_3$ itd.), a umjereno aktivirajuće skupine jesu sve karbonilne skupine u kojima je skupina vezana na benzenski prsten preko karbonilnog ugljika (nitrilna skupina, $-\text{CN}$; aldehidna skupina, $-\text{CHO}$; keto-skupina, $-\text{COR}$; amidna $-\text{CONH}_2$, esterska, $-\text{COOR}$ isl.) te sulfonska skupina ($-\text{SO}_3\text{H}$).

Halogeni elementi jesu slabo deaktivirajuće skupine jer induktivnim efektom deaktiviraju benzensku jezgru, ali pripadaju ortho- i para-usmjerivačima, što se može pripisati rezonancijskom efektu zbog mogućeg doniranja elektronskog para.

Nitroziranje: Sinteza p-nitrozofenola

Nitroziranje je elektrofilna aromatska supstitucija u kojoj se elektrofil, nitrozonijev ion (NO^+) oslobađa protoniranjem dušikaste kiseline (HNO_2). Dušika-

sta kiselina slaba je kiselina, ali i vrlo nestabilna jer se brzo raspada, stoga se priprema *in situ* reakcijom natrijeva nitrita i jake, najčešće sumporne, kiseline:

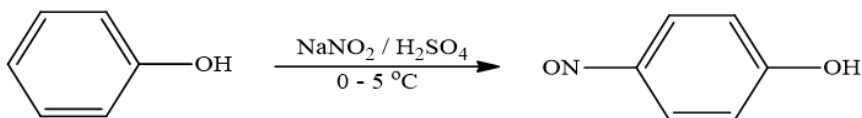


Za razliku od, primjerice, nitronijeva iona (NO_2^+) koji je jako reaktivan elektrofil, nitrozonijev ion (NO^+) slabije reagira i takva se supstitucija teško odvija na benzenu. Zbog toga se nitroziranje izvodi samo na aktiviranim aromatskim prstenovima kao što su fenol, naftol, *N,N*-dimetilamin i naftilamini. Ove aktivirajuće skupine ujedno i usmjeravaju nitrozonijev ion u *ortho* i *para* položaj fenola. *Para* položaj obično se preferira u odnosu na *ortho* zbog manje steričkih smetnji, ali kad je *para* položaj zauzet, onda je većinski produkt *ortho*. Nitrozospojevi su važni kao međuprodukti jer se mogu prevesti u druge dušikove spojeve, primjerice oksidacijom u nitrospojeve ili redukcijom u amine.

Fizikalna svojstva:

***p*-Nitrozofenol** ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$, $M = 123,11$) pri sobnoj temperaturi dolazi u obliku svjetlosmeđeg praha, temperatura taljenja iznosi $t_f = 144\text{ }^\circ\text{C}$ (raspada se). Vrlo je dobro topljiv u acetonu, eteru i etanolu; a topljivost u vodi pri $38\text{ }^\circ\text{C}$ iznosi 0,32 g na 100 ml vode.

Kemijska reakcija:



Kemikalije:

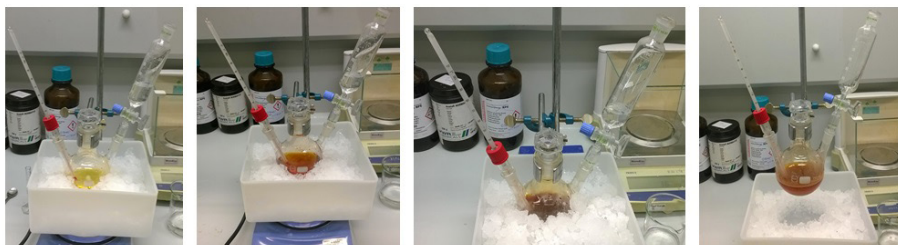
fenol	3,13 g (0,033 mol)	otrovno ako se udiše, u dodiru s kožom i ako se proguta, izaziva opekline, štetno, moguća opasnost od neprolaznih učinaka
NaOH u granulama	1,4 g (0,035 mol)	izaziva teške opekline
NaNO_2	2,8 g (0,04 mol)	otrovno, u dodiru sa zapaljivim materijalom može uzrokovati požar (oksidirajuće)
konc. H_2SO_4	4,2 ml (0,08 mol)	izaziva teške opekline
led, NaCl		

Pribor:

čaša od 250 ml i 100 ml; trogrla tikvica od 250 ml; Erlenmeyerova tikvica od 100 ml; lijevak za dokapavanje od 50 ml; termometar; ledena kupelj; odsisna boca od 300 ml; Büchnerov lijevak ϕ 5 cm; filter-papir.

Postupak:

U Erlenmeyerovoj tikvici od 100 ml priredi se vodena otopina NaOH tako što se otopi 1,4 g krutog NaOH u 75 ml destilirane vode. U čaši od 250 ml izvaži se 3,13 g fenola (u digestoru!) i doda se pripremljena vodena otopina NaOH te se smjesa miješa staklenim štapićem. Uz stalno miješanje, smjesi se doda 2,8 g NaNO_2 , a potom se smjesa ohladi izvana smjesom leda i kuhinjske soli na 0°C . Kad se smjesa ohladi na 0°C , prebaci se u trogrlu tikvicu od 250 ml u čije se jedno grlo stavi termometar, u drugo lijevak za dokapavanje, dok se treće grlo začepi čepom. Trogrla tikvica stavi se u ledenu kupelj koju čini smjesa vode, leda i kuhinjske soli. U čaši od 100 ml priredi se vodena otopina sumporne kiseline tako što se u 21 ml destilirane vode u čaši oprezno i polako dodaje 4,2 ml H_2SO_4 (nikad ne dodavati obratno, odnosno vodu u kiselinu!!!), a zatim se čaša hladi izvana sve dok se temperatura otopine ne spusti ispod 3°C . Ovako priređena i rashlađena otopina H_2SO_4 stavi se u lijevak za dokapavanje na trogrloj tikvica koja se cijelo vrijeme hladi u ledenoj kupelji. Vodena otopina sumporne kiseline dodaje se postupno tijekom pola sata iz lijevka za dokapavanje: Cijelo se vrijeme reakcijska smjesa miješa preko magnetske miješalice te se prati njezina temperatura koja ne smije prijeći 5°C (inače dolazi do osmoljavanja!). Ako temperatura počne rasti, treba privremeno prestati s dodavanjem sumporne kiseline. Nakon što se dodala sva otopina kiseline iz lijevka, reakcijska se smjesa miješa još pola sata tijekom kojih se stvara smeđi talog produkta. Produkt se odsiše preko Büchnerova lijevka i ispere hladnom vodom te dobro ocijedi s pomoću špatule ili staklenog čepa. Dobiveni talog prebaci se na lađicu od finog filter-papira i suši na zraku. Produkt se izvaži i izračuna se iskorištenje prema teoretskom i literaturnom (literaturno iskorištenje iznosi 3,1 g) te se izmjeri talište kako je opisano u vježbi 1.c (str. 31.).



Vrijeme i H_2SO_4 (aq)

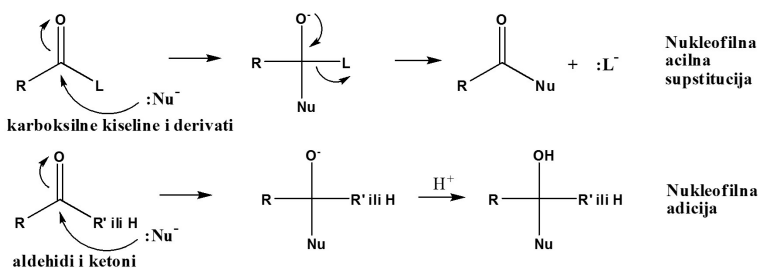
Slika 14. Aparatura i izvođenje reakcije nitroziranja fenola

Zadatak:

Napišite Kolbe–Schmittovu reakciju i jasno objasnite njezin mehanizam. Navedite najvažniju primjenu ove reakcije i opišite kako se ona izvodi u industrijskim uvjetima.

5. Nukleofilna acilna supstitucija – esterifikacija: Sinteza acetilsalicilne kiseline [5]

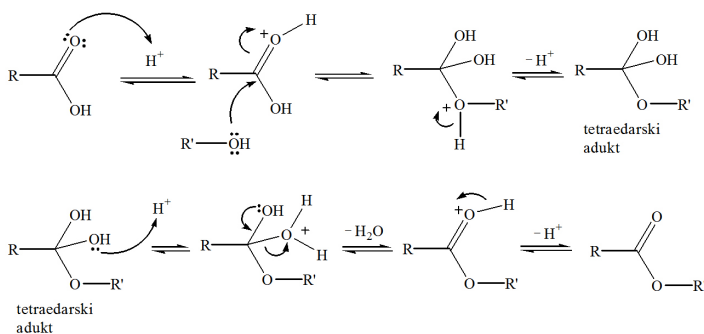
U najvažnije derivate karboksilne kiseline (RCOOH) ubrajamo sljedeće spojeve s karbonilnom skupinom: acil-halogenidi, anhidridi, esteri i amidi. Zajednička osobina svih ovih spojeva jest da na ugljik karbonilne skupine imaju vezanu skupinu koja je slaba baza ili skupinu koja se lako može prevesti u slabu bazu, dakle, dobru izlazeću skupinu (L). Zato ovi spojevi podliježu reakcijama nukleofilne acilne supstitucije, za razliku od aldehida i ketona kojima su karakteristične reakcije nukleofilne adicije:



Reakcija nukleofilne supstitucije u kojoj karboksilna kiselina i alkohol daju ester naziva se još i Fischerova esterifikacija prema njemačkom kemičaru Emilu Fischeru. Reakcija je reverzibilna, a reakcija koja se odvija u obrnutom smjeru jest hidroliza estera.

Mehanizam reakcije:

Slobodan elektronski par na kisiku karbonilne grupe može se protonirati samo s pomoću jake kiseline (zato se u reakcijama esterifikacije upotrebljava koncentrirani HCl ili, najčešće, H₂SO₄). Protoniranje pretvara ugljik-karbonilne skupine u snažan elektrofil. Iako jake kiseline reverzibilno protoniraju mali dio molekula karboksilne kiseline (katalitički!), takve molekule postaju izvanredan supstrat i za slabije nukleofile kao što je alkohol. Pritom se stvara tetraedarski adukt koji je nestabilan jer teži ponovnom stvaranju karbonilne skupine te se ponovnim protoniranjem (jedne od dviju OH skupina) stvara dobra izlazna skupina (H₂O). Jednako bi tako izlazna skupina mogla biti ROH, pri čemu bi se dobile početne molekule kiseline i alkohola, stoga je reakcija reverzibilna. Gubitak vode usmjerava reakciju prema nastajanju estera:



Gubitak vode iz tetraedarskog adukta također je reverzibilan te, kao što alkohol ROH napada protoniranu karboksilnu kiselinu RCOOH, tako i H₂O napada protonirani ester (= hidroliza estera). Zapravo, svaki je korak u nizu od karboksilne kiseline do estera u ravnoteži, a konačna konstanta ravnoteže iznosi približno 1. Stoga, da bi reakcija esterifikacije bila iskoristiva, potrebno je pomicati ravnotežu udesno, što se postiže ili dodavanjem jednog od reagensa u suvišku (alkohol ili karboksilna kiselina) ili odvođenjem produkata. Reagens koji se dodaje u suvišku najčešće je onaj koji je jeftiniji te se obično reakcija odvija u otopini alkohola ili karboksilne kiseline (ne upotrebljava se posebno organsko otapalo za odvijanje reakcije), a voda se najčešće uklanja iz reakcije istovremeno kako nastaje destilacijom ili se reakcija odvija u prisustvu dehidratacijskog sredstva (primjerice silikagela).

Primjerice, u reakciji octene kiseline s etanolom konstanta ravnoteže iznosi približno 4. To znači da se, kad se polazi od 1 mola kiseline i 1 mola alkohola, nakon uspostavljanja ravnoteže u reakcijskoj smjesi nalazi približno 2/3 mola estera, odnosno vode, i 1/3 mola octene kiseline i etanola. Nastali ester ima niže vrelište od vode (t_v etil-acetata jest 77 °C) pa se tijekom reakcije uklanja iz smjese destilacijom. Međutim, destilat nije čisti etil-acetat, već smjesa 83 % etil-acetata, 8 % etanola i 9 % vode koja vrije pri 70 °C (= ternarni azeotrop). Čisti etil-acetat iz ove se smjese može dobiti ekstrakcijom.[7]

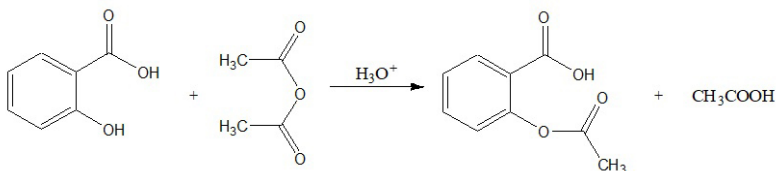
Umjesto iz karboksilne kiseline, esteri se mnogo lakše i s većim iskorištenjima mogu dobiti iz acil-klorida ili anhidrida i alkohola. Reakcija esterifikacije iz acil-klorida i alkohola obično se provodi uz neku bazu (primjerice, piridin) koja veže HCl, nusprodukt ove reakcije. Na taj se način može postići potpuna ireverzibilnost reakcije te, ako se provodi u suhim uvjetima, neće doći do hidrolize nastalog estera. Nastala piridinijeva sol lako se ekstrakcijom odvaja od esterskog produkta.

U reakciji anhidrida i alkohola nastaju ester i karboksilna kiselina, a nastala karboksilna kiselina može se reciklirati tako da se ponovno dobije anhidrid koji se upotrebljava za esterifikaciju. **Acetilsalicilna kiselina** ili aspirin prvi je i najpoznatiji analgetik, antiinflamatorik (ima protuupalni učinak) i antipiretik. U laboratoriju, ali i industrijski, najčešće se priređuje reakcijom esterifikacije u kojoj se kao alkoholna komponenta upotrebljava fenolna OH skupina salicilne kiseline u reakciji s acetanhidridom. Kao katalizator se upotrebljava jaka mineralna kiselina, najčešće sumporna ili fosforna. U industrijskoj se proizvodnji octena kiselina, koja se dobije uz produkt (aspirin), reciklira i iz nje se ponovno priređuje acetanhidrid koji se opet može upotrijebiti za esterifikaciju. Stoga ovaj postupak ima prednost pred upotrebom acetil-klorida za esterifikaciju u reakciji s OH-skupinom salicilne kiseline jer se u reakciji s acetil-kloridom oslobađa solna kiselina čije uklanjanje u industrijskim uvjetima poskupljuje cijeli proces i čini ga manje ekološki prihvatljivim.

Fizikalna svojstva:

o-Acetilsalicilna kiselina (2-acetoksibenzojeva kiselina) ($C_9H_8O_4$, $M = 180,16$) dolazi kao kristalinični prah bez boje (ili bijele boje) i bez mirisa, ima temperaturu taljenja $t_t = 135\text{ }^\circ\text{C}$ te vrelišta $t_v = 140\text{ }^\circ\text{C}$ (raspada se), a gustoća joj je u tekućem stanju $\rho = 1,40\text{ g/ml}$. Topljivost joj u vodi iznosi 3 mg/ml pri $20\text{ }^\circ\text{C}$, a u DMSO-u 30 mg/ml pri $20\text{ }^\circ\text{C}$.

Kemijska reakcija:



Kemikalije:

salicilna kiselina	2 g (0,015 mol)	štetno ako se proguta i za oči
acetanhidrid (ρ 1,082 g/ml)	5 ml (0,053 mol)	zapaljivo, izaziva opekline
konc. H_2SO_4	5 kapi	izaziva teške opekline
etanol	8 ml	lako zapaljivo, štetno
led		

Pribor:

Erlenmeyerova tikvica od 100 ili 150 ml; menzura; čaša za vodenu kupelj; posuda za ledenu kupelj; Büchnerov lijevak ϕ 5 cm; čaša.

Postupak:

Odvaži se 2,0 g salicilne kiseline i stavi u Erlenmeyerovu tikvicu od 100 ili 150 ml. Doda se 5 ml anhidrida octene kiseline i 5 kapi koncentrirane sumporne kiseline (oprezno dodavati u digestoru!). Reakcijska se smjesa pažljivo zagrijava u vrućoj vodenoj kupelji (kristalizirka ili čaša s vodom) desetak minuta. Tikvica se potom izvadi iz vodene kupelji te se doda 10 ml destilirane ledene vode kako bi se raspao višak anhidrida. Otopina se hladi u ledenoj kupelji, uz povremeno miješanje staklenim štapićem, sve do prestanka stvaranja kristala acetilsalicilne kiseline. Sastavi se aparatura za vakuum-filtraciju te se kristali produkta prebace na Büchnerov lijevak. Isperu se s 10 ml hladne vode, a potom suše na zraku. Mogu se sušiti u sušioniku na temperaturi od $100\text{ }^\circ\text{C}$ oko pola sata ili se ostave do sljedećeg termina vježbi u eksikatoru. Izvaži se suha acetilsalicilna kiselina, odredi se temperatura taljenja i izračuna iskorištenje.

Ako temperatura taljenja odstupa od literaturne vrijednosti za čistu acetilsalicilnu kiselinu (135 °C) za više od 10 °C, treba je prekrystalizirati iz etanola. Kristale acetilsalicilne kiseline tada treba staviti u čašu i dodati 8 ml etanola i 25 ml vode. Smjesa se zagrijava preko vodene kupelji na 60 °C dok se sva kiselina ne otopi. Čaša se potom prekrije satnim staklom, izvadi iz kupelji i ostavi hladiti. Može se staviti u ledenu kupelj da se potakne kristalizacija. Kristali se odvoje od filtrata vakuum-filtracijom te isperu hladnom vodom. Nakon sušenja izvaže se prekrystalizirana acetilsalicilna kiselina i izračuna iskorištenje te se odredi temperatura taljenja kako je opisano u vježbi 1.c (str. 31.). Snimi se IR spektar čistog produkta (vježba 9) i usporedi se s IR spektrom andola (u Dodatku IV).

Zadatak:

Paracetamol je još jedan poznati analgetik i antipiretik. Navedite i opišite dvije poznate sinteze kojima se dobije paracetamol, počevši od fenola. Napišite sve odgovarajuće jednačbe reakcija te pokušajte usporediti i procijeniti prednosti i nedostatke jedne i druge sinteze. Kojem biste postupku ipak dali prednost i zašto?

6. Cannizzarova reakcija:

Sinteza benzojeve kiseline i benzil-alkohola [1] [2]

Oksidacija je proces otpuštanja elektrona, stoga rezultira povećanjem oksidacijskog broja nekog atoma, a redukcija je suprotan proces u kojem se oksidacijski broj smanjuje zbog primanja elektrona. Oksidacija i redukcija dva su komplementarna procesa jer je oksidacija jedne kemijske vrste vezana uz redukciju druge („redoks-reakcije”). U organskoj kemiji oksidacija se često može prepoznati kao reakcija kojom organski spoj povećava udio kisika i/ili smanjuje udio vodika u molekuli, a redukcija, suprotno tome, povećava udio vodika i/ili smanjuje udio kisika.

Oksidacijsko stanje organskih molekula određuje se uz pretpostavku da oksidacijsko stanje elementarnog ugljika iznosi nula. Vezanje s atomom koji je elektronegativniji od ugljika naziva se oksidacijom, a stvaranje veze s atomom koji je elektropozitivniji (manje elektronegativan) od ugljika naziva se redukcijom. Prema tome se računa i oksidacijski broj ugljika u organskim spojevima: za svaku vezu ugljika s elektropozitivnijim atomom (vodik i metali) oksidacijsko se stanje ugljikova atoma mijenja za -1. Za svaku vezu s elektronegativnijim atomom, poput većine heteroatoma (N, S, O, F, Cl), oksidacijsko stanje ugljika mijenja se za +1. Dvostruke, odnosno trostruke veze između ugljika i elektronegativnijeg heteroatoma računaju se kao dva, odnosno tri puta (+1). Veze među atomima ugljika ne računaju se pri određivanju oksidacijskog stanja, odnosno ne mijenjaju oksidacijski broj.

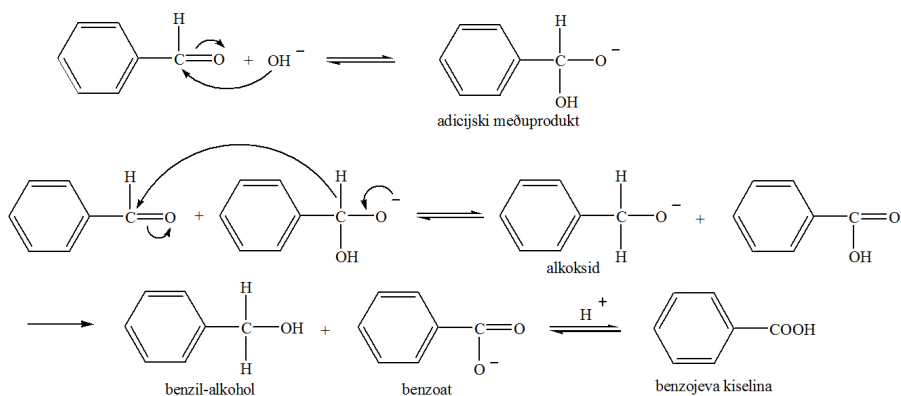
Za oksidaciju, odnosno redukciju organskih spojeva, obično se upotrebljavaju anorganski reagensi. Uobičajeni oksidansi spojevi su kroma s visokim oksidacijskim brojem, npr. kromna kiselina, zatim dušična kiselina (HNO_3), kalijev permanganat (KMnO_4), ozon (O_3) i slično. Primjerice, *Jonesov reagens* (smjesa CrO_3 ili $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ u sumpornoj kiselini koja stvara kromnu kiselinu *in situ*, a kao otapalo se upotrebljava aceton) upotrebljava se za oksidaciju primarnih alkohola u karboksilne kiseline te sekundarnih alkohola u ketone.

Za redukciju se upotrebljavaju reagensi kao što su nascentni vodik (= atomski vodik u nastajanju) dobiven djelovanjem kiselina ili alkohola na metale (Fe, Sn, Li, Na, Cu), elementarni vodik uz katalizator (Ni, Pd, Pt), polisulfidi te kompleksni metalni hidridi (LiAlH_4 , NaBH_4). Postoji još mnogo drugih reagensa za redoks-reakcije, a što će se upotrebljavati za određenu reakciju ovisi o vrsti oksidacije ili redukcije, traženoj stereokemiji, potrebnoj selektivnosti s obzirom na različite skupine koje se mogu oksidirati ili reducirati i slično.

Posebna vrsta redoks reakcije jest **Cannizzarova reakcija** koja se odvija kad se aldehidi koji nemaju α -vodik (npr. benzaldehid i furfural) stave u otopinu hidroksida. Tada se jedna molekula aldehida oksidira s pomoću druge koja se reducira pa kažemo da se molekule aldehida *disproporcioniraju*, stoga ne treba dodavati reducens, odnosno oksidans. Ostali aldehidi, koji imaju α -vodik, u otopini hidroksida podliježu *aldolnoj reakciji* (vidi sljedeću vježbu!).

Mehanizam reakcije:

Prvi korak Cannizzarove reakcije jest nukleofilna adicija hidroksilne skupine na karbonilnu skupinu aldehida. Nastali adicijski međuprodukt jest reducens jer otpušta hidridni ion koji se adira na karbonilnu skupinu druge molekule benzaldehida i tako je reducira. Ovaj je korak, dakle, oksidacijsko-redukcijski te nastaju alkoxid i benzojeva kiselina. Nastala benzojeva kiselina, kao jača kiselina, protonira alkoxid (jača baza) i u ovom se koraku reakcija odvija u jednom smjeru, za razliku od prethodnih koraka koji su reverzibilni. Naime, nastaje par slabije kiseline (benzil-alkohol) i slabije baze (benzoat), stoga je ravnoteža reakcije na strani produkata. Benzoat se od benzil-alkohola odvaja ekstrakcijom i s pomoću jake mineralne kiseline prevodi u benzojevu kiselinu:

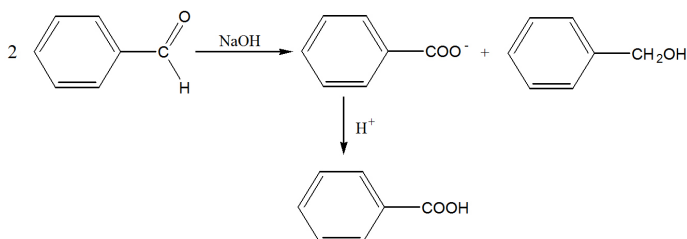


Fizikalna svojstva:

Benzil-alkohol ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}$, $M = 108,10$) pri sobnoj je temperaturi bezbojna tekućina temperature vrelišta $t_v = 205,4$ °C i gustoće $\rho = 1,049$ g/ml, a temperatura taljenja iznosi $t_t = -15,3$ °C. Topljivost u vodi mu je 4 g/100 ml pri 17 °C, u etanolu 66,7 g/100 ml, a topljiv je i u eteru.

Benzojeva kiselina ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$, $M = 122,10$) dolazi u obliku bezbojnih monoklinski igličastih kristala temperature taljenja $t_t = 122,4$ °C i vrelišta $t_v = 249,2$ °C te gustoće $\rho = 1,2659$ g/ml. Slabo je topljiva u vodi, vrlo dobro u etanolu, dok je u eteru netopljiva.

Kemijska reakcija:



Kemikalije:

benzaldehyd	8 ml ($\rho = 1,045 \text{ g/ml}$; 8,36 g; 0,078 mol)	štetno ako se proguta
NaOH (w = 25 %)	20 ml	izaziva teške opekline
diklormetan	30 ml	nadražujuće, otrovno (kancerogeno?)
MgSO ₄ (bezvodni)	za sušenje	nadražujuće
HCl koncentrirana		izaziva opekline, nadražuje dišni sustav
lakmus-papir		
aktivni ugljen		

Pribor:

tikvica s okruglim dnom od 100 ml; Liebigovo hladilo; lijevak za odjeljivanje od 100 ml; Erlenmeyerove tikvice od 100 ml; lijevak; odsisna boca 150 – 200 ml; Büchnerov lijevak; vodena kupelj; uređaj za destilaciju s tikvicom od 100 ml i 25 ml; (vakuum-) lula.

Postupak:

Za reakciju je važno da se upotrebljava svježe destilirani benzaldehid ($t_v = 178 - 179 \text{ }^\circ\text{C}$). Naime, na zraku se benzaldehid lako oksidira u benzojevu i perbenzojevu kiselinu (tehnički benzaldehid može se pročistiti prema postupku opisanom u Dodatku II). U tikvicu s okruglim dnom od 100 ml stavi se 20 ml otopine natrijeva hidroksida (w = 25 %) i 8 ml svježe destiliranog benzaldehida te se smjesa dobro (ručno) mučka desetak minuta, uz povremeno otvaranje tikvice. Treba voditi računa o tome da otopina hidroksida nagriza staklo pa se tikvica nikako ne smije ostaviti začepljena staklenim čepom dulje vrijeme ili se umjesto staklenog može upotrijebiti pluteni čep. Mučkati treba kako bi nastala gusta emulzija i tada se tikvica ostavi preko noći, ali prije stavljanja čepa brus tikvice iznutra treba obrisati čistom krpom (oprezno jer otopina natrijeva hidroksida izaziva opekline!). U sljedećem terminu vježbi u tikvicu se stave kamenčići za vrenje, a na tikvicu se stavi povratno hladilo. Ponovno, da ne bi došlo do sljepljivanja aparature zbog otopine hidroksida, na gornji dio brusa okrugle tikvice može se tanko namazati sloj silikonske masti prije stavljanja hladila. Reakcijska se smjesa refluksira zagrijavanjem preko električne grijače ploče (treba ključati, ali ne prebruno!) otprilike 0,5 – 1 sat, pri čemu uljasti sloj benzaldehida treba potpuno nestati. Reakcijska se smjesa ohladi (ako se natrijev benzoat počne taložiti, treba dodati vode dok se ne otopi) i prenese u lijevak za odjeljivanje. Benzil-alkohol ekstrahira se triput iz vodene otopine s po 10 ml diklormetana. Vodeni sloj u kojem je otopina natrijeva benzoata (razmislite koji je to sloj, gornji ili donji?) spremi se za drugi dio vježbe.

Ekstrakt diklormetana zatim se suši u suhoj začepljenoj Erlenmeyerovoj tikvici preko bezvodnog natrijeva ili magnezijeva sulfata (suši se barem pola sata; za to vrijeme sastaviti aparaturu za jednostavnu destilaciju, slika 13). Suhi diklormetanski ekstrakt filtrira se preko lijevka sa suhim nabranim filter-papirom u uređaj za jednostavnu destilaciju s tikvicom od 100 ml. Diklormetan se ukloni destilacijom na vodenoj kupelji (vrelšte 40 °C) ili s pomoću rotacijskog uparivača. U prvom slučaju u tikvicu treba staviti kamenčiće za vrenje ako se za zagrijavanje vodene kupelji upotrebljava grijaća ploča. Sirovi benzil-alkohol potom se prebaci u manju okruglu tikvicu (od 25 ml) s kamenčićima za vrenje i destilira pri 198 – 205 °C (zabilježiti točnu temperaturu vrelišta!) izravnim zagrijavanjem tikvice mikroplamenikom i preko zračnog hladila (ili se iz Liebigova hladila ispusti voda!) te se destilat skuplja u izvagani predložak. Izvaži se i izračuna iskorištenje (literaturno iskorištenje jest 2,3 g; treba izračunati teorijsko iskorištenje i vlastito iskorištenje u odnosu na teorijsko i literaturno).

Vodenoj otopini natrijeva benzoata uz miješanje se dodaje koncentrirana solna kiselina do pH 2– 3 (dodaje se polako i provjerava lakmusom). Protoniranjem benzoata nastaje benzojeva kiselina netopljiva u vodi i stoga se taloži (bijeli talog). Talog se skupi filtracijom kako je opisano u 1. vježbi i osuši na zraku. Čista se benzojeva kiselina izvaži i izračunaju se iskorištenja (literaturno iskorištenje jest 3,0 g).

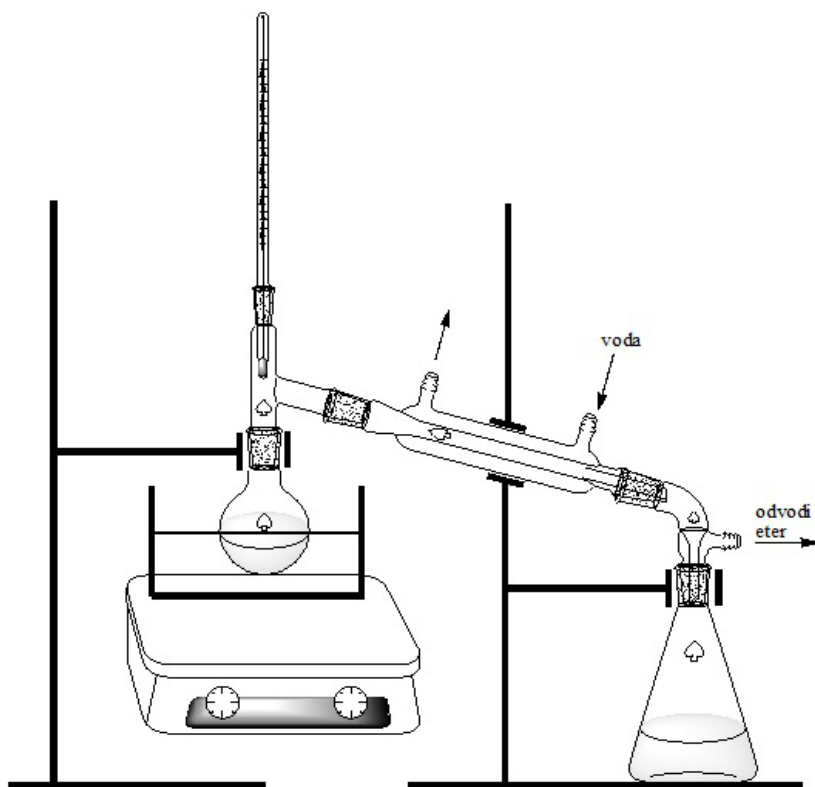
Snimite i usporedite FT-IR ili ATR spektre benzaldehida i produkata (vježba 9; teorija spektroskopije i postupak opisani su u Dodatku III!). Za FT-IR tekući se uzorci nanose na pločice od natrijeva klorida. Treba izbjegavati dodirivanje glatke površine pločice NaCl golim prstima jer vlaga otapa pločice. Nakon snimanja pločicu treba isprati suhim diklormetanom (ili kloroformom) i osušiti. Spektar krutog uzorka (benzojeve kiseline) treba snimiti tehnikom KBr pastile. Pri snimanju ATR spektara, uzorci se, tekući i kruti, stavljaju izravno na uređaj (ATR kristal, dijamant i sl.), bez prethodne pripreme.

Napomene:

Umjesto diklormetana, za ekstrakciju benzil-alkohola može se upotrijebiti jednaka količina dietil-etera. Nakon sušenja za otparavanje etera u digestoru se sastavi aparatura za jednostavnu destilaciju, ali se umjesto obične stavlja vakuu-lula koja je gumenom cijevi spojena s izljevom (slika 15). Zagrijava se magnetskom miješalicom s grijanjem vodene kupelji na 50 – 60 °C. Kad se upotrebljava magnetska miješalica, magnetič u tikvici ima ulogu kamenčića za vrenje. Ako je to moguće, eter se mnogo brže i sigurnije može oddestilirati u rotacijskom uparivaču.

Zadatak:

Opišite Swernovu oksidaciju i objasnite njezin mehanizam. Navedite primjenu ove reakcije i jasno naznačite što se oksidira, a što reducira u ovoj reakciji te označite oksidacijske brojeve na ugljikovim atomima koji se mijenjaju u reakciji. Kritički se osvrnite na ovu reakciju i istaknite neke njezine prednosti i nedostatke u usporedbi s drugim sličnim redoks-reakcijama.



Slika 15. Aparatura za destilaciju (otparavanje) etera

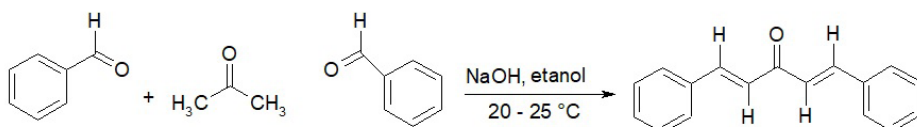
7. Aldolna kondenzacija: Sinteza dibenzilidenacetona [2]

Ako se aldehid koji ima α -proton (proton na ugljiku koji je vezan na karbonilni ugljik) stavi u otopinu hidroksida, nastaje enoladni ion koji kao nukleofil napada elektrofilni ugljik karbonilne skupine druge molekule aldehida. Dolazi do **aldolne reakcije** i nastaje β -hidroksialdehid (= ALDOL). Često u sljedećem koraku, a još i lakše ako se reakcija zagrijava, dolazi do dehidratacije i nastaje α, β -nezasićeni aldehid pa onda kažemo da se odvija **aldolna kondenzacija**. Aldolna se reakcija može odvijati i kod ketona, ali teže jer su ketoni slabije reaktivni od aldehida; kako su ove reakcije reverzibilne, kod ketona je ravnoteža obično više na strani ketona, a manje na strani β -hidroksiketona.

Aldolna kondenzacija često je primjenjivana reakcija za sintezu novih C-C veza. U reakciji se mogu upotrijebiti i dva različita aldehida, dva različita ketona ili aldehid i keton te se takve reakcije nazivaju miješanim (ili unakrsnim) aldolnim reakcijama. Teoretski, takve reakcije mogu istovremeno dati četiri različita produkta, što sintetski najčešće nije korisno. Stoga se obično primjenjuje varijanta miješane aldolne reakcije, tzv. **Claisen-Schmidtova kondenzacija**. Kod takvih miješanih aldolnih reakcija obično se upotrebljava keton u reakciji s aldehidom bez α -protona kako bi samo keton dao enoladni ion koji napada karbonilnu skupinu aldehida. Budući da je karbonilna skupina ketona slabije reaktivna od aldehidne, enoladni ion koji potječe iz ketona reagira prvenstveno s aldehidom, a ne s drugom molekulom ketona. Kako bi se to još više pospješilo, aldehid se stavlja u otopinu hidroksida, a keton se onda dodaje postupno u manjim obrocima.

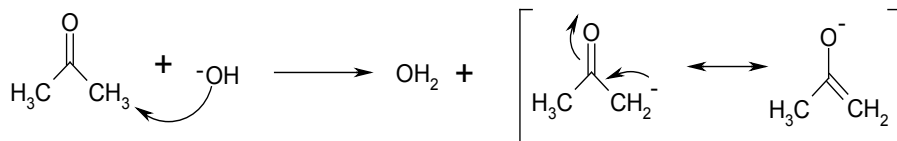
Aceton ima dvije metilne skupine s α -protonima, stoga u reakciji s benzaldehidom u otopini hidroksida može doći do dvije aldolne kondenzacije. Do kondenzacije dolazi spontano već i pri sobnoj temperaturi jer nastaje spoj u kojemu su karbonilna i dvostruka veza konjugirane i s aromatskim prstenom. Pritom prvo vjerojatno nastaje (mono)benzilidenaceton ($C_6H_5CH=CH_2COCH_3$) koji je reaktivniji od samog acetona, stoga u drugom koraku stvara enolat-anion koji reagira s još jednom molekulom benzaldehida. Konačni produkt, dibenzilidenaceton, spoj je koji se nekad upotrebljavao kao aktivan sastojak krema za sunčanje zbog dobre apsorpcije štetnih UV zraka ($\lambda_{max} = 331 \text{ nm}$).

Ukupna reakcija:

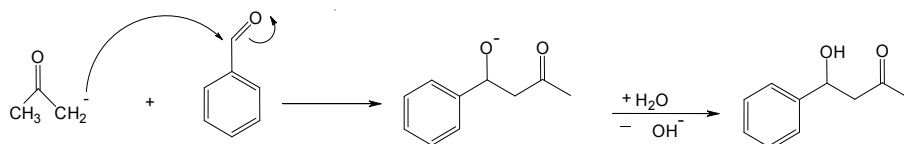


Mehanizam reakcije:

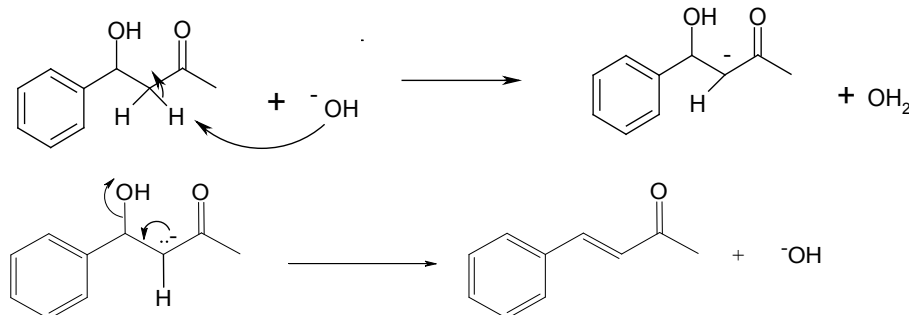
U početnom stupnju dolazi do uklanjanja protona metilne skupine (α -proton!) s pomoću hidroksida i nastaje enolat acetona. Enolat acetona rezonancijski je stabiliziran:



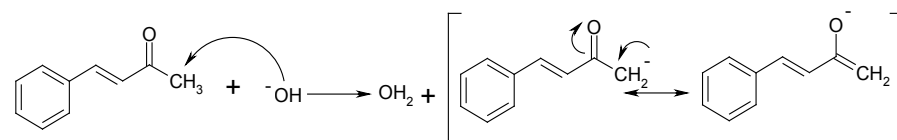
Potom dolazi do nukleofilnog napada enolata na ugljikov atom aldehidne skupine benzaldehida:



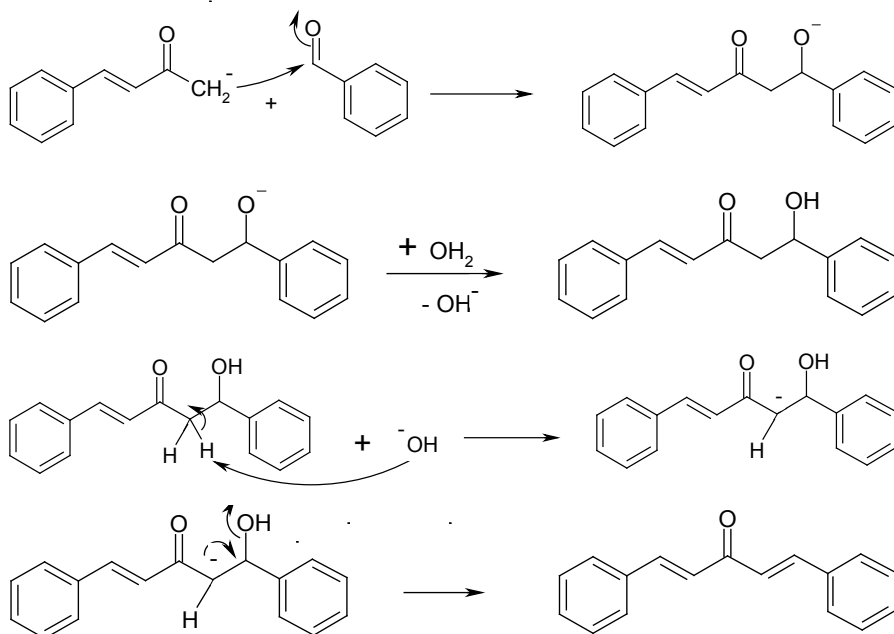
β -hidroksikarbonilni spoj ponovno se deprotonira na α -ugljikovu atomu te dolazi do eliminacije OH skupine i nastaje prvi produkt, (mono)benzilidnacetone:



Budući da se u reakciji dodaje benzaldehid u suvišku, cijela se reakcija ponavlja i na drugoj metilnoj skupini koja potječe iz acetona. Dakle, nakon što se proton α,β -nezasićenog karbonilnog spoja ukloni s pomoću hidroksidnog iona ponovno nastaje enolat:



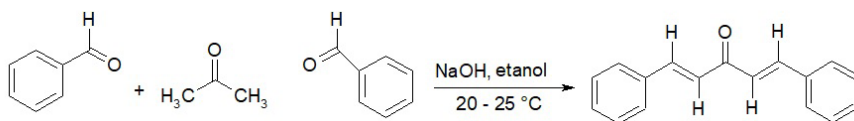
Slijedi nukleofilni napad enolata na ugljikov atom aldehidne skupine druge molekule benzaldehida te jednak mehanizam kao s prvim molom benzaldehida:



Fizikalna svojstva:

Dibenzilidenaceton (dibenzalaceton, 1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-on; $C_{17}H_{14}O$, $M = 234,29$) dolazi u obliku žutih kristala i ima temperaturu taljenja $t_f = 112 - 114$ °C. Ne otapa se u vodi, slabo je topljiv u eteru i alkoholu, ali se dobro otapa u acetonu i kloroformu.

Kemijska reakcija:



Kemikalije:

benzaldehyd	3,0 ml (3,15 g; 0,0297 mol)	štetno ako se proguta
aceton	1,0 ml (0,79 g; 0,0135 mol)	lako zapaljivo, nadražuje oči
etanol (w = 95 %)	25 ml + za prekrystalizaciju	lako zapaljivo, štetno

NaOH (w = 10 %) 5 ml
5 % CH₃COOH u etanolu

izaziva teške opekline
lako zapaljivo, štetno,
octena kiselina izaziva
opekline

Pribor:

2 Erlenmeyerove tikvice od 100 ml (jedna sa širokim grlom, jedna s čepom); staklena čaša od 50 ili 100 ml; menzura od 25 ml; odsisna boca; Büchnerov lijevak; električna grijaća ploča; lakmus-papir.

Postupak:

U Erlenmeyerovoj tikvici od 100 ml otope se benzaldehid i aceton u etanolu. Otopina natrijeva hidroksida razrijedi se s 25 ml vode i postupno doda reakcijskoj otopini uz ručno miješanje. Reakcijska se tikvica zatvori i intenzivno miješa/mučka 10 minuta uz povremeno otvaranje tikvice kako bi se tlak u tikvici izjednačio s atmosferskim.

Smjesa se potom ostavi 45 minuta na sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje (otvarati povremeno tikvicu radi izjednačavanja tlakova!). Pri miješanju nastaje dibenzilidenaceton u obliku emulzije, a nakon toga se kristalizira u obliku žutih kristala. Kristali se odsišu s pomoću Büchnerova lijevka i isperu s 10 ml vode. Lakmus-papirom treba provjeriti je li filtrat pri izlazu iz Büchnerova lijevka lužnat. Ako filtrat reagira lužnato, kristale prebaciti u okruglu tikvicu i dodati oko 10 ml **hladne** 5 %-tne octene kiseline u 95 %-tnom etanolu. Miješati suspenziju i zatim ponovno filtrirati preko odgovarajućeg Büchnerova lijevka. Kristale u lijevku isprati malom količinom (< 1 ml) **hladnog** 95 %-tnog etanola. Kristali se suše među listovima grubog filter-papira. Suhi se kristali prekrizaliziraju u Erlenmeyerovoj tikvici (100 ml sa širokim grlom) preko električne grijaće ploče iz vrućeg etanola (postupno dodavati minimalne količine etanola!). Nakon sušenja izvagati čiste kristale, izmjeriti temperaturu tališta kako je opisano u vježbi 1.c (str. 31.), snimiti UV-spektar (vježba 9) i izračunati iskorištenje. Literaturno iskorištenje iznosi 2,0 g.

Zadatak:

Pronađite u literaturi izvor koji opisuje upotrebu dibenzilidenacetona u kremama za sunčanje. Citirajte taj izvor i ukratko opišite na čemu se bazira zaštita ovim spojem od štetnog sunčeva zračenja. Navedite još neke primjere aktivnih tvari u kremama za sunčanje i navedite na kojem principu djeluju zaštitno.

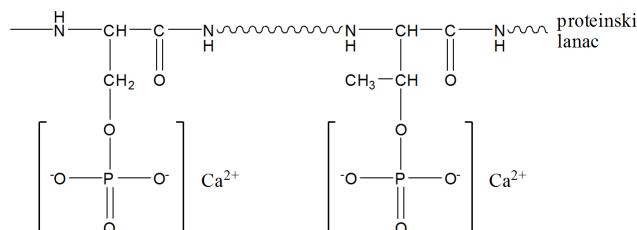
8. Izolacija kazeina, albumina i laktoze iz mlijeka [1] [7]

Izolacija je, u širem smislu, izdvajanje produkta iz reakcijske smjese. Pritom se primjenjuju metode pročišćavanja koje su uglavnom opisane u prethodnim vježbama. U užem smislu, izolacija znači izdvajanje nekog spoja iz prirodnog materijala. Iako je organska sinteza značajno napredovala te se danas sintetski može prirediti veliki broj organskih spojeva koji su poznati u prirodi (*prirodni spojevi*) kao i sasvim novih spojeva (*sintetski spojevi*), izolacije prirodnih materijala još su uvijek veoma značajne. Naime, mnogi prirodni spojevi imaju primjenu u svakodnevnom životu čovjeka, a sintetski se ne mogu dobiti ili je njihova sinteza zahtjevna i skupa. Primjerice, kazein koji se upotrebljava kao ljepilo, još uvijek se dobiva samo izolacijom iz mlijeka. Osim toga, postoje i *polusintetski spojevi* koji se dobivaju tako što se prirodni spojevi izolirani iz prirodnih materijala sintetski modificiraju za određenu upotrebu (npr. brojni polusintetski antibiotici dobiveni modifikacijama penicilina).

Mlijeko u prosjeku sadržava oko 87 % vode i 13 % suhe tvari. Sadržava važne vitamine, minerale, proteine, ugljikohidrate i lipide, gotovo sve što je potrebno za rast i razvoj, osim vitamina C i željeza. Punomasno mlijeko sadržava oko 4 % lipida (masti). Masnoće u mlijeku uglavnom su trigliceridi; zasićene su oko dvije trećine svih masnih kiselina, a jednu trećinu čine nezasićene masne kiseline. Ostali lipidi uključuju malu količinu kolesterola, fosfolipida i lecitina (fosfolipida konjugiranog s kolinom). U mlijeku se prisutni globularni proteini, i to kazeini, albumini i laktoglobumini, a glavni ugljikohidrat u mlijeku jest disaharid laktoza. U mlijeku sisavaca ima približno oko 5 % (+)-laktoze i 3 % kazeina.

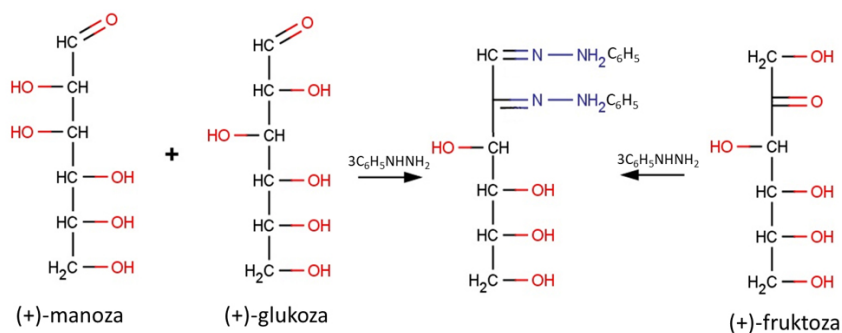
Kazein je fosfoprotein (proteid) i najvažniji protein u mlijeku, a dolazi u obliku kompleksne kalcijeve soli – kalcijeva kazeinata. Kazein je zapravo smjesa nekoliko srodnih proteina poznatih kao α -, β - i κ -kazeini. Ni alfa- ni beta-kazein nisu topljivi u mlijeku pojedinačno ni u kombinaciji, ali ako se jednom ili drugom ili njihovoj kombinaciji doda kapa-kazein, nastaje kazeinski kompleks koji je topljiv zbog formiranja micela.

Kazein se sastoji od stotina aminokiselina, a njihovi bočni lanci sadržavaju karakteristične skupine kao što su hidroksilna, amino, karboksilna i amidna skupina. Sadržava otprilike 0,9 % fosfora koji se nalazi u fosfatnim skupinama vezanima na hidroksilne skupine treonina i serina. Ove fosfatne skupine s kalcijevim ionima tvore soli, a dodatkom kiseline neutralizira se negativno nabijena površina micela i tada se kazein taloži.



Disaharid **laktoza** ili mliječni šećer jedini je ugljikohidrat koji sisavci mogu sintetizirati. Industrijski se dobiva iz sirutke, a djelovanjem enzima emulzina (koji cijepa samo β -glikozidne veze!) dobivaju se jednake količine D(+)-glukoze i D(+)-galaktoze. Laktoza je, dakle, β -glikozid u kojem glukopiranozna jedinica čini reducirajući dio molekule.

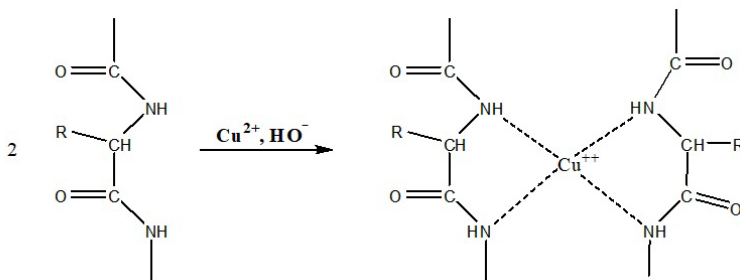
Reduktivni šećeri, kao što su laktoza, glukoza i galaktoza te brojni drugi (svi koji imaju slobodnu poluacetalnu skupinu!), reagiraju s fenilhidrazinom, ali za razliku od tipičnih karbonilnih spojeva (aldehidi, ketoni), ugljikohidrati reagiraju s tri mola reagensa i daju 1,2-difenilhidrazonske derivate tzv. **osazone**. Nastajanje osazona karakteristično je za α -hidroksi aldehide i α -hidroksiketone. Mehanizam, pretpostavlja se, započinje reakcijom karbonilne skupine s prvim molom fenilhidrazina jednako kao što aldehidi i ketoni reagiraju s hidrazinom dajući hidrazone, a potom se i α -hidroksilna skupina oksidira fenilhidrazinom. Osazoni su bili prvi kruti derivati koji su se upotrebljavali pri proučavanju strukture i stereokemije šećera. Njemački kemičar Emil Fischer otkrio je da dvije aldoheksoze, (+)-glukoza i (+)-manoza te ketoheksoza (+)-fruktoza daju isti osazon, što upućuje na istu konfiguraciju na ugljikovim atomima 3, 4 i 5. Glukoza i manozna razlikuju se samo prema konfiguraciji na atomu ugljika C-2 i takvi stereoisomeri nazivaju se **epimerima**:



Osazoni su često obojeni spojevi karakteristične kristalinične strukture pa se, uz mjerenje temperature taljenja, često upotrebljavaju i ove značajke osazona u identifikaciji pojedinih šećera (boja i oblik kristala). U principu, fenilhidrazinski test može se upotrebljavati za dokazivanje svih reduktivnih ugljikohidrata, ali sam spoj fenilhidrazin i fenilhidrazinski reagens veoma su štetni te se u ovoj vježbi za dokazivanje laktoze primjenjuje Benedictova test-reakcija.

U ovoj vježbi za izolaciju kazeina i laktoze upotrebljava se evaporirano obrano mlijeko koje sadržava otprilike 4 % vode, 29 % kazeina, 7 % albumina, 0,5 % masti, 51 % laktoze i 8,5 % minerala. Izolacija je lakša ako se upotrebljava mlijeko sa što manje mliječne masti. Proteini se u postupku talože promjenom pH-vrijednosti (kazein) i djelomičnom denaturacijom pri zagrijavanju (albumin). Ti se proteini zatim odjeljuju filtriranjem, a iz matičnice se izolira laktoza.

Izolirani kazein i laktoza dokazuju se test-reakcijama. Kazein se dokazuje Biuret testom. **Biuret test** ukazuje na prisutnost ostataka aminokiselina peptida koji sadržavaju dva aminokiselinska ostatka ili više aminokiselinskih ostataka te se stoga upotrebljava za određivanje prisutnosti proteina. Ovaj test temelji se na činjenici da aminokiselinski ostaci formiraju kompleks (ljubičastoplavi) s Cu^{2+} ionom (svjetloplavi) u bazičnom mediju:

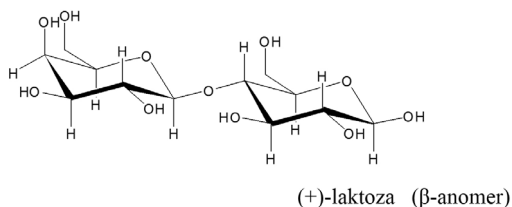


Laktoza se, kao i drugi reduktivni šećeri, može dokazati test-reakcijama kao što su testovi po Benedictu i Tollensu (tzv. reakcija srebrnog zrcala). Tollensov reagens jest otopina kompleksnog $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$ iona koji se u reakciji s aldehidnom skupinom reducira u elementarno srebro („srebrno zrcalo“). Aldehidna skupina RCHO pritom se oksidira do karboksilata RCOO^- . Benedictov reagens jest otopina natrijeva citrata, natrijeva karbonata i modre galice ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$) u vodi. U bazičnoj otopini Cu^{2+} ioni (plave boje) se, također u reakciji s aldehidnom skupinom, reduciraju i nastaje netopljivi talog Cu_2O crvene ili smeđe boje. Otopina treba biti alkalna i zato se dodaje natrijev karbonat, a natrijev citrat dodaje se kako ne bi istaložio netopljiv CuCO_3 . Citrat s Cu^{2+} ionom formira kompleks topljiv u vodi plave boje pa je test pozitivan kad se izgubi plavo obojenje, odnosno kad nastane crveno-smeđi talog (boja taloga ili zamućenja ovisi o šećeru!). Benedictova test-reakcija upotrebljava se i za dokazivanje prisutnosti glukoze u urinu (indikacija za dijabetes!). Za utvrđivanje dijabetesa Benedictov test treba napraviti dva sata poslije jela.

Fizikalna svojstva:

Laktoza (4-O-(β -D-galaktopiranozil)-D-glukopiranoza; $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, $M = 342,30$), ima temperaturu taljenja $t_f = 253 \text{ }^\circ\text{C}$; $\rho = 1,59 \text{ g/ml}$; $[\alpha]_D^{20} = 34,2 \text{ }^\circ$. Vrlo je dobro topljiva u vodi, djelomično topljiva u etanolu, netopljiva u eteru.

Strukturna formula laktoze:



Kemikalije:

obrano mlijeko u prahu	10 g	
octena kiselina (w = 10%)	~ 3 – 5 ml	zapaljivo, izaziva teške opekline
acetone	30 ml	lako zapaljivo, nadražuje oči
Ca(OH) ₂	3 g	nadražuje dišni sustav i kožu
Na ₂ CO ₃	0,14 g	nadražuje oči
CaCO ₃ praškasti	3 g	
etanol (w = 96 %)	10 ml	lako zapaljivo, štetno
	(+ za pročišćavanje)	

Za Biuret-test: 10 %-tna otopina NaOH (1 ml) i 2 %-tna otopina CuSO₄ (do 10 kapi)

(modra galica štetna je ako se proguta, nadražuje oči i kožu, NaOH uzrokuje teške opekline).

Za Benedictov test: 173 g natrijeva citrata, 100 g Na₂CO₃ i 17,3 g modre galice otopi se u vodi do konačnog volumena od 1 litre.

Za Tollensov test: 5 %-tna otopina AgNO₃, 10 %-tna otopina KOH i nekoliko kapi koncentriranog amonijaka.

Pribor:

čaše od 250 i 50 ml; alkoholni termometar; menzure od 10 i 100 ml; Erlenmeyerova tikvica od 100 ml; Hirschov lijevak; lijevak $\phi = 6 - 7$ cm (i manji ~ 4 cm); odsisna boca; vodena kupelj; porculanska zdjelica za uparivanje $\phi = 6 - 7$ cm; tikvica s okruglim dnom od 20 ml; Liebigovo hladilo.

Postupak:

a) Izolacija kazeina

U čašu od 250 ml stavi se 10 g obranog mlijeka u prahu i otopi se u ~ 100 ml destilirane vode. Otopina se uz miješanje alkoholnim termometrom zagrije preko električne grijače ploče na 40 °C i uz dalje miješanje dokapava se razrijeđena octena kiselina (w = 10 %) do prestanka izlučivanja kazeina. Octena se kiselina dodaje postupno kako višak ne bi prouzročio hidrolizu laktoze na glukozu i galaktozu (ukupno će se dodati oko 3 – 5 ml razrijeđene octene kiseline, a pH smjese na kraju trebao bi biti 4,6). Kad se kazein istaloži, odlije se što je moguće više bistre otopine iznad taloga, a zatim se sadržaj čaše filtrira preko navlaženog grubog naboranog filter-papira. Talog se s filter-papira prenese na Büchnerov lijevak i što bolje odsiše te se matičnica spoji s prethodnim. Matičnica sadržava albumin i laktozu te služi za drugi dio vježbe. Dobiveni kazein prebaci se u čašu od 50 ml, doda se 15 ml acetona, dobro promiješa i ponovno odsiše preko Büchnerova lijevka. Ispiranje taloga acetonom ponovi

se još jednom na jednak način. Svrha ovog ispiranja acetonom jest uklanjanje vode i male količine masti iz kazeina. Vlažni kazein stavi se u tarionik i suši uz povremeno mrvljenje tučkom kako bi se dobio praškasti produkt. Najbolje je sušiti preko noći (do sljedećeg termina vježbi), ali nikako ne ostaviti na filter-papiru. Suhi produkt izvaže se te se izračuna maseni udio u mlijeku. Malo kazeina otopi se u 1 ml vode i napravi test za proteine naveden u nastavku.

Biuret test

U epruveti nježno pomiješati 1 ml 10 %-tne otopine NaOH s 1 ml vodene otopine kazeina. Dodati jednu kap 2 %-tne otopine bakar(II)-sulfata. Miješati dok se ne uoči ružičasto ili ljubičasto obojenje. Ako se ono ne pojavljuje, dodati još jednu kap otopine bakar(II)-sulfata (do 10), miješati nakon svakog dodatka. Nastanak ružičaste ili ljubičasto-plave otopine znači pozitivan test.

Kazeinsko ljepilo

U digestoru (ne smije se udisati prah kalcijeva hidroksida!) se u tarioniku pomiješa 1 g praškastog kazeina, 3 g kalcijeva hidroksida i 0,14 g bezvodnog natrijeva karbonata i sve se zajedno dobro izmrvli. Dobiveno suho ljepilo stavi se u bočicu s čepom, a mokro se ljepilo priredi tako što se postupno i uz miješanje dodaje 1 g suhog ljepila u 2,5 ml vode.

b) Izolacija albumina

U matičnicu odvojenu od kazeina doda se 3 g praškastog kalcijeva karbonata kako bi se neutralizirao višak octene kiseline. Promiješa se i zagrijava 15 minuta pri temperaturi vrenja, pri čemu se gotovo sav albumin istaloži (koagulacija proteina temperaturom!). Vruća se otopina filtrira uz odsisavanje preko zagrijanog Büchnerova lijevka – filtrat se upotrebljava za izolaciju laktoze u postupku c).

c) Izolacija laktoze

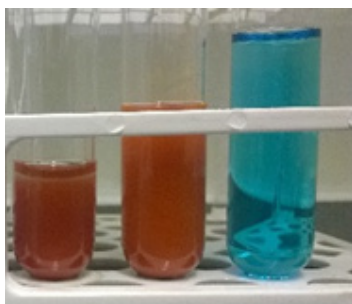
Filtrat se prenese u čašu od 250 ml i s pomoću grijaće ploče upari na volumen ~ 20 – 30 ml. Pri koagulaciji albumina i uparivanju filtrata često dolazi do lupanja i stvaranja pjene, što se sprječava miješanjem staklenim štapićem i puhanjem. Ako se pri uparivanju izluči dodatna količina albumina, treba ga ponovno ukloniti vrućom filtracijom preko naboranog filter-papira. Zatim se bistri filtrat prebaci u porculansku zdjelicu te se nastavi s uparivanjem na vodenoj kupelji (= veća čaša s vodom) do približno 5 ml. U još vruću otopinu u porculanskoj zdjelici doda se 10 ml etanola ($w = 96\%$) i ostavi bez protresivanja da se iskristalizira laktoza (može se ostaviti do sljedećeg termina vježbi). Iskristalizirana laktoza odvoji se filtriranjem preko Hirschova lijevka, osuši i izvaže (iskorištenje približno 2,5 g). Sirova se laktoza može prekristalizirati iz minimalne količine vruće vode uz dodatak dvostrukog volumena etanola ($w = 0,96$). Produkt se osuši i izvaže (iskorištenje približno 1,5 g). U malo vode otopi se nekoliko kristalića laktoze i upotrebljava za Benedictovu test-reakciju.

Benedictova test-reakcija

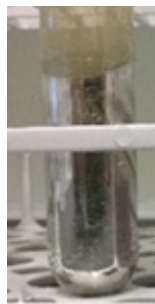
U epruvetu se stave 3 ml Benedictova reagensa i zagrije do vrenja u vodenoj kupelji (čšaša s vodom) jednu minutu. Doda se 8 kapi otopine laktoze u vodi i dalje se zagrijava u vrijućoj vodenoj kupelji 4 – 10 minuta. Treba pratiti i zabilježiti sve promjene boje. Saharoza nije reduktivan šećer te otopina ne mijenja boju i ostaje plava, glukoza daje crveno-plavu otopinu, a galaktoza narančasto-crvenu. Kakva je promjena boje kod laktoze? Isprobajte ovaj test s još nekim šećerima (fruktoza, maltoza, trehaloza itd.).

Tollensov test

U staklenoj epruveti otopi se sedan od reduktivnih šećera tako da se na vrh spatule doda mala količina šećera koja se potom otopi s 1 ml destilirane vode. U novoj epruveti priredi se svježi Tollensov reagens tako da se doda oko 1 ml 5 %-tne otopine AgNO_3 i nekoliko kapi 10 %-tne otopine KOH, pri čemu nastaje tamnosivi talog. U otopinu s talogom potom se doda nekoliko kapi koncentriranog amonijaka, pri čemu dolazi do potpunog otapanja taloga. Sadržaj dviju epruveta nakon toga se pomiješa i stavi u vodenu kupelj te zagrijava 10 minuta do pojave elementarnog srebra u obliku zrcala na stijenka epruvete.



Slika 16. Benedictov test



Slika 17. Tollensov test

Kvantitativno određivanje glukoze upotrebom Benedictova reagensa (vidi Dodatak II!)

Zagriju se po 1 ml otopine glukoze različitih koncentracija (0, 1, 3, 7, 10, 20 i 50 mM) i 1 ml Benedictova reagensa. Reakcijska se smjesa ohladi te joj se snimi spektar na valnoj duljini od 735 nm, što je maksimum apsorpcije bakrova(I) oksida (Cu_2O), produkta Benedictove reakcije. Napravi se kalibracijska krivulja koja predstavlja linearnu ovisnost poznatih koncentracija glukoze i apsorpcije pri valnoj duljini od 735 nm (što je veća koncentracija glukoze u uzorku, to će apsorpcija biti veća). Potom se linearnom regresijom odredi jednadžba pravca – iz ovog je pravca moguće izračunati koncentraciju za bilo koji uzorak otopine glukoze nepoznate koncentracije na temelju očitane apsorpcije.

Zadatak:

Napišite kemijske jednadžbe svih reakcija (reakcije tijekom izolacije i sve test-reakcije) koje ste napravili u vježbi i objasnite njihov mehanizam. Kod mehanizma hidrolize šećera naznačite stereokemiju reaktanata i produkata.

9. UV-vis i FTIR/ATR spektroskopija

Teorija i principi UV-vis i IR spektroskopije opisani su u Dodatku III ove skripte.

a) UV-vis spektroskopija

Materijali i metode:

UV-vis spektrofotometar (Cary 60); kvarcne kivete; čaše; kapalice; otopina β -karotena (iz vježbe 2); otopina klorofila a i klorofila b (iz vježbe 2); dibenzilidenaceton (iz vježbe 7) otopljen u etanolu; heksan; aceton.

Postupak:

Snimiti uzorke dobivene u vježbama 2. i 7. tako da se najprije snimi uzorak čistog otapala (upotrebljava se ono otapalo u kojem je otopljen uzorak), a potom otopina uzorka. U **referatu** navesti zajedničke **materijale i metode**, opisati **postupak** i kao **rezultat** priložiti slike snimljenih spektara. Ispod svake slike spektra navesti naziv slike (npr. Slika 3, UV-vis spektar dibenzilidena u etanolu) te potom opisati sliku. Slika se opisuje tako da se navedu maksimalne valne duljine i raspon valnih duljina apsorpcije te treba objasniti i povezati te valne duljine sa strukturom spoja. Ako se radi o smjesi spojeva, navesti kojem spoju pripadaju pojedine vrpce apsorpcije u spektru. Izvedite svoj **zaključak** o primijenjenoj metodi.

b) FTIR/ATR spektroskopija

Materijali i metode:

FTIR spektrofotometar (Cary 630) s ATR dodatkom; špatule; vata; kapalice; salicilna kiselina i acetilsalicilna kiselina (iz vježbe 5); benzaldehid, benzil-alkohol i benzojeva kiselina (iz vježbe 6); aceton ili etanol.

Postupak:

Snimiti uzorke dobivene u vježbama 5. i 6. upotrebom ATR dodatka. Uzorci se stavljaju izravno na dijamant ATR-a koji se prethodno treba očistiti acetonom ili etanolom. Prije snimanja uzorka treba snimiti „pozadinu” (*engl.* background), a to je spektar zraka. Tekući uzorak stavi se na vrh dijamanta ako je dovoljno viskoznan. Kruti uzorak stavi se na vrh dijamanta i zatim usitni dodatkom na ATR-u („preša”). U **referatu** treba navesti zajedničke **materijale i metode**, opisati **postupak** i kao **rezultat** priložiti slike snimljenih spektara. Ispod svake slike spektra navesti naziv slike te potom opisati sliku. Slika se opisuje tako da se navedu najvažnije apsorpcijske vrpce karakteristične za svaki spoj te treba objasniti i povezati ove valne brojeve sa strukturom spoja (funkcionalne skupine!). Usporedite spektre reaktanata i produkata iz pojedine vježbe (spektre salicilne i acetilsalicilne kiseline te spektre benzaldehida sa spektrima benzil-alkohola i benzojeve kiseline). Naglasite po čemu ste zaključili da ste dobili (ili niste!) traženi produkt. Izvedite svoj **zaključak** o primijenjenoj metodi.

Zadatak:

Usporedite ukratko primijenjene metode UV-vis i FTIR/ATR spektroskopije!

DODATAK UZ VJEŽBE

I. Pročišćavanje tehničkog benzaldehida (uz 6. i 7. vježbu)

50 g (48 ml) tehničkog benzaldehida ispire se u lijevku za odjeljivanje najprije s 20 ml (3 puta) 10 %-tne otopine Na_2CO_3 (tj. dok se više ne razvija CO_2), zatim s vodom, a potom se suši preko 5 g bezvodnog MgSO_4 ili CaCl_2 . Dodati 0,5 g hidrokinona ili katehola za vrijeme sušenja. Dekantirati kroz mali smotuljak staklene vune (ili filter-papir) u tikvicu od 100 ml te destilirati uz vakuum.

Tlak / mmHg	760	50	30	25	20	15	10
Vrelište / °C	179	95	84	79	75	69	62

U destilirani produkt staviti oko 0,05 g hidrokinona ili katehola (= antioksidansi) da bi se spriječila autooksidacija benzaldehida (nastaju peroksibenzojeva i benzojeva kiselina).

II. Kvantitativno određivanje glukoze upotrebom Benedictova reagensa (uz 8. vježbu)

Za kvantitativno određivanje glukoze u uzorku upotrebljavaju se različiti biokemijski eseji kao što su alkalni ferocijanid, aromatski amini poput anilina, benmidina, 2-aminodifenila i o-toluidina koji u reakciji s glukozom upotrebom tople otopine octene kiseline daju obojene derivate. Koncentracija glukoze odredi se snimanjem produkata reakcije pri određenoj valnoj duljini, ovisno o upotrijebljenom reagensu. Međutim, jedan od glavnih nedostataka navedenih metoda jest kancerogenost reagensa te se zbog toga najčešće primjenjuje kolorimetrijska reakcija Benedictova reagensa u prisustvu reducirajućih šećera.

Zagrijavanjem smjese Benedictova reagensa i reducirajućeg šećera dolazi do promjene boje otopine iz plave u zelenu, potom u crvenu i na kraju u smeđu boju. Reakcijska se smjesa ohladi te joj se snimi spektar na valnoj duljini od 735 nm upotrebom UV-VIS spektrofotometra. Odabrana valna duljina predstavlja maksimum apsorbancije bakrova(I) oksida (Cu_2O) koji je produkt Benedictove reakcije. Za određivanje koncentracije glukoze u uzorku nepoznate koncentracije najprije treba napraviti kalibracijsku krivulju koja predstavlja linearnu ovisnost poznatih koncentracija glukoze i apsorbancije pri valnoj duljini od 735 nm (što je veća koncentracija glukoze u uzorku, to će apsorbancija biti veća). Potom se linearnom regresijom odredi jednadžba pravca s pomoću koje je moguće izračunati koncentraciju za bilo koji uzorak na temelju očitane apsorbancije. Upotrebom Benedictova reagensa moguće je odrediti količinu reducirajućih šećera u različitim uzorcima hrane s napomenom da je u tom slučaju potrebno upotrijebiti odgovarajući protokol za izolaciju šećera iz kompleksne matrice (uzorka). Ova metoda upotrebljava se za određivanje glukoze u urinu u bolesnika s dijabetesom.

Kolorimetrijski su testovi vrlo robusni i mogu biti iznimno precizni, ali imaju nekoliko velikih nedostataka. Prvi je nedostatak ograničeni koncentracijski raspon u kojem se povećava odgovor u promjeni boje u odnosu na koncentraciju

glukoze. Drugi je nedostatak mogućnost očitavanja krivih vrijednosti absorpcije jer se test temelji se na jednoj valnoj dužini svjetla zbog raspršenja svjetla uzrokovanog nečistim posuđem ili uzorkom te u slučaju da je uzorak u kojem se određuje glukoza obojan. Metoda detektira sve reducirajuće šećere te nije selektivna isključivo za glukozu.

III. Spektroskopija (uz vježbe 2. – 7.)

Pri interakciji elektromagnetskog zračenja i materije dolazi do apsorpcije zračenja. Ovisno o valnoj duljini primijenjenog zračenja, možemo imati **elektronske (UV-VIS), vibracijske (IR) i rotacijske (MW)** spektre. Kako je **energija** zračenja **obrnuto proporcionalna valnoj duljini**, zračenje manje valne duljine imat će veću energiju i obrnuto. Kvantno-mehanička proporcionalnost dana je izrazom:

$$E = hv = h(c/\lambda) \rightarrow \lambda = hc / \Delta E$$

gdje je:

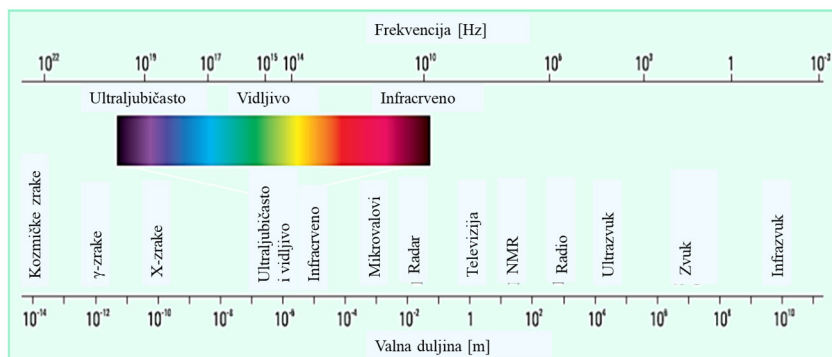
λ = valna duljina (nm)

h = Planckova konstanta ($6,626 \cdot 10^{-34}$ Js)

c = brzina svjetlosti ($3 \cdot 10^8$ m/s)

ΔE = razlika u energiji (J)

v = frekvencija (s^{-1}).



Slika 18. Spektar elektromagnetskog zračenja [6].

ELEKTRONSKA SPEKTROSKOPIJA (UV-VIS)

Apsorpcijska spektroskopija ultraljubičastog (*engl.* ultraviolet, skraćeno UV) (200 – 380 nm) i vidljivog (*engl.* visible, skraćeno VIS) (380 – 780 nm) zračenja jest **mjerjenje autenacije (slabljenja) upadne zrake zračenja nakon njezina prolaska kroz uzorak ili poslije refleksije na površini uzorka**. Apsorpcija se može mjeriti na jednoj valnoj duljini ili više valnih duljina, ovisno o primjeni metode. Dio molekule koja je apsorbirala UV/Vis zračenje naziva se **kromofor**.

Lambert-Beerov zakon

Pri prolasku zrake svjetlosti kroz uzorak dolazi do smanjenja intenziteta upadne zrake I_0 . Zračenje koje preostaje nakon prolaska zrake svjetlosti kroz uzorak naziva se transmitirano zračenje i ima manji intenzitet nego I_0 . **Apsorpcija** zračenja dana je izrazom:

$$A = \log(I/I_0) = \epsilon c l$$

pri čemu je:

A = apsorbancija

l = intenzitet transmitiranog zračenja

I_0 = intenzitet upadnog zračenja

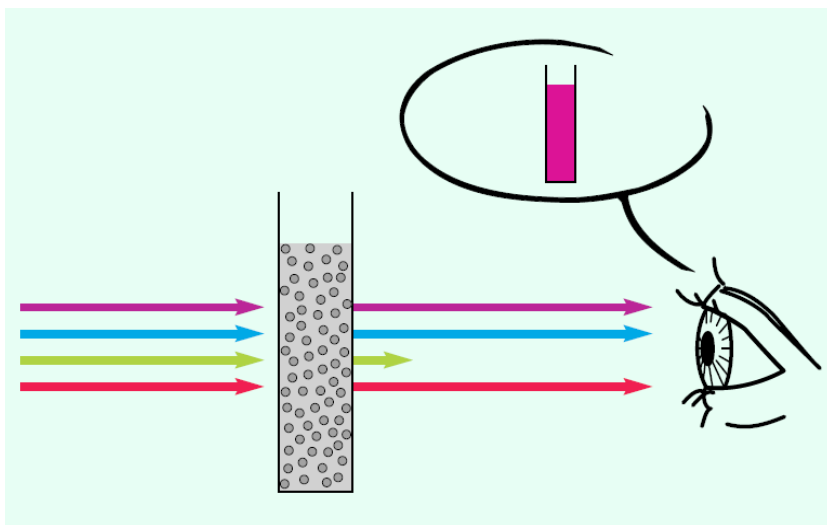
c = koncentracija uzorka (mol/l)

l = duljina optičkog puta (cm)

ϵ = molarni apsorpcijski koeficijent (l/mol acm).

Transmitancija je dana izrazom: $T = I/I_0$.

Budući da je apsorbancija zračenja proporcionalna koncentraciji, povećanje koncentracije dovest će do povećanja apsorbancije u spektru. Ovo svojstvo upotrebljava se za određivanje nepoznate koncentracije uzorka kojem je prethodno snimljen baždarni dijagram za različite koncentracije na istoj valnoj dužini (maksimumu absorbancije).

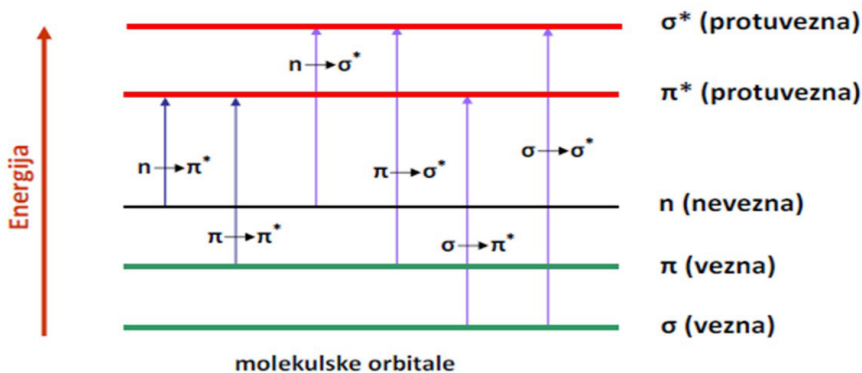


Slika 19. Prikaz smanjenja intenziteta upadne zrake nakon prolaska kroz uzorak [10]

Elektronski prijelazi

U pravilu, energetski favorizirani pomak elektrona ide od najviše popunjene molekulske orbitale HOMO (*engl.* highest occupied molecular orbital) prema najnižoj nepopunjenoj molekulskej orbitali LUMO (*engl.* lowest unoccupied molecular orbital), a nastala vrsta naziva se pobuđeno stanje. Kad se

uzorak obasja svjetlošću koja ima energiju potrebnu za prijelaz elektrona unutar molekule, apsorbira se dio svjetlosne energije. Spektrometar bilježi valne duljine na kojima dolazi do apsorpcije, čime nastaje grafički prikaz spektra prikazanog kao ovisnost apsorpcije (A) o valnoj duljini (λ). Mogući elektronski prijelazi između molekulskih orbitala prikazani su na slici 20.



Slika 20. Elektronski prijelazi između HOMO i LUMO

$\sigma \rightarrow \sigma^*$

Događa se kad elektron uslijed apsorpcije zračenja prijeđe iz σ vezne molekulske orbitale u σ^* protuveznu molekulsku orbitalu. Za ovakav prelazak elektrona potrebna je velika energija koja za primjer molekule metana, koja ima četiri jednostruke veze ugljik-vodik (četiri σ veze), daje apsorpcijski maksimum na 125 nm.

$n \rightarrow \sigma^*$

Ova vrsta elektronskih prijelaza događa se kad molekula kojoj želimo snimiti UV-VIS spektar ima atom s nepodijeljenim elektronskim parovima (N, S, O, Cl, Br, F). Za ovaj prelazak potrebno je manje energije, ali se apsorpcijski maksimumi nalaze na oko 200 nm. U prisutnosti polarnih otapala kao što su voda i etanol (sadržavaju atom kisika s nepodijeljenim elektronskim parom) dolazi do pomaka apsorpcijskog maksimuma prema manjim valnim duljinama.

$n \rightarrow \pi^*$

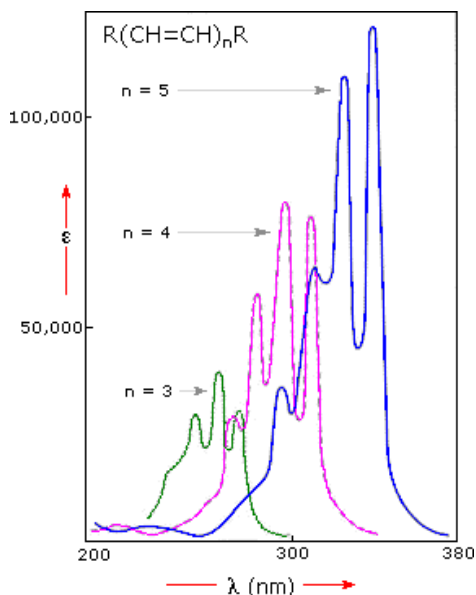
Ova vrsta elektronskih prijelaza karakteristična je za organske spojeve s karbonilnom skupinom (aldehidi, ketoni i esteri). Kako je za ovakav prijelaz elektrona potrebna manja energija, prijelaz se događa u UV i vidljivom dijelu spektra.

$\pi \rightarrow \pi^*$

Najčešći elektronski prijelaz koji daje apsorpcijski maksimum kod organskih molekula te je karakterističan za spojeve s nezasićenim ugljik-ugljik vezama (alkene i alkinne) kao i spojeve s aromatskim sustavima (benzen, naftalen, antracen).

Pomaci u spektru

Povećanjem broja dvostrukih veza u konjugiranom π -elektronskom sustavu dolazi do pomaka apsorpcijskog maksimuma prema većim valnim duljinama. Također, molarni apsorpcijski koeficijent (ϵ) gotovo dvaput raste povećanjem konjugiranih dvostrukih veza u molekuli. Termini koji se pritom upotrebljavaju jesu: **batokromni pomak** – pomak prema većim valnim duljinama, **hipsokromni pomak** – pomak prema manjim valnim duljinama, **hiperkromni pomak** – pomak prema većoj apsorpciji te **hipokromni pomak** – pomak prema manjoj apsorpciji. Dakle, konjugacija općenito rezultira batokromnom i hiperkromnom promjenom apsorpcije. Nadalje, pojava nekoliko apsorpcijskih pikova ili „ramena” za određeni kromofor svojstvena je visokokonjugiranim sustavima, a često ovisi o otapalu.



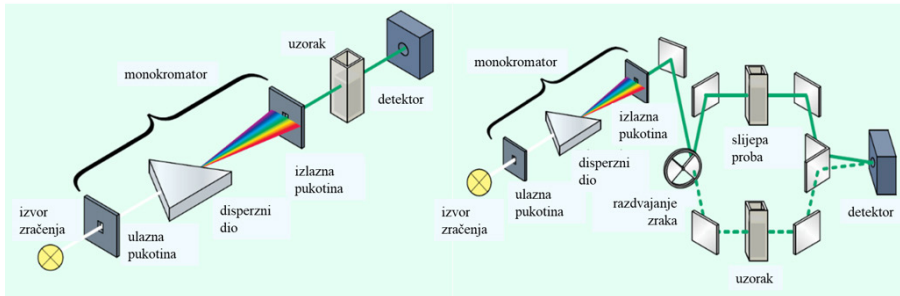
Slika 21. Prikaz utjecaja konjugacije veza na pomake u spektru [11]

Priprema uzoraka

S pomoću UV-VIS metode moguće je snimati tekuće i krute uzorke. Za pripravu tekućih uzoraka važno je odabrati otapalo koje ne apsorbira u području u kojem se želi snimiti spektar. Za snimanje se upotrebljavaju kivete od kvarca (propusnost 200 – 700 nm) te kivete od stakla i plastike (za UV i VIS zračenje). Krute je uzorke moguće izravno snimati u čvrstom stanju pripremanjem KBr pastila ili uzoraka bez posebne pripreme. U biotehnologiji se uglavnom upotrebljavaju tekući uzorci.

Izvedba instrumenta

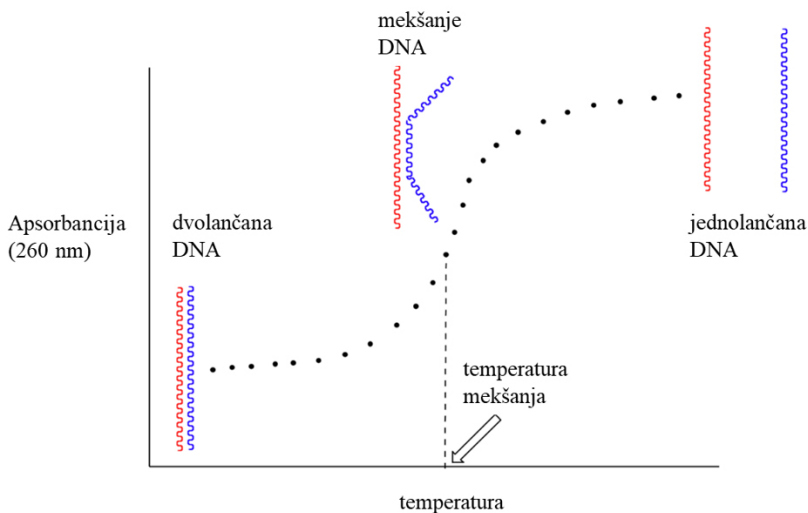
U pravilu postoje dvije izvedbe uređaja: **jednosnopni** i **dvosnopni** UV-VIS spektrofotometar (slika 22). Razlika je u načinu snimanja **slijepe probe** (otapala). Kod jednosnopnog se uređaja slijepe proba snima prije uzorka, dok se kod dvosnopnog uređaja slijepe proba i uzorak snimaju simultano.



Slika 22. Prikaz izvedbe jednosnopnog i dvosnopnog UV-VIS spektrofotometra [10]

Primjena u biotehnologiji

DNA i RNA **nukleobaze** dobri su **kromofori** s **maksimumom apsorbancije na 260 nm** pa se to svojstvo primjenjuje za **određivanje koncentracije DNA** i RNA produkta nastalog PCR metodom potrebnih za daljnje biotehno- loške pokuse. Jednako se svojstvo može primijeniti za određivanje **temperature mekšanja DNA** (slika 23).

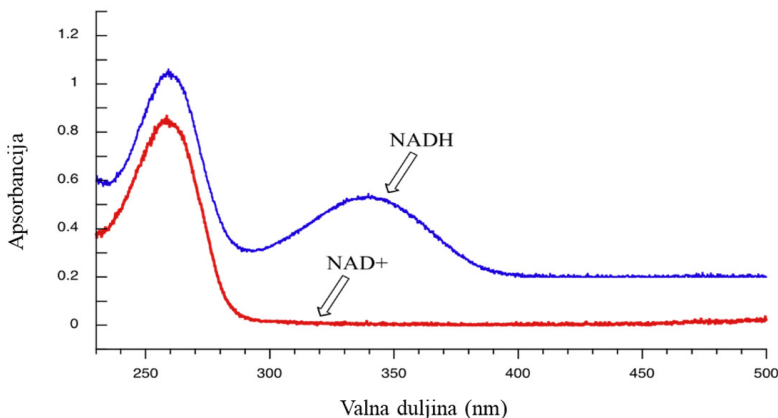


Slika 23. Određivanje temperature mekšanja DNA upotrebom UV-VIS spektrofotometrije [12]

UV-VIS se može upotrebljavati za praćenje **kinetike enzimski katalizirane** reakcije, primjerice tako što se prati nestajanje NAD^+ (ima apsorpcijski

maksimum na 260 nm) i nastajanje NADH koji, uz 260 nm, ima apsorpcijski maksimum i na **340 nm** (slika 24).

Aminokiseline koje su prirodni kromofori u proteinima aromatski su sastavi **fenilalanina** (apsorpcijski maksimum na 250 nm), **tirozina** (apsorpcijski maksimum na 274 nm) i **triptofana** (apsorpcijski maksimum na 280 nm). UV-VIS spektrometrija može se upotrebljavati za **praćenje koncentracije proteina** (obično se prati apsorpcija pri 280 nm) te za studije konformacijskih promjena nastalih uslijed promjena u okolini proteina.



Slika 24. UV-VIS spektr NADH i NAD⁺ [12]

VIBRACIJSKA SPEKTROSKOPIJA (IR)

Vibracijska (**infracrvena**) **spektroskopija** jedna je od najčešće upotrebljavanih metoda za **određivanje funkcionalnih skupina** u uzorku. Različite funkcionalne skupine apsorbiraju na karakterističnim valnim brojevima upotrijebljenog zračenja. Infracrveni dio spektra definiran je kao:

BLISKI IR:

12 500 – 4 000 cm^{-1} – područje preklapanja spektara, upotreba multivarijantnih matematičkih metoda

SREDNJI IR:

4 000 – 1 300 cm^{-1} – **područje funkcionalnih skupina**

1 300 – 650 cm^{-1} – **područje „otiska prsta”**

DALEKI IR:

650 i niže – anorganske krutine i teži atomi.

IR spektroskopija prati **promjenu dipolnog momenta kod polarnih i nepolarnih molekula**. Spektr je definiran **položajem vrpce** u spektru (defini-

rana **jakošću veze** koja vibrira i masi atoma) te **intenzitetom** vrpce u spektru (**veličina promjene dipolnog momenta**). Valni broj definiran je kao:

$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

gdje je:

ν = valni broj (cm^{-1})

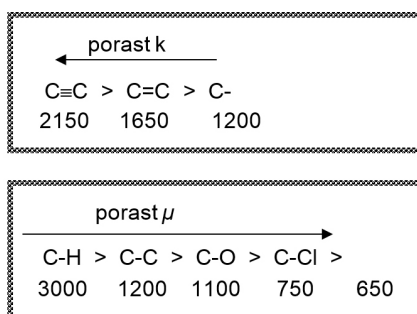
c = brzina svjetlosti ($3 \cdot 10^8$ m/s)

k = konstanta veze

μ = reducirana masa.

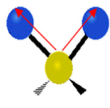
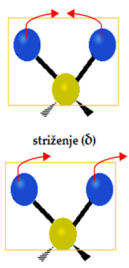
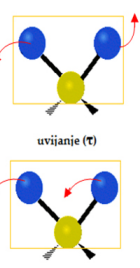
Reducirana masa molekule definirana je kao:

$$\mu = \frac{m_1 + m_2}{m_1 \times m_2}$$



Slika 25. Utjecaj k i μ na pomak vrpce u spektru

Ovisno o prirodi vibracije koja se može odrediti s pomoću simetrije molekule, vibracije mogu biti aktivne ili neaktivne u infracrvenom spektru. Svaki atom neke poliatomne molekule ima tri stupnja slobode,

Vibracije istezanja	Vibracije savijanja ili deformacije	
	U ravnini	Van ravnine
 simetrično (ν_s)	 striženje (δ) zibanje (ρ)	 uvijanje (τ) klačenje (ω)

Slika 26. Glavni vibracijski modovi nelinearne metilenske (CH_2) skupine [13]

što za takvu molekulu znači ukupno $3n$ stupnjeva slobode. Međutim, tri stupnja slobode potrebna su za translaciju cijele molekule u prostoru i još tri za rotaciju, dakle osnovni broj vibracija neke **nelinearne** poliatomne molekule je $3n - 6$, dok za **linearnu** iznosi $3n - 5$ zato što su takvoj molekuli potrebna samo dva stupnja slobode za rotaciju. Ukupni broj opaženih vibracijskih vrpca uglavnom je različit od ukupnog broja osnovnih načina vibriranja zbog toga što su u infracrvenom spektru aktivne samo one vibracije kod kojih dolazi do promjene dipolnog momenta. Dvije najvažnije vrste molekulskih vibracija jesu vibracije istezanja i vibracije savijanja ili deformacije (slika 26).

Funkcionalne skupine

Spektar IR može se kvalitativno interpretirati u vidu funkcionalnih skupina prisutnih u uzorku. Područje od $4\ 000$ do $2\ 500\ \text{cm}^{-1}$ jest područje vibracije jednostrukih veza H-X (X= O, N, C). Područje od $2\ 500$ do $1\ 540\ \text{cm}^{-1}$ jest područje nezasićenih veza, od čega je dio od $2\ 500$ do $2\ 000\ \text{cm}^{-1}$ područje trostrukih, a od $2\ 000$ do $1\ 540\ \text{cm}^{-1}$ dvostrukih veza. Područje od $1\ 300$ do $650\ \text{cm}^{-1}$ jest područje jednostrukih veza te skeletnih vibracija poliatomnih prstena. Područje od 650 do $10\ \text{cm}^{-1}$ jest područje metal-nemetal veza u anorganskim, koordinacijskim i organometalnim spojevima.

O-H, N-H i C-H

Ove funkcionalne skupine razlikuju se prema obliku i finoj strukturi apsorpcijskog spektra.

O-H skupina prisutna je u spektru u području od $3\ 650$ do $3\ 200\ \text{cm}^{-1}$ te predstavlja oblu vrpcu bez dodatnih cijepanja.

N-H skupina prisutna je u spektru u području od $3\ 600$ do $3\ 300\ \text{cm}^{-1}$ te predstavlja vrpcu s dodatnim cijepanjima u spektru.

Karbonilna skupina C=O

Karboksilne kiseline $1\ 700\ \text{cm}^{-1}$ (uz istezanje veze O–H od $3\ 400$ do $2\ 400\ \text{cm}^{-1}$ i istezanje veze C–O pri $1\ 240\ \text{cm}^{-1}$)

Amidi

- a) primarni $1\ 680 - 1\ 660\ \text{cm}^{-1}$ (uz antisimetrično istezanje veze N–H od $3\ 360$ do $3\ 340\ \text{cm}^{-1}$ i simetrično istezanje veze N–H od $3\ 190$ do $3\ 170\ \text{cm}^{-1}$)
- b) sekundarni $1\ 680 - 1\ 640\ \text{cm}^{-1}$ (uz istezanje veze N–H od $3\ 300$ do $3\ 250\ \text{cm}^{-1}$)

Alifatski aldehidi → $1\ 740 - 1\ 720\ \text{cm}^{-1}$

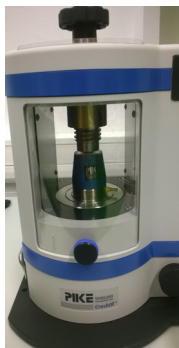
Alifatski ketoni → $1\ 730 - 1\ 700\ \text{cm}^{-1}$

Anhidridi → $1\ 840 - 1\ 800\ \text{cm}^{-1}$, $1\ 780 - 1\ 740\ \text{cm}^{-1}$

Priprava uzoraka

Ovom metodom mogu se snimati uzorci u plinovitom, tekućem i krutom stanju, no otapala poput vode i alkohola jako apsorbiraju infracrveno zračenje pa je pri snimanju krutih uzoraka poželjno da budu dobro osušeni. Kruti uzorci najčešće se priređuju u obliku KBr-pastila ili kao suspenzija u parafinskom ulju. Tekući nepolarni uzorci snimaju se tako da se kap uzorka nanese između pločica NaCl. Plinoviti uzorci snimaju se s pomoću ćelija koje ne absorbiraju u IR dijelu spektra.

Kruti uzorci



- NaCl do 400 cm^{-1}
- KBr do 600 cm^{-1}
- CsI do 200 cm^{-1}
- AgBr do 300 cm^{-1}
- moguća ionska izmjena i transformacija polimorfa

Tekući uzorci



- nanošenje uzorka na pločicu NaCl, najčešće nepolarni uzorci, moguća upotreba ugljikova disulfida i kloroforma kao otapala
- kvarcna kiveta

Plinoviti uzorci



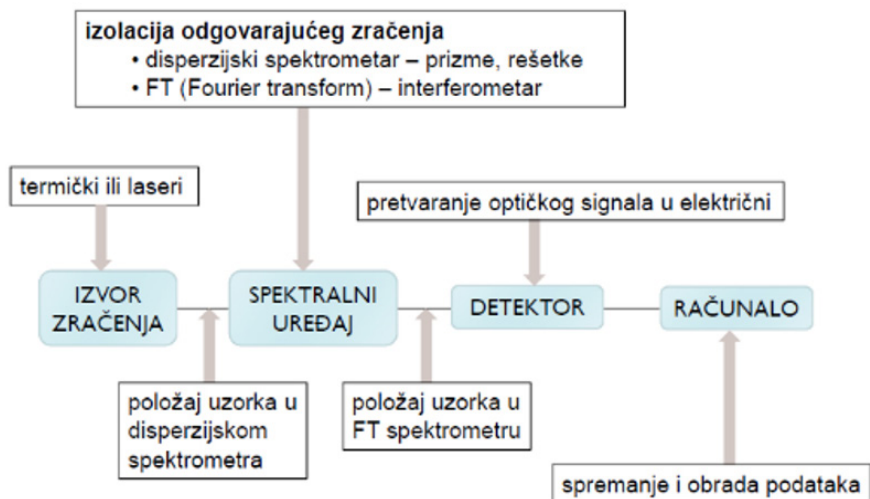
- korištenje ćelija koje su propusne za IR

Slika 27. Prikaz priprave krutih, tekućih i plinovitih uzorka za IR analizu

Izvedba instrumenta

Danas postoje dvije glavne vrste uređaja za snimanje vibracijskih spektara, a to su obični i FT (Fourier transform) spektrometar. Razlika je u tome što FT-IR uređaj snima podatke u vremenskoj domeni i onda ih prebacuje u fre-

kvencijsku domenu, a obični prikuplja podatke samo u frekvencijskoj domeni. U skladu s time postoje i neke razlike u izvedbi instrumenta (slika 28).



Slika 28. Prikaz izvedbe FT-IR i IR uređaja

ATR (*engl.* Attenuated Total Reflectance) – prigušena totalna refleksija metoda je mjerenja bez razaranja (pripreme) uzorka te daje IR spektar gornje površine tvari. Mogu se snimati uzorci koji su ili predebeli ili prejako apsorbiraju kod standardnog postupka snimanja. ATR spektri imaju vrpce pri većim valnim duljinama (manji valni brojevi) intenzivnije od onih pri manjim valnim duljinama (veći valni brojevi).



Slika 29. Prikaz FT-IR uređaja i nastavka za ATR

Primjena u biotehnologiji

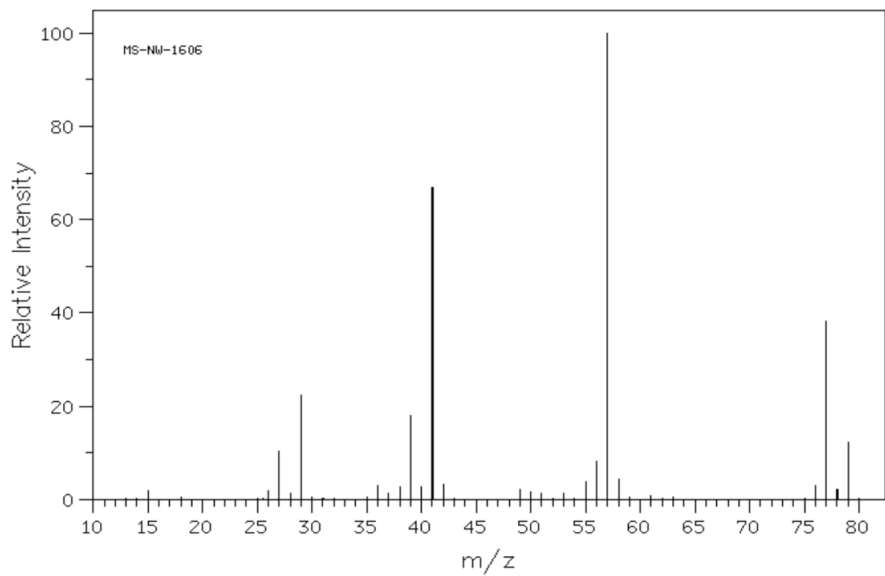
U današnje se vrijeme nova tehnologija FT-IR mikroskopije sve više upotrebljava u području molekularne biologije. IR ima veliku primjenu u kemiji materijala i farmaceutskoj industriji za brzo i učinkovito kontroliranje uzoraka u odnosu na prisutnost/odsutnost funkcionalnih skupina.

PRILOG: Spektri [14] [15]

a) Sinteza *tert*-butil-klorida (3. vježba):

MS *tert*-butil-klorida

MS-NW-1606 SDBS NO. 1233
2-chloro-2-methylpropane
C4H9CL (Mass of molecular ion: 92)



Source Temperature: 240 °C
Sample Temperature: 180 °C
RESERVOIR, 75 eV

b) Sinteza *p*-nitrozofenola (4. vježba):

^1H NMR *p*-nitrozofenola

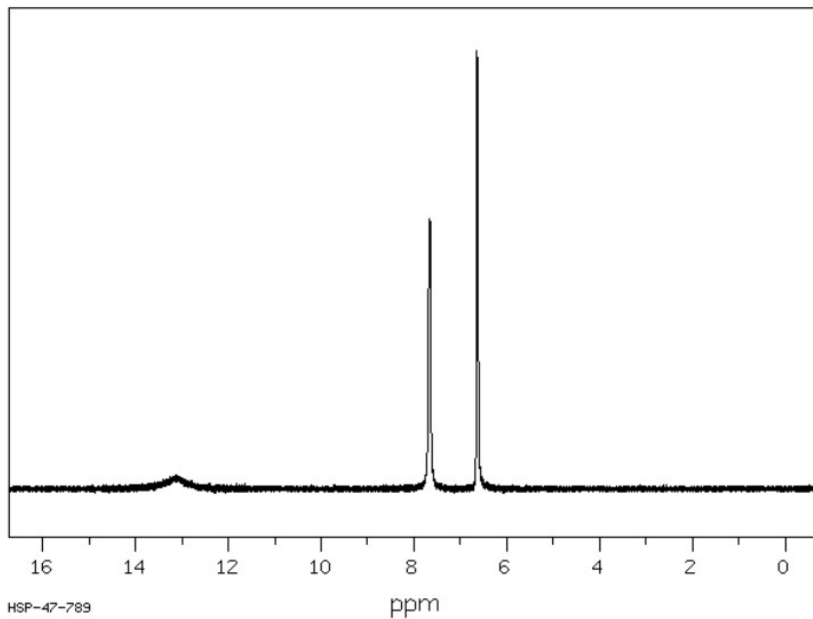
SDBS- ^1H NMR SDBS No. 10039HSP-47-789

399.65 MHz

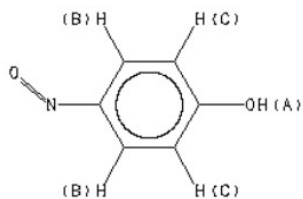
$\text{C}_6\text{H}_5\text{N O}_2$

0.037 g : 0.5 ml DMSO- d_6

***p*-nitrosophenol**



HSP-47-789



Assign.	Shift (ppm)
A	13.
B	7.66
C	6.631

¹³C NMR *p*-nitrozofenola

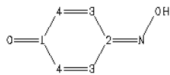
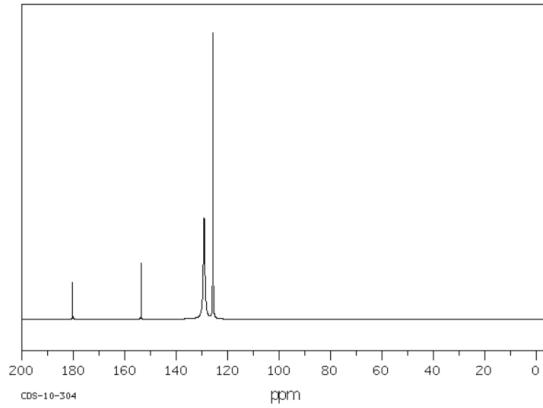
SDBS-¹³C NMR SDBS No. 10039CDS-10-304

C₆H₅N O₂

p-nitrosophenol

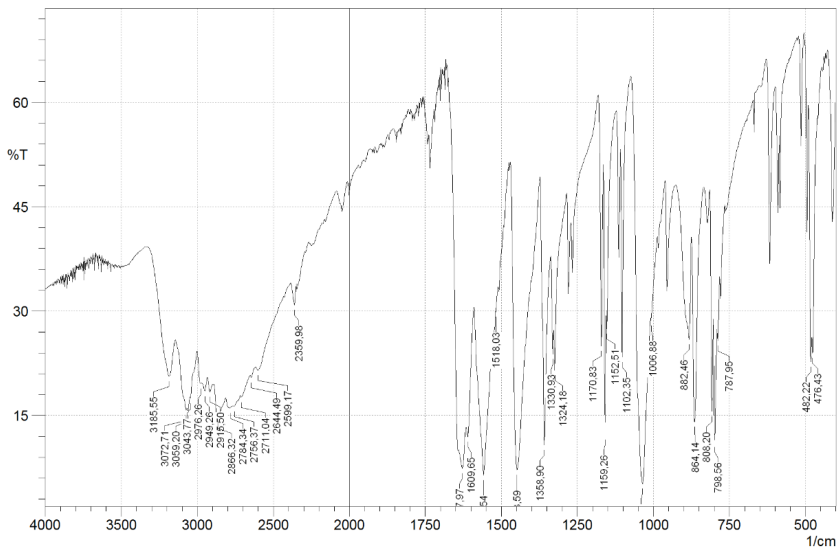
22.53 MHz

saturated in DMSO-d₆



ppm	Int.	Assign.
180.28	129	1
153.65	197	2
129.15	355	3
125.71	1000	4

IR *p*-nitrozofenola



c) Sinteza acetilsalicilne kiseline (5. vježba):

^1H NMR acetilsalicilne kiseline

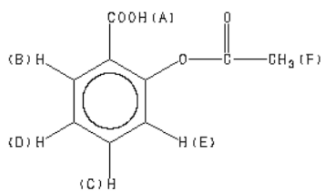
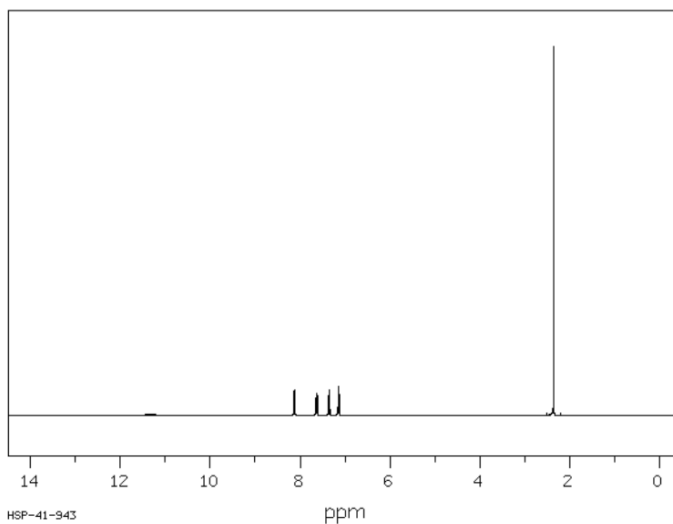
SDBS- ^1H NMRSDBS No. 532HSP-41-943

399.65 MHz

$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$

0.039 g : 0.5 ml CDCl_3

o-acetoxybenzoic acid



Assign. Shift (ppm)

A	11.
B	8.125
C	7.624
D	7.356
E	7.142
F	2.352

^{13}C NMR acetilsalicilne kiseline

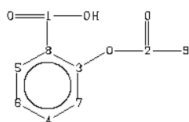
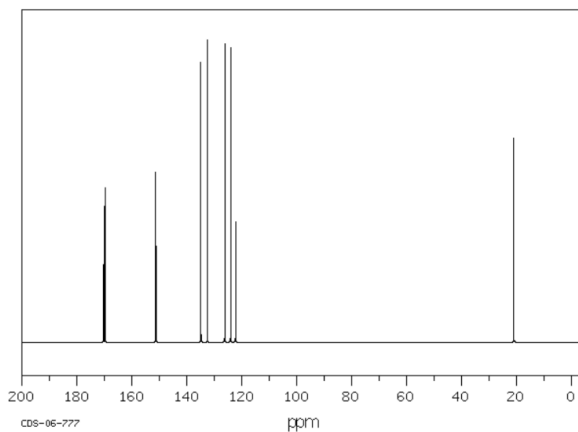
SDBS- ^{13}C NMR SDBS No. 532CDS-06-777

$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$

o-acetoxybenzoic acid

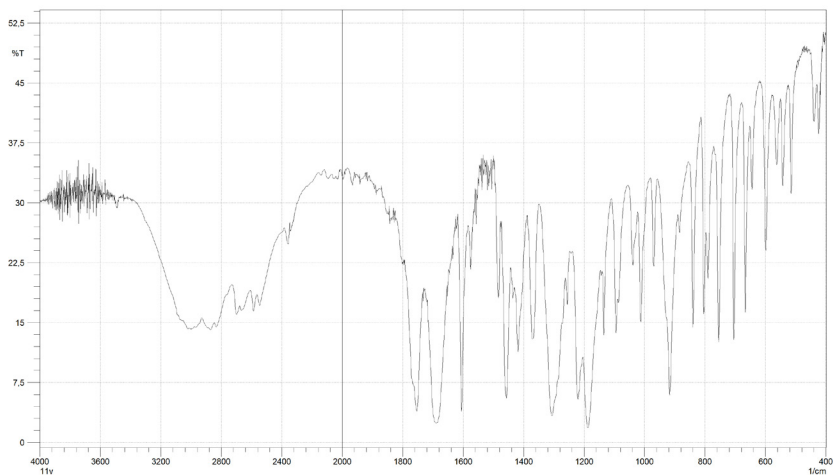
50.18 MHz

0.039 g : 0.5 ml CDCl_3

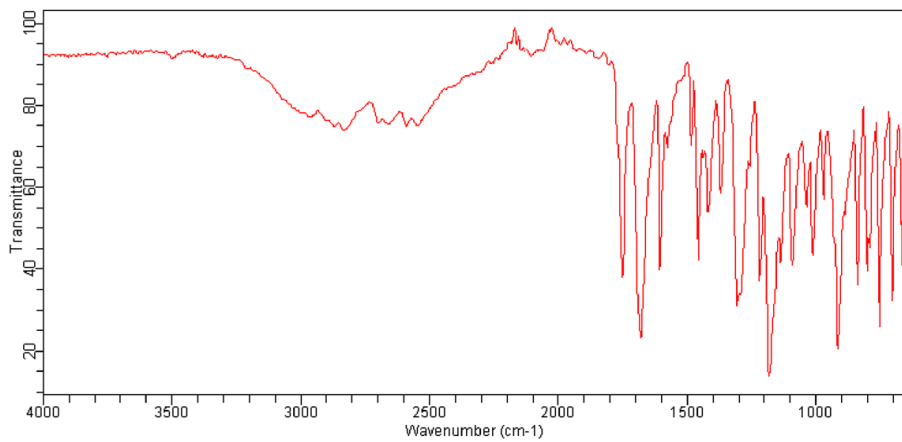


ppm	Int.	Assign.
170.20	450	1
169.76	510	2
151.28	560	3
134.90	924	4
132.51	1000	5
126.17	986	6
124.01	974	7
122.26	397	8
20.99	674	9

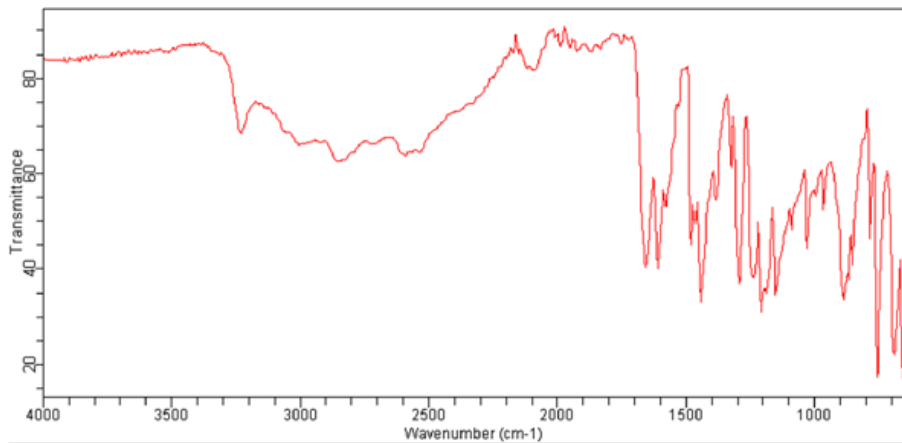
IR acetilsalicilne kiseline (andol)



ATR acetilsalicilne kiseline

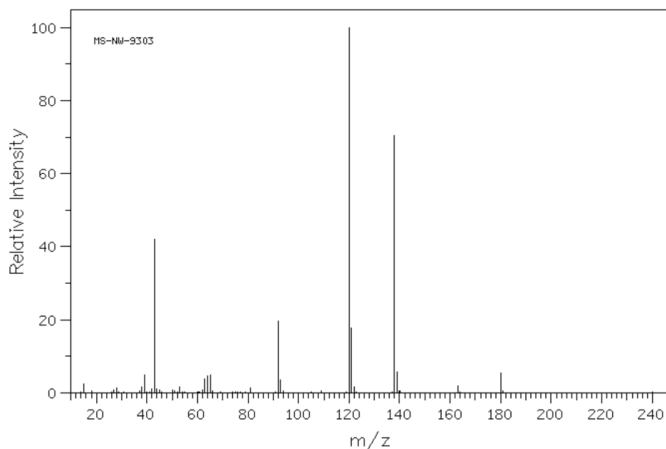


ATR salicilne kiseline



MS acetilsalicilne kiseline

MS-NW-9303 SDBS NO. 532
o-acetoxybenzoic acid
C₉H₈O₄ (Mass of molecular ion: 180)



Source Temperature: 170 °C
Sample Temperature: 100 °C
DIRECT, 75 eV

d) Sinteza benzojeve kiseline i benzil-alkohola (6. vježba)

¹H NMR benzojeve kiseline

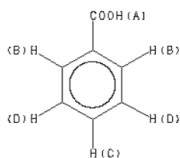
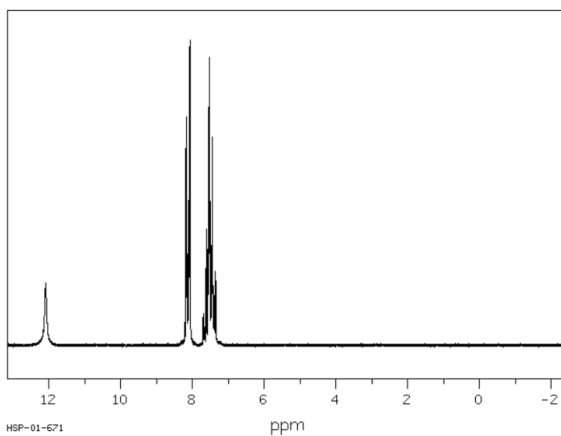
SDBS-¹H NMR SDBS No. 673HSP-01-671

89.56 MHz

C₇H₆O₂

0.040 g : 0.5 ml CDCl₃

benzoic acid



Assign.	Shift (ppm)
A	12.09
B	8.12
C	7.62
D	7.45

¹³C NMR benzojeve kiseline

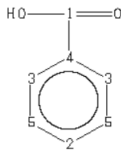
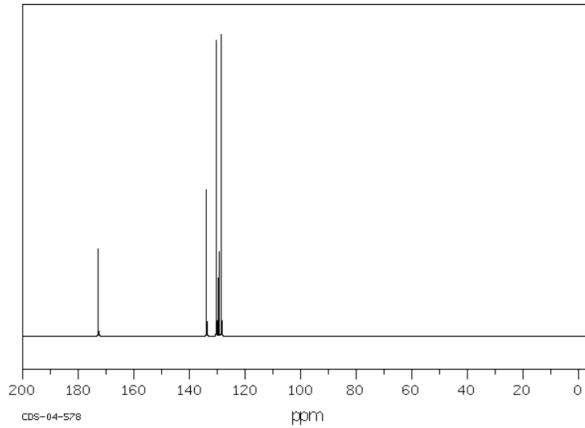
SDBS-¹³C NMR SDBS No. 673CDS-04-578

C₇H₆O₂

benzoic acid

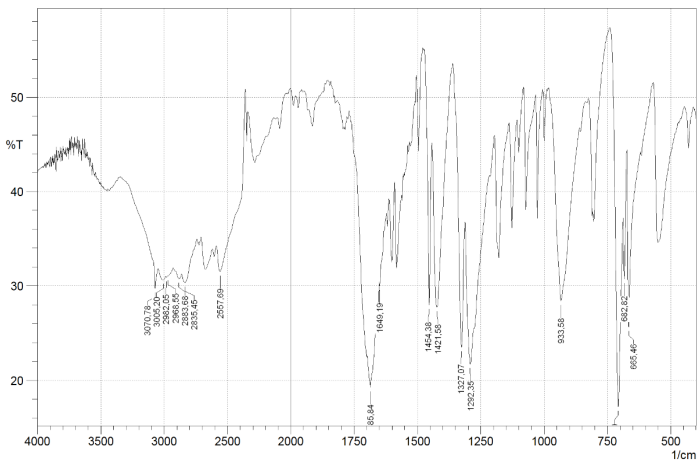
25.16 MHz

saturated in CDCl₃

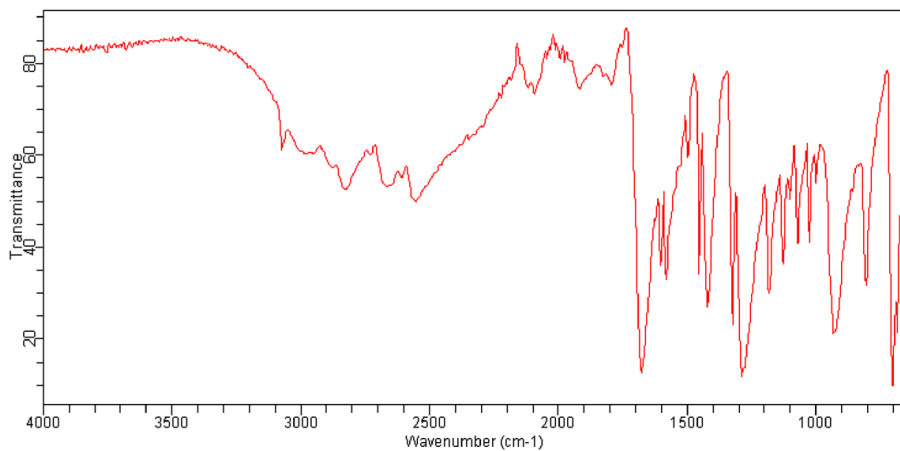


ppm	Int.	Assign.
172.77	287	1
133.83	485	2
130.28	980	3
129.44	277	4
128.49	1000	5

IR benzojeve kiseline

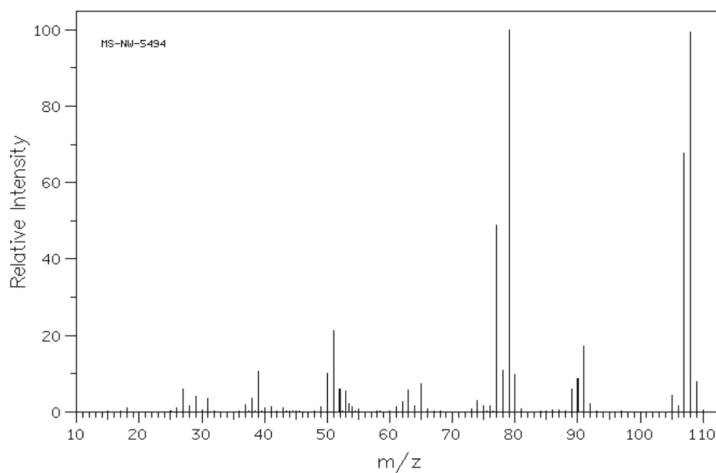


ATR benzojeve kiseline



MS benzil-alkohola

MS-NW-5494 SDBS NO. 685
benzil alkohol
C7H8O (Mass of molecular ion: 108)

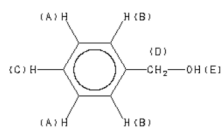
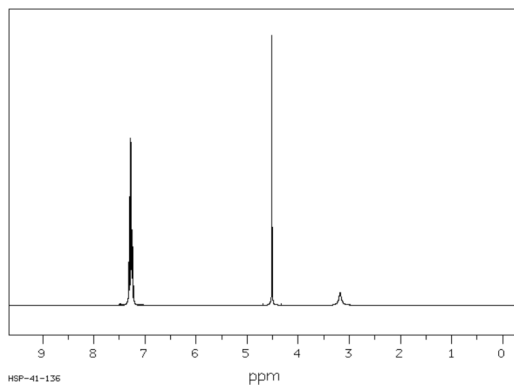


Source Temperature: 260 °C
Sample Temperature: 180 °C
RESERVOIR, 75 eV

¹H NMR benzil-alkohola

SDBS-¹H NMRSDBS No. 685HSP-41-136
C₇H₈O
benzyl alcohol

399.65 MHz
0.05 ml : 0.5 ml CDCl₃

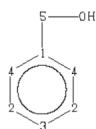
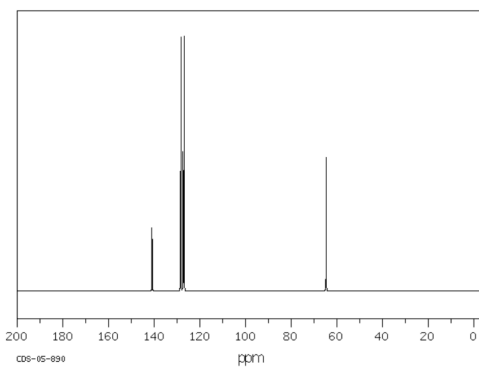


Assign.	Shift (ppm)
A	7.29
B	7.26
C	7.23
D	4.514
E	3.18

¹³C NMR benzil-alkohola

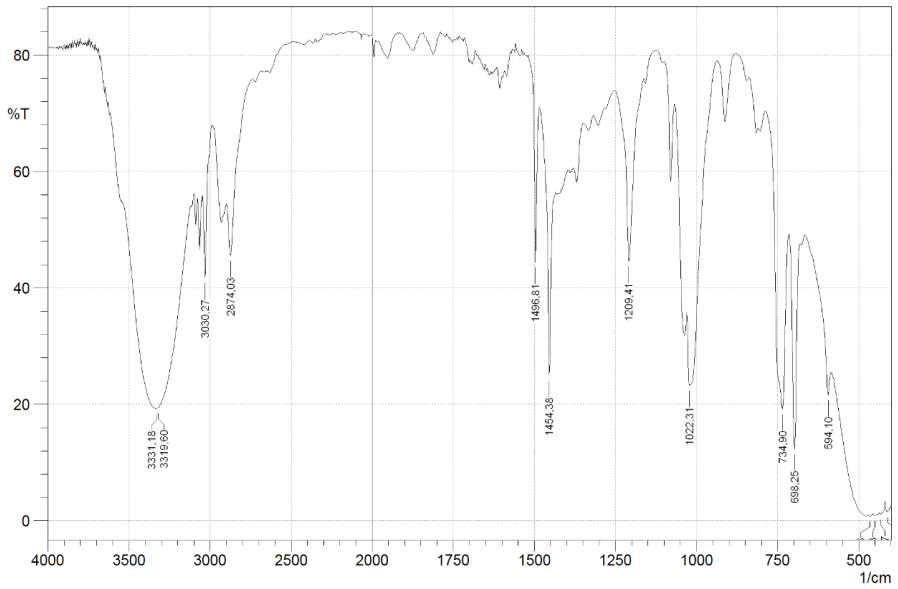
SDBS-¹³C NMRSDBS No. 685CDS-05-890
C₇H₈O
benzyl alcohol

15.09 MHz
0.25 ml : 1.5 ml CDCl₃

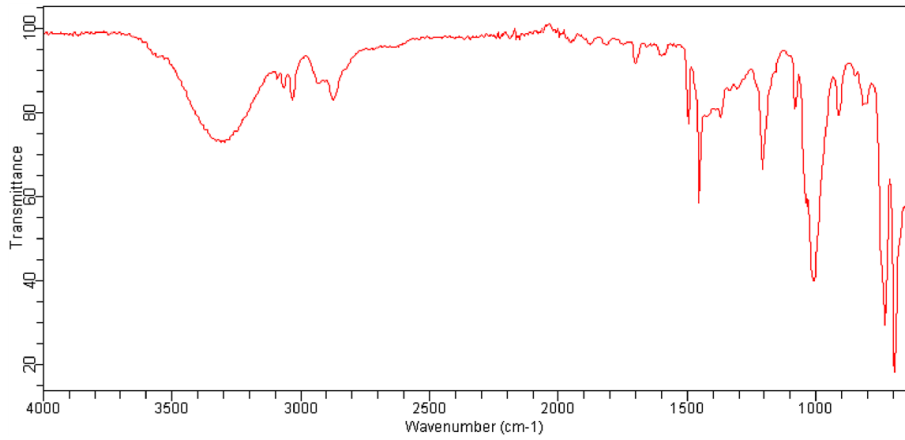


ppm	Int.	Assign.
140.91	248	1
128.38	1000	2
127.39	540	3
126.95	1000	4
64.70	525	5

IR benzil-alkohola



ATR benzil-alkohola



e) Spektri benzaldehida (6. i 7. vježba)

^1H NMR benzaldehida

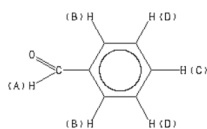
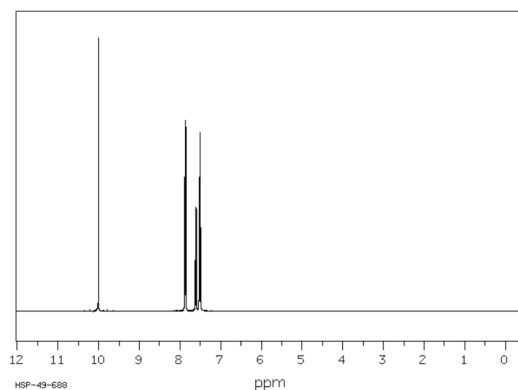
SDBS- ^1H NMRSDBS No. 672HSP-49-688

399.65 MHz

$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}$

0.05 ml : 0.5 ml CDCl_3

benzaldehyde



Assign. Shift (ppm)

A	10.002
B	7.868
C	7.608
D	7.511

^{13}C NMR benzaldehida

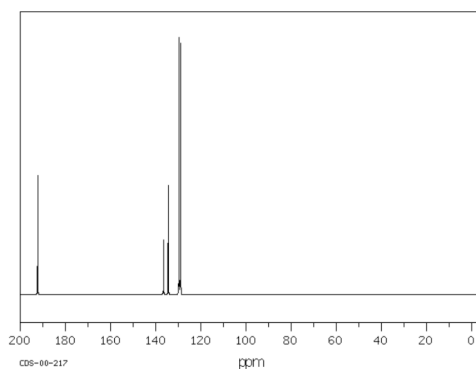
SDBS- ^{13}C NMRSDBS No. 672CDS-00-217

15.09 MHz

$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}$

0.25 ml : 0.75 ml CDCl_3

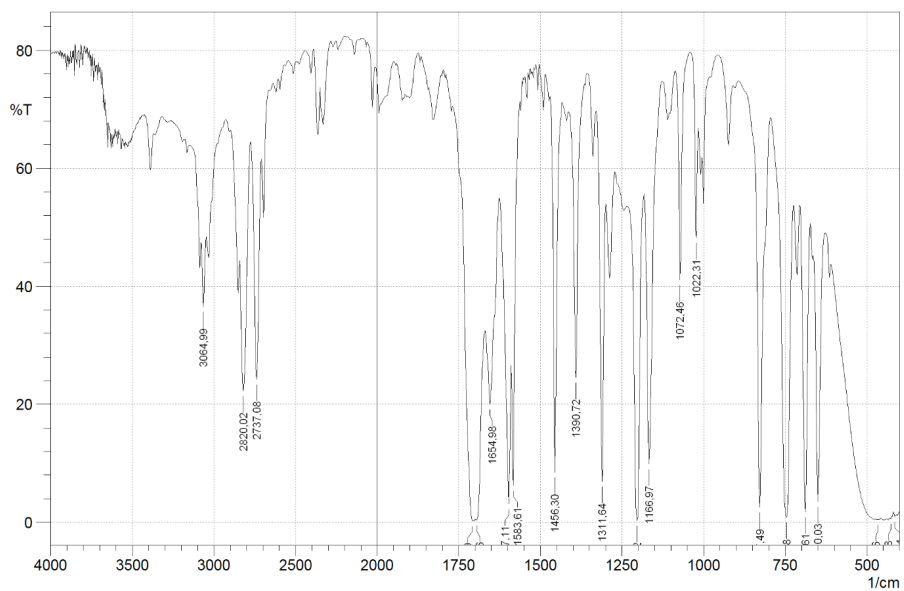
benzaldehyde



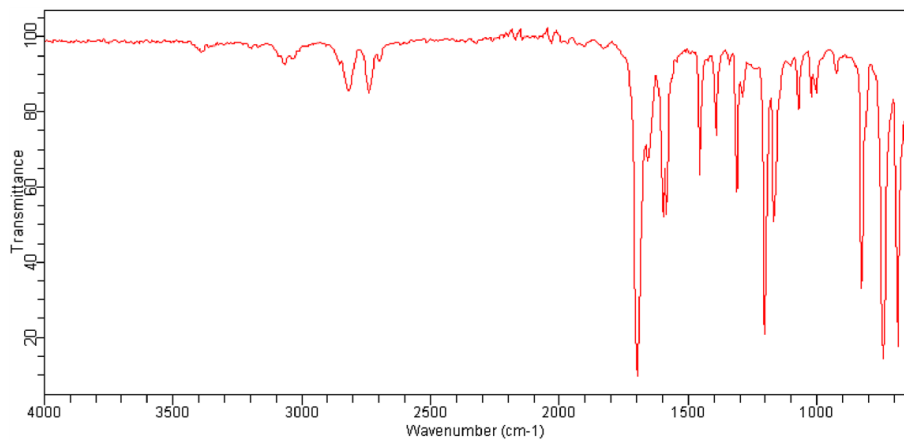
ppm Int. Assign.

192.28	463	5
136.47	211	4
134.43	423	3
129.68	1000	2
128.98	976	1

IR benzaldehida

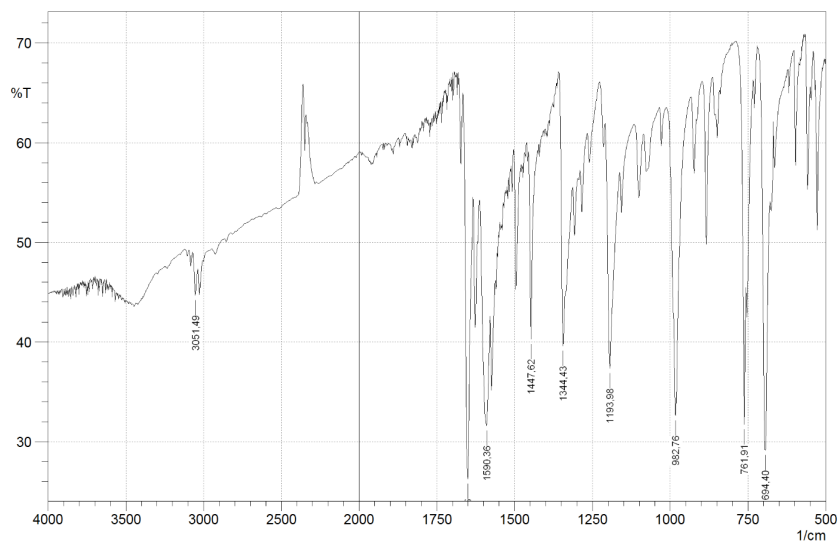


ATR benzaldehida



f) Sinteza dibenzilidenacetona (7. vježba)

IR dibenzilidenacetona



¹H NMR dibenzilidenacetona

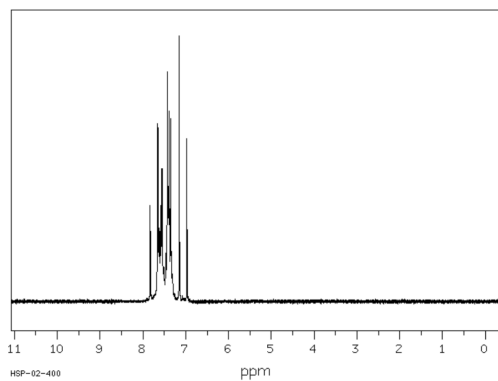
SDBS-¹H NMRSDBS No. 4393HSP-02-400

89.56 MHz

C₁₇H₁₄O

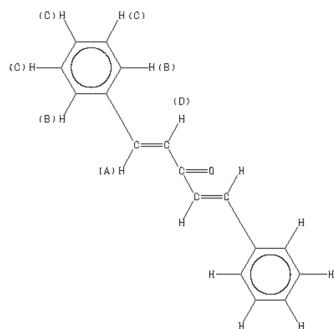
0.045 g ; 0.5 ml CDCl₃

1,5-diphenyl-1,4-pentadien-3-one



HSP-02-400

ppm



$$J_{A,D} = 17 \text{ Hz}$$

¹³C NMR dibenzilidenacetona

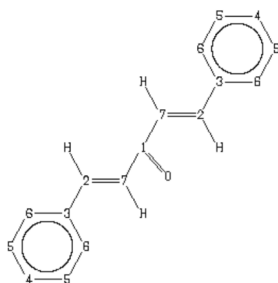
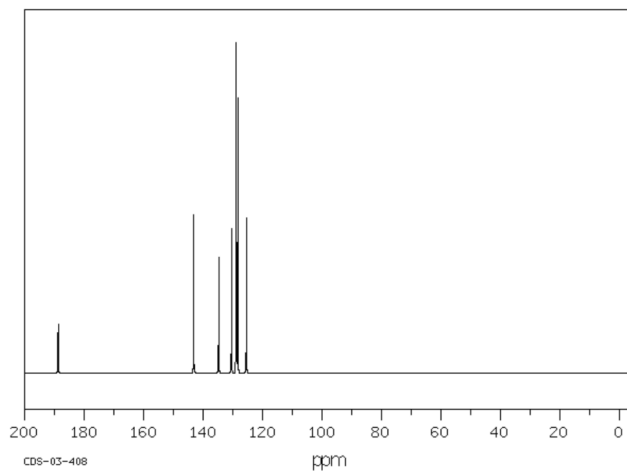
SDBS-¹³C NMRSDBS No. 4393CDS-03-408

C₁₇H₁₄O

1,5-diphenyl-1,4-pentadien-3-one

15.09 MHz

0.25 g : 1 ml CDCl₃



ppm	Int.	Assign.
188.77	148	1
143.19	478	2
134.79	349	3
130.44	435	4
128.92	1000	5
128.38	833	6

Literatura:

- 1) V. Rapić, *Postupci priprave i izolacije organskih spojeva*, Školska knjiga, Zagreb, 1994.
- 2) O. Kronja, S. Borčić, *Praktikum preparativne organske kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 2004.
- 3) Quia AP Chapter 10: *Photosynthesis*, slika preuzeta sa stranice <http://www.quia.com/jg/1251608list.html> (stranica posjećena 30.09.2013).
- 4) J. Steer, *Structure and Reactions of Chlorophyll*, slika preuzeta sa stranice: <http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/steer/chloro.htm> (stranica posjećena 30.09.2013).
- 5) I. Jerković, A. Radonić, *Praktikum iz organske kemije*, Sveučilište u Splitu, Split, 2009.
- 6) B. S. Furniss, A. J. Hannaford, P. W. G. Smith, A. R. Tatchell, *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th Ed., Longman Group, London, 1989.
- 7) S. H. Pine, *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, 1994.
- 8) T. W. Solomons, C. B. Fryhle, *Organic chemistry*, 9th Ed., John Wiley and Sons, New York, 2007.
- 9) J. March, *Advanced Organic Chemistry*, 5th Ed., John Wiley and Sons, New York, 2001.
- 10) T. Owen, *Fundamentals of UV-visible spectroscopy, A Primer*, Hewlett Packard Company, Germany, 1996.
- 11) W. Reusch, *Visible and Ultraviolet Spectroscopy*, slika preuzeta sa stranice: <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/UV-Vis/spectrum.htm> (stranica posjećena 30.09.2015).
- 12) T. Soderberg, *Organic Chemistry With a Biological Emphasis*, slika preuzeta sa stranice: http://chemwiki.ucdavis.edu/Organic_Chemistry/Organic_Chemistry_With_a_Biological_Emphasis/Chapter_04%3A_Structure_Determination_I/Section_4.3%3A_Ultraviolet_and_visible_spectroscopy (stranica posjećena 30.09.2015).
- 13) A. Filošević, *Sinteza i karakterizacija Co(II), Ni(II), Cu(II) i Zn(II) s pirazin-2-karboksamidom i pirazin-2, 3-dikarboksamidom*, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, 2012.
- 14) ^1H i ^{13}C NMR spektri te maseni spektri (MS) preuzeti su sa stranice: Spectral Database for Organic Compounds SDBSWeb: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Japan, stranica posjećena 30.09.2013).

- 15) ATR spektri snimljeni su na Odjelu za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci upotrebom Agilent Cary 630 FTIR spektrofotometra. IR spektri snimljeni su na Odjelu za kemiju u Osijeku s pomoću spektrofotometra SHIMADZU IR solution 1.30 FTIR- 8400 S u valnom području od 40 do 4000 cm^{-1} , uz razlučenje od 4 cm^{-1} tehnikom KBr pastile. Za prikupljanje i obradu podataka upotrebljavao se program IR solution (Shimadzu IRsolution 1.30 Copyright © 2005 Shimadzu Corporation).

ISBN 978-953-7720-32-2