

[ÚSTAV LÉKAŘSKÉ BIOCHEMIE 1. LF UK]

Organika I

Praktické cvičení z lékařské biochemie
Některé reakce organické chemie

Ing. Libuše Arnoštová, CSc.

2009

Obsah

1. Teoretický úvod do problematiky praktického cvičení... 3
2. Úloha 1 – Redukce Fehlingova roztoku..... 7
3. Úloha 2 – Redukce Tollensova činidla 7
4. Úloha 3 – Detekce acetonu Lestradetovou zkouškou 8
5. Úloha 4 – Tvorba šťavelanu vápenatého 8
6. Úloha 5 - Deacetylace kyseliny acetylsalicylové 8
7. Úloha 6 - Reakce volné –OH skupiny s Uffelmannovým činidlem 9
8. Úloha 7 – Sodná sůl kyseliny salicylové 10
9. Úloha 8 - Acetylace kyseliny salicylové. 10

Některé reakce organické chemie

Úvod

Organická chemie tvoří základ pro studium biochemie i dalších příbuzných oborů. Pochopení principů organických reakcí vede přímo k pochopení principů biologických pochodů, neboť se jedná o identické procesy, pouze za odlišných podmínek.

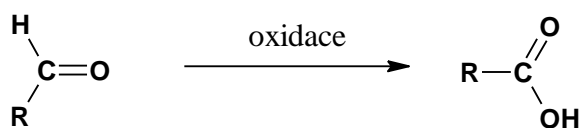
V našem praktiku se soustředíme pouze na některé nejdůležitější funkční skupiny a jejich charakteristické reakce. V první části praktika se zaměříme redox reakce aldehydové skupiny s Fehlingovým a Tollensovým činidlem a barevné reakce ketoskupiny s Lestradetovým činidlem. Dále provedeme jednoduchou acidobazickou reakci vedoucí k nerozpustné soli kyseliny šťavelové.

Ve druhé části se pokusíme o realizaci dvou typů reakcí, které jsou pro biochemii rovněž velmi důležité. Je to esterifikace a hydrolýza esterů. Pro tento účel jsme jako výchozí látku vybrali dobře známé léčivo, kyselinu acetylsalicylovou, v naší republice vyráběnou a prodávanou pod názvem Acylpyrin (výrobce Herbacos-Bofarma, Pardubice). Tu budeme v prvním kroku deacetylovat a následující reakcí esterifikovat zpět na výchozí látku. Důkaz provedeme další barevnou chemickou reakcí, která spočívá ve vytvoření barevného komplexu chloridu železitého se sloučeninami obsahujícími hydroxyskupinu.

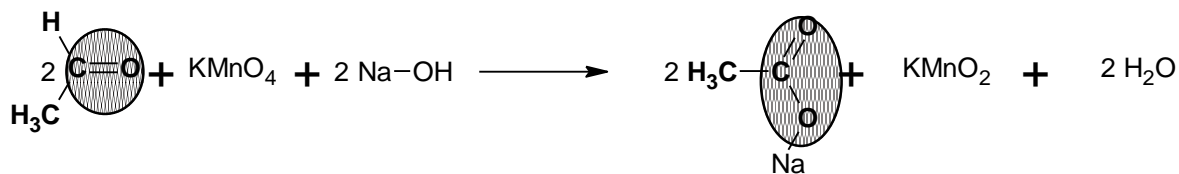
Teoretická část

Oxidace

Aldehydy se snadno oxidují a produktem takové reakce je karboxylová kyselina



S tímto zápisem se obvykle nespokojíme. Vystihuje sice dobře změnu, která se udála na organické molekule, nemáme však kompletní redox pár. Lepším vyjádřením oxidace aldehydů tedy bude rovnice např.:

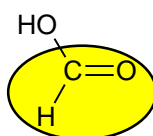


kteřá obsahuje celý redoxní pár a stechiometrické koeficienty. V této reakci se acetaldehyd oxiduje na kyselinu octovou a manganistan draselný se redukuje na manganan draselný. Reakce probíhá v zásaditém prostředí, takže tu máme ještě acidobazickou reakci, kdy kyselina octová reaguje s hydroxidem sodným na sodnou sůl kyseliny octové a vodu.

Při reakci **Fehlingova a Tollensova činidla** je situace obdobná.

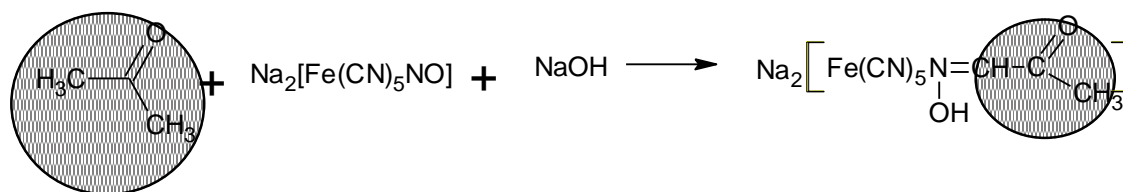
Fehlingovo činidlo se připravuje reakcí síranu měďnatého s vlnanem draselno-sodným. Vlastním činidlem je tedy vlna měďnatý, ten v alkalickém roztoku reaguje s aldehydem za vzniku příslušné kyseliny, oxidu měďného a vlnu sodného. Aldehyd se tedy oxiduje na příslušnou kyselinu a druhý člen redox páru, tedy měďnatý kation se redukuje na kation měďný. Pokud přidáte příliš mnoho louhu, měď se nakonec redukuje až na oxidační stav 0 a vznikne tzv. zrcátko, což není nic jiného než elementární měď.

Tollensovo činidlo, dusičnan diamminstříbrný, rovněž oxiduje aldehydickou skupinu a vedlejšími produkty je stříbro, dusičnan amonný a amoniak. Kromě aldehydů poskytuje i reakci s kyselinou mravenčí. Proč tomu tak je, poznáme, pokud si nakreslíme odpovídající vzorec

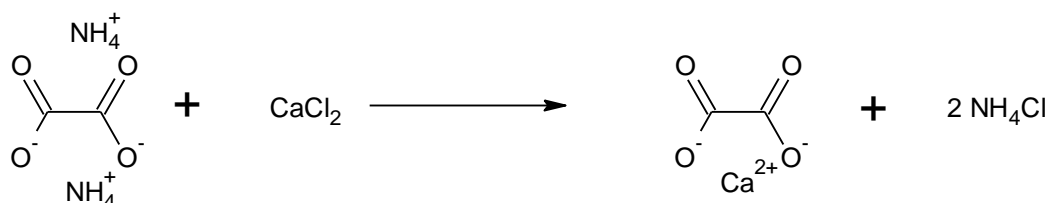


Kyselina mravenčí je oxidována na oxid uhličitý, jednomocné stříbro se redukuje na stříbro elementární.

Při **reakci ketoskupiny s nitroprussidem sodným** (Lestradetova zkouška), $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ dochází k tvorbě fialového komplexu. Na této reakci je založena detekce ketolátek (acetonu) v moči, reakce vypadá takto:



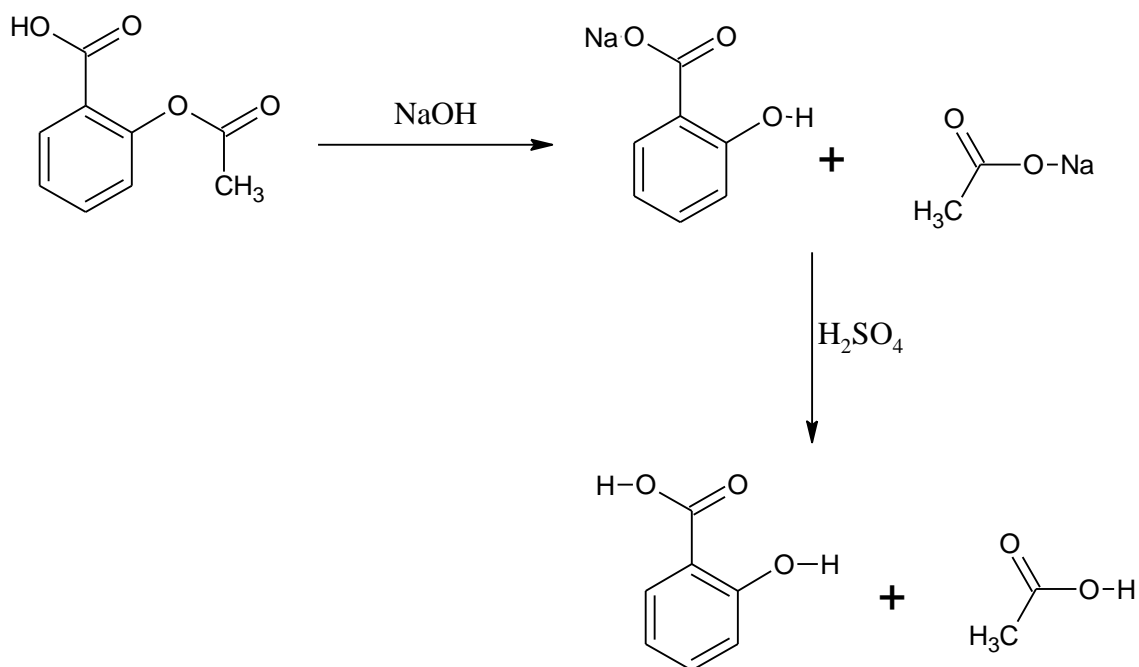
Šťavelan vápenatý, málo rozpustná sůl kyseliny šťavelové, se rovněž vyskytuje v moči některých pacientů a může být detekován mikroskopicky. V moči se vyskytuje jako dihydrát (často) nebo monohdrát (vzácně). V přírodě jej najdeme např. v některých rostlinách (Dieffenbachia – tam je příčinou jedovatosti, menší množství špenát, rebarbora). My si jej připravíme náhradou kationu slabé zásady iontem ze silné zásady podle rovnice:



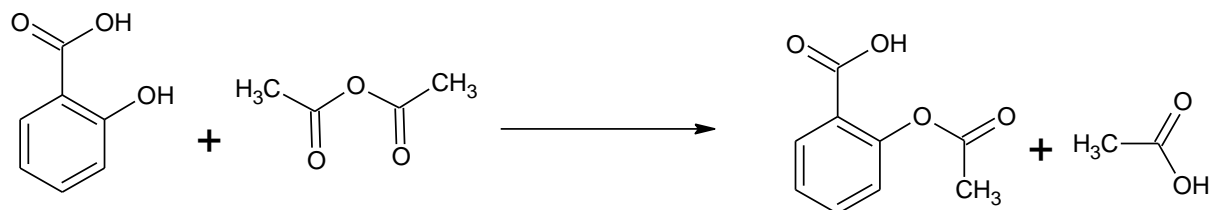
Hydrolyza kyseliny acetylsalicylové

Kyselina acetylsalicylová, Aspirin® (originálně od firmy Bayer) nebo náš domácí Acylpyrin je dodnes hojně užívaným lékem na tlumení bolesti, zánětu a teploty.

Při jeho hydrolyze dostaneme kyselinu salicylovou, výchozí bod pro průmyslovou syntézu tohoto léku. Reakce je typickou alkalickou hydrolyzou esteru, tedy musí vzniknout sůl kyseliny a alkohol.



Pokud obrátíme postup a vyjdeme z kyseliny salicylové, pak její **acetylací pomocí acetanhydridu** dostaneme kyselinu acetylsalicylovou podle rovnice:



To, že jsme připravili kyselinu salicylovou si ověříme zkouškou pomocí tzv. **Uffelmanna činidla**, což je chlorid železitý. S tím poskytují všechny hydroxykyseliny barevnou reakci.

Převedením volné kyseliny na sůl dochází ke zvýšení polarity látky a tudíž větší rozpustnosti ve vodě.

Sodnou sůl získáme reakcí volné kyseliny s hydroxidem sodným.

Úloha 1 – Redukce Fehlingova roztoku

Princip :

Z Fehlingova roztoku získaného smísením roztoků Fehling I a Fehling II v poměru 1:1 se v přítomnosti aldehydů sráží načervenalý oxid měďný.

Provedení :

Příprava Fehlingova roztoku : smíchejte roztoky Fehling I a Fehling II v poměru 1:1 (objemově, tj. 1 díl roztoku I + 1 díl roztoku II).

Vezměte zkumavku a dejte do ní několik kapek formaldehydu, přidejte cca 3 ml Fehlingova roztoku. Po mírném zahřátí pozorujeme vysrážení červeného Cu_2O . Současně provedeme slepou zkoušku bez formaldehydu.

Úloha 2 – Redukce Tollensova činidla

Princip :

Kyselina mravenčí redukuje Tollensovo činidlo, vzniká stříbro v ox. stavu 0. Kyselina mravenčí se oxiduje na oxid uhličitý.

Provedení :

Vodný roztok AgNO_3 (100 g/l) a NaOH (2 mol/l) smícháme v poměru 1:1. Dojde k vysrážení Ag_2O . Přikapávejte amoniak tak dlouho, dokud se vyloučený Ag_2O právě nerozpustí. Přebytek amoniaku není žádoucí, snižuje citlivost činidla.

Smíchejte 0,5 ml HCOOH s 1 ml vody a 2 ml připraveného Tollensova činidla. Opatrně zahřejte. Kovové stříbro se vyloučí jako šedočerná sraženina nebo lesklé zrcátko na stěně zkumavky.

Slepá zkouška: Samotné Tollensovo činidlo nesmí po zahřátí tvořit sraženinu.

Úloha 3 - Detekce acetonu Lestradetovou zkouškou

Princip :

Ketolátky tvoří s nitroprussidem sodným barevnou sloučeninu, této reakce je možné použít k důkazu acetonu v moči.

Provedení :

Navlhčete kolečko filtračního papíru a položte jej na hodinové sklíčko. Filtrační papír pokapejte zředěným acetonem. Přidejte několik krystalků činidla. Po chvíli pozorujte fialové zbarvení.

Úloha 4 – Tvorba šťavelanu vápenatého

Princip :

Kyselina šťavelová tvoří se dvěma amonnými kationty rozpustnou sůl. Amonné kationty můžeme nahradit kationty silnějších zásad (sodné, vápenaté atd.). V roztoku minerální kyseliny se tyto soli rozpouštějí, ve vodě jsou prakticky nerozpustné.

Provedení :

Malé množství kys. šťavelové rozpustíme ve vodě. Přidáme asi 10 kapek amoniaku, po přidavku by směs měla být neutrální. Poté přidáme asi 1 ml vodného roztoku CaCl_2 (10g /l). Vznikne bílá sraženina $(\text{COO})_2\text{Ca}$. Sraženinu rozpustíme přidáním 1 ml zředěné HCl. Sledujeme pH, při kterém došlo k rozpuštění (pomocí indikátorového papírku).

Úloha 5 - Deacetylace kyseliny acetylsalicylové :

Princip :

Při alkalické hydrolyze esterů, podle schématu uvedeného v teoretické části, z jednoho molu esteru vznikne jeden mol sodné soli kyseliny a jeden mol alkoholu. Sodná sůl kyseliny je dobře rozpustná ve vodě. Okyselením získáme volnou kyselinu, která je omezeně rozpustná ve vodě. Proto volná kyselina začne z roztoku za snížené teploty krystalovat.

Bezpečnostní opatření : Pozor ! Při této práci budete pracovat se žiravinami, použijte stanovené ochranné prostředky (ochranné brýle, rukavice). Při neutralizaci vlévejte OPATRNĚ a POMALU roztok kyseliny do reakční směsi až poté, co reakční směs úplně vychladla.

Zabraňte utajenému varu vody použitím varného kamínku nebo míchadla.

Pracovní postup :

1 g kyseliny acetylsalicylové nasypejte do 125 ml Erlenmayerovy baňky, přidejte 5 ml 50%-ního NaOH a zahřívejte k varu na vroucí vodní lázni (varný kamínek nebo lépe míchadlo proti utajenému varu). Reakční směs vařte 10 minut, poté nechte vychladnout, chlazení možno urychlit lázní - studenou vodou, příp. studenou vodou s ledem.

Do vychlazené směsi přidejte opatrně zředěnou kyselinu sírovou – je třeba přestat s přidávkem ve chvíli, kdy se začnou vylučovat bílé krystaly kyseliny salicylové. pH, zjištěné papírkem by mělo být lehce kyselé.

Krystaly odfiltrujte papírovým filtrem a osušte s pomocí filtračního papíru.

Úloha 6 - Reakce volné –OH skupiny s Uffelmannovým činidlem

Princip:

Uffelmannovo činidlo je roztok chloridu železitého. Ten reaguje s volnou hydroxyskupinou organických hydroxykyselin za vzniku barevných solí. V naší úloze zbarvení indikuje proběhlé uvolnění –OH skupiny z esteru.

Provedení:

Malou část produktu hydrolýzy (“špetka”) přeneste skleněnou tyčinkou do zkumavky, přidejte vodu a promíchejte. Přidejte kapku Uffelmannova činidla a pozorujte změnu zbarvení

Úloha 7 – Sodná sůl kyseliny salicylové

Princip

Kyselina salicylová je špatně rozpustná ve vodě. Převedením na sodnou sůl zvýšíme její rozpustnost.

Provedení :

Do zkumavky dejte několik krystalů ("špetka") kyseliny salicylové, připravené deacetylací . Přidejte asi 1ml vody a protřepejte. Roztok není homogenní. Nyní přidejte 2 ml roztoku NaOH (ten, který jste použili k alkalické hydrolýze). Promíchejte.

Úloha 8 - Acetylace kyseliny salicylové

Princip:

K tvorbě esterů karboxylových kyselin je možné využít jejich anhydridy. Anhydrid reaguje s alkoholem za vzniku esteru (odvozené od kyseliny a alkoholu) a kyseliny.

Bezpečnost práce : Pozor ! Acetanhydrid je dráždivou látkou, pozor na potřísnění pokožky a podráždění při nadechnutí. Kyselina fosforečná je žíravina, použijte ochranné prostředky-brýle a rukavice.

Pracovní postup:

Připravte si vodní lázeň (400 ml kádinka naplněná do ca čtvrtiny vodou) a zahřejte k varu.

Vezměte produkt předchozí reakce, opatrně úzkou stranou plastické lžičky jej z filtračního papíru přeneste do 125 ml Erlenmayerovy baňky.

Opatrně přidejte 1,5 ml acetanhydridu a 2 kapky kyseliny fosforečné.

Nádobu umístěte do vodní lázně a zahřívajte po dobu 15-ti minut.

Potom nechte vychladnout na laboratorní teplotu. Chladnutí můžete uspíšit vodní lázní s ledem nebo následujícím způsobem:

K reakční směsi přidejte ca 30 ml vody a 1-2 kostky ledu. Baňku umístěte do ledové lázně.

Při chladnutí obsah baňky míchejte a přitom skleněnou tyčinkou třete stěny a dno baňky . Postupně se vyloučí krystaly kyseliny acetylsalicylové.

Krystaly odfiltrujte, vysušte pomocí filtračního papíru.

Literatura :

Úlohy 1-4 byly připraveny podle skript Kraml J. a kol.: Návody k praktickým cvičením z lékařské chemie a biochemie, Praha 1991

Ostatní postupy byly postaveny na klasických obecně známých úlohách, ale modifikovány, vzhledem k praktickým a časovým možnostem naší výuky

R a S věty

tyto věty je třeba, v souvislosti se zákonnými normami uvádět při práci s jedy, hořlavinami a žíravinami (dle vyhlášky 460/2005 Sb. a podle předpisu (EU) č. 1907/2006)

ACETANHYDRID

Vzorec: $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$

Symbole nebezpečnosti: **C**



R-věty: **R 10-20/22-34**

Hořlavý.
Zdraví škodlivý při vdechování a při požití.
Způsobuje poleptání.

S-věty: **S 26-36/37/39-45**

Při zasažení očí okamžitě důkladně vypláchněte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc.
Použijte vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice a ochranné brýle nebo obličejový štít.
V případě úrazu nebo necítíte-li se dobře, okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc (je-li možno, ukažte toto označení).

ACETON (DIMETHYLKETON, PROPANON)

Vzorec: CH_3COCH_3

Symbole nebezpečnosti: **F, Xi**

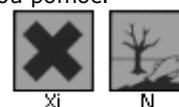


R-věty: **R 11-36-66-67**

Vysoce hořlavý.
Dráždí oči.
Opakovaná expozice může způsobit suchou a popraskanou kůži.
Páry mohou způsobit ospalost a závratě.

S-věty: **S 9-16-26**

Uchovávejte obal na dobře větraném místě.
Uchovávejte mimo dosah zdrojů zapálení - Zákaz kouření.
Při zasažení očí okamžitě důkladně vypláchněte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc.



FORMALDEHYD

Nejzávažnější nepříznivé fyzikálně-chemické účinky látky nebo přípravku: Způsobuje poleptání.

Nejzávažnější nepříznivé účinky na zdraví člověka látky nebo přípravku: Toxický při vdechování, styku s kůží a při požití. Podezřelý z karcinogenních účinků. Může vyvolat senzibilizaci kůže. Chronická otrava je sporná, přesto je formaldehyd důvodně podezřelý z mutagenních a karcinogenních účinků. Působí silně dráždivě na pokožku, oči a sliznice.

Nejzávažnější nepříznivé účinky na životní prostředí látky nebo přípravku: Látka je neomezeně rozpustná ve vodě, dobře biologicky odbouratelná.

Předvídatelné symptomy související s použitím látky nebo přípravku: Látka je toxická, zdraví škodlivá, dráždivá, korozivní, a to při všech druzích kontaktu, mutagenní a karcinogenní

HYDROXID AMONNÝ - VODNÝ ROZTOK (AMONIAK, ČPAVKOVÝ ROZTOK)

Vzorec: NH_4OH , NH_3

Symbole nebezpečnosti: **C, N**



R-věty: **R 34-50**

Způsobuje poleptání.
Vysoce toxický pro vodní organismy.
S-věty: **S 26-36/37/39-45-61**

HYDROXID SODNÝ

Vzorec: NaOH

Symboly nebezpečnosti: **C**

R-věty: **R 35**

Způsobuje těžké poleptání.
S-věty: **S 26-36/37/39-45**

Při zasažení očí okamžitě důkladně vypláchněte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc.
Používejte vhodný ochranný prostředek



CHLORID VÁPENATÝ

Vzorec: CaCl₂

Symboly nebezpečnosti: **Xi**

R-věty: **R 36**

Dráždí oči.
S-věty: **S 22-24**

Nevdechujte prach.
Zamezte styku s kůží



KYSELINA ACETILSALICYLOVÁ

Vzorec: C₉H₈O₄

Symboly nebezpečnosti: **Xn**

R-věty: **R 22**

Zdraví škodlivý při požití



KYSELINA FOSFOREČNÁ

Vzorec: H₃PO₄

Symboly nebezpečnosti: **C**

R-věty: **R 34**

Způsobuje poleptání.
S-věty: **S 26-36/37/39-45**

Při zasažení očí okamžitě důkladně vypláchněte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc.
Používejte vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice a ochranné brýle nebo obličejový štít.
V případě úrazu nebo necítíte-li se dobře, okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc (je-li možno, ukažte toto označení).



KYSELINA SÍROVÁ

Vzorec: H_2SO_4

Symboly nebezpečnosti: **C**



R-věty: **R 35**

Způsobuje těžké poleptání.

S-věty: **S 26-30-45**

Při zasažení očí okamžitě důkladně vypláchněte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc.

K tomuto výrobku nikdy nepřidávejte vodu.

V případě úrazu nebo necítíte-li se dobře, okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc (je-li možno, ukažte toto označení).

KYSELINA ŠŤAVELOVÁ

Vzorec: $(\text{COOH})_2$

Symboly nebezpečnosti: **Xn**



R-věty: **R 21/22**

Zdraví škodlivý při styku s kůží a při požití.

S-věty: **S 24/25**

KYSELINA MRAVENČÍ

Vzorec: HCOOH

Symboly nebezpečnosti: **C**



R-věty: **R 10-35**

Hořlavý.

Způsobuje těžké poleptání.

S-věty: **S 23-26-45**

Nevdechujte plyny/dýmy/páry/aerosoly ... (příslušný výraz specifikuje výrobce).

Při zasažení očí okamžitě důkladně vypláchněte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc.

V případě úrazu nebo necítíte-li se dobře, okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc (je-li možno, ukažte toto označení).

Grafické znázornění výstražných symbolů nebezpečnosti				
E 	F+ 	T+ 	C 	Xi 
Výbušný	Extremně hořlavý	Vysoce toxický	Žiravý	Dráždivý
O 	F 	T 	Xn 	N 
Oxidující	Vysoce hořlavý	Toxický	Zdraví škodlivý	Nebezpečný pro životní prostředí