

Quaderno di laboratorio  
Anno Accademico 2010/2011

Preparazioni  
estrattive e  
sintetiche dei  
farmaci

di Dario Cambié  
matr. **742303**

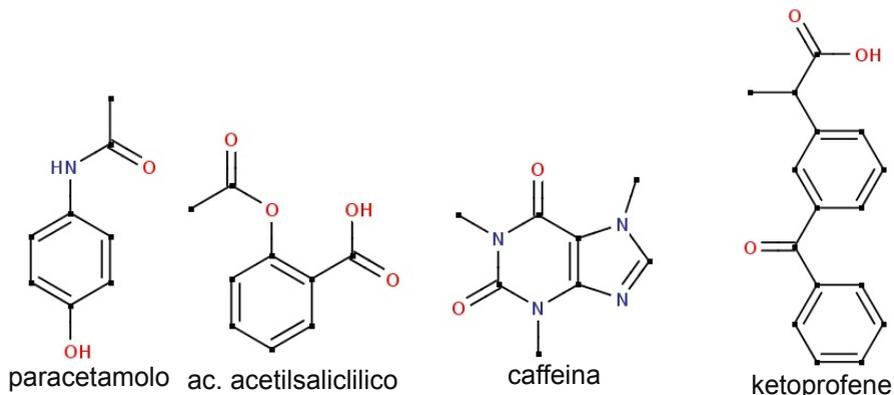
- turno B -

# INDICE

- 3 Thin Layer Chromatography
- 7 separazione acido/base di acido  
acetilsalicilico e difenidramina cloridrato
- 10 estrazione della trimiristina dalla noce  
moscata
- 12 estrazione della caffeina dalle foglie di tè
- 14 sintesi del paracetamolo
- 16 estrazione dell'eugenolo dai chiodi di  
garofano
- 20 sintesi della lidocaina
- 24 sintesi del dipeptide Phe-Phe
- 31 sintesi dell'aroma di banana

# Esercitazione tecnica: Thin Layer Chromatography (TLC)

La Thin Layer Chromatography (TLC) è una tecnica cromatografica semplice e veloce utile per l'**identificazione** (come confronto con un riferimento) ed il **controllo** della **purezza** di molecole organiche. In questa esperienza sono stati provati diversi eluenti al fine di individuare una miscela eluente in grado di sviluppare contemporaneamente 4 sostanze a polarità diversa:



## Thin Layer Chromatography

La fase stazionaria delle lastrine è costituita dal polare gel di silicie (silica gel) supportata su fogli d'alluminio. Una volta **sciolto** il composto d'interesse in un idoneo solvente (ovvero un solvente in cui abbia buona solubilità, in genere **acetone**) se ne depone una goccia sulla lastrina con l'aiuto di un capillare (a circa 1 cm dal fondo, e comunque sempre più alta del livello dell'eluente nella camera).

La lastrina è successivamente posta in una camera eluente con alla base un solvente che risalendo sulla lastrina trascinerà con sé l'analita. Analiti apolari si distribuiranno di preferenza nella miscela eluente apolare in corsa mentre i più polari saranno trattiene più tenacemente dalla fase stazionaria polare: ne deriverà una corsa differenziale in base alla polarità del composto.

La corsa dei composti viene infine misurata individuandone le macchie alla **lampada UV** o nella camera con vapori **iodio** ( $I_2$ ).

Si calcola quindi l' $R_f$  di ciascuna sostanza ovvero il rapporto di corsa rispetto a quella miscela eluente definito come la corsa della sostanza in rapporto alla corsa totale del solvente, che si ottiene misurandone il fronte d'eluizione.

Le 4 **molecole** da analizzare, come evidenziano le formule di struttura, sono **abbastanza polari** (anche se bisogna tenere conto anche di fattori non immediatamente visibili dalla struttura come il legame idrogeno interno alla molecola che mitiga la polarità dell'acido acetilsalicilico).

## ***Tentativi***

Dopo aver preparato, uno a testa nel banco, i 4 riferimenti in Eppendorf delle sostanze da analizzare in TLC, vengono provate le prime miscele eluenti. Le più apolari non comportano alcuna corsa, come esempio è riportata la miscela cicloesano:acetato d'etile 6:4 (*le rapporti sono espressi sui 10ml del cilindro più piccolo tra quelli in dotazione*). Tutte le sostanze “**restano al palo**” ovvero la loro corsa è minima: sarà **necessario aumentare la polarità**.

Dai diversi solventi disponibili in laboratorio, infatti, si può costruire una serie elutropa formata dai solventi ordinati per polarità crescente:

1. cicloesano
2. toluene
3. acetato di etile
4. diclorometano
5. acetone
6. etanolo



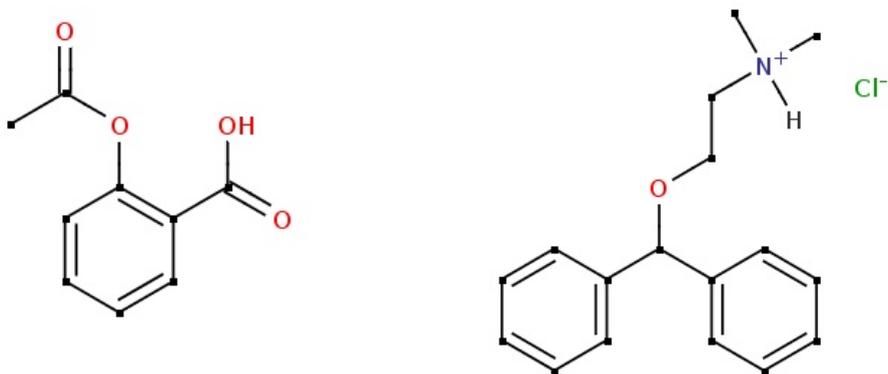




L'ultima TLC, che mostra un buon range di risoluzione per **tutte e 4 le molecole contemporaneamente** è acetato d'etile:metanolo 9:1. Sono da ricercarsi, infatti  $R_f$  compresi tra 0,2 e 0,6.

# Esercitazione tecnica: separazione acido/base di acido acetilsalicilico e difenidramina cloridrato

In questa esercitazione acido acetilsalicilico e difenidramina cloridrato in miscela incognita sono separati mediante estrazione acido/base, ciò è reso possibile dalle loro diverse pKa: rispettivamente 3,49 e 9,00.



## Procedimento

Sospendo la miscela in 20ml di H<sub>2</sub>O, successivamente aggiungo una soluzione di bicarbonato di sodio (al 5% in massa su volume, ottenuta sciogliendo 5g in 100ml) per avere l'acido in forma deprotonata e l'ammina neutra. **Basifico**, controllando con cartina, fino a pH  $\approx$  9.

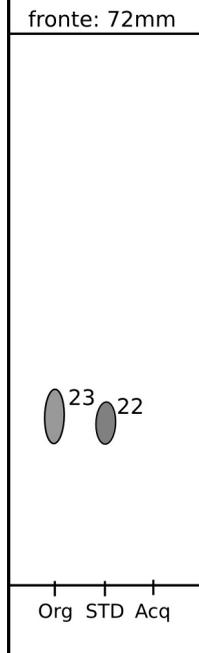
La soluzione è versata in un imbuto separatore dove **estraggo** la **difenidramina** con una fase organica apolare di **acetato d'etile**.

Dopo tre estrazioni, per un volume complessivo di 60 ml, **controllo** mediante **TLC** la fase acquosa, seminata con un riferimento di difenidramina, per verificare l'assenza dell'antistaminico. Nella fase acquosa è presente la sola macchia dell'acido acetilsalicilico pertanto l'estrazione è avvenuta correttamente.

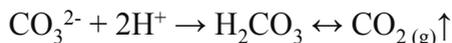
**Nota:** Per poter seminare in TLC la fase acquosa contenente l'acido acetil salicilico è necessario operare una microestrazione. Si preleva un'aliquota di fase acquosa dall'imbuto e la si raccoglie in una

Eppendorf. Si aggiunge una fase organica (acetato di etile) si agita e si semina quest'ultima (è fase sovrastante perché l'acetato ha densità minore dell'acqua).

**Anidrifico** la fase organica contenente la fenidrammina su **sodio solfato** anidro prima di seccarla al **rotavapor**. Ottengo così 1,312g di difenidrammina, un olio dai riflessi giallastri.



Acidifico la fase acquosa con acido cloridrico diluito. Si sviluppano bolle in seguito alla produzione di CO<sub>2</sub> dal carbonato.



Ottenuto l'**acido acetilsalicilico** nella **forma protonata** (meno polare) si può sfruttare il coefficiente di ripartizione favorevole. Lo **estraggo** quindi **con** una fase organica di **acetato di etile** (3 aliquote da 15ml).

**Controllo** l'avvenuta estrazione in **TLC** (std = standard di riferimento, Acq = fase acquosa e Org = fase organica).

Come per la fenidrammina anidrifica con sodio solfato, filtro l'adsorbente e secco il pallone al **rotavapor**. In questo caso si ottiene un solido bianco.

Purifico infine l'acido acetilsalicilico mediante **ricristallizzazione**. E' necessario individuare il miglior solvente per la ricristallizzazione. Il solvente ideale scioglie il solido a caldo ma non a freddo e deve essere in grado di solubilizzare le impurezze presenti.

La metodica consiglia di saggiare acetato di etile, etanolo e isopropanolo.

L'acetato di etile è stato precedentemente impiegato per l'estrazione dell'acido acetilsalicilico, pertanto, solubilizzando a freddo il composto, non è adeguato alla sua ricristallizzazione.

Prelevo quindi due aliquote pesate ( $\approx 0,4\text{g}$ ) di acido acetilsalicilico di riferimento e aggiungo quantità crescenti di etanolo ed isopropanolo. Il composto è solubile in etanolo ma poco o per nulla solubile in isopropanolo. (*La solubilità in etanolo -eth.- era attesa dai dati tabulati del CRC Handbook of Chemistry and Physics*). Scarto il primo ed eseguo la prova a caldo con il secondo: il solido passa in soluzione. Si sono resi necessari 2ml da cui ricavo un valore approssimato di solubilità dell'acido acetilsalicilico in isopropanolo bollente:  $\approx 1\text{g}/5\text{ml}$ .

Poiché nel pallone ho 0,476g di acido acetilsalicilico ricristallizzo con 2,5 ml di **isopropanolo**. In seguito a raffreddamento ottengo un solido cristallino bianco che filtro su Hirsch ottenendo 0,425g. La resa della ricristallizzazione è quindi 89 %.

## Calcolo della composizione della miscela

Per l'acido acetilsalicilico non è necessario alcun calcolo aggiuntivo: gli 0,436 g ottenuti sono direttamente confrontabili a quelli presenti in miscela.

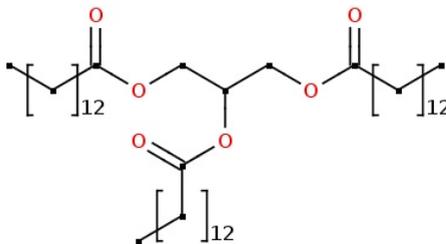
$$1,499 \text{ g} + 0,436 \text{ g} = 1,935 \text{ g}$$

$$\% \text{ acido acetilsalicilico} = 0,436/1,935 = 22,55 \rightarrow \mathbf{0,45 \text{ g} / 2\text{g}}$$

$$\% \text{ difenidramina} = 1,499/1,935 = 77,45 \rightarrow \mathbf{1,55 \text{ g} / 2\text{g}}$$

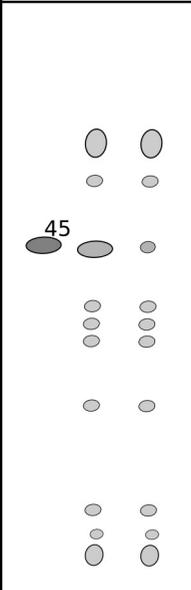
# Esercitazione estrattiva: estrazione della trimiristina dalla noce moscata

La trimiristina, un trigliceride, è il principale costituente dell'olio essenziale di noce moscata. Per la sua apolarità è estratta efficacemente da un solvente apolare come il diclorometano ed essendo presente in grande quantità è efficacemente purificata mediante ricristallizzazione.



## Procedimento

Sospendo 10,02 g di polvere di noce moscata in 50ml di diclorometano e scaldo, sotto agitazione magnetica, per un'ora. La soluzione assume una colorazione gialla-arancio.

$C_6H_{12}:CH_3COOEt$ 9 : 1 fronte: 78mm

T Grezzo Acq

Separo le impurezze solide dalla soluzione di diclorometano mediante **filtrazione** sotto vuoto (Buchner).

Il solvente è evaporato a pressione ridotta dove a causa dell'alta temperatura del bagno d'acqua si ottiene un liquido che diventa solido una volta rimosso dal **rotavapor**. Il punto di fusione della trimiristina, infatti, è piuttosto basso. Ottengo così 6,10g di prodotto grezzo (una pasta giallina).

Il solido così ottenuto deve essere purificato mediante **ricristallizzazione**. Con un campione di riferimento di trimiristina effettuo quindi un saggio in provetta per misurare la quantità di **etanolo** necessaria a solubilizzarla. Per 0,25 g di trimiristina si sono resi necessari 1 ml di etanolo.

Per la ricristallizzazione utilizzo pertanto 24 ml di

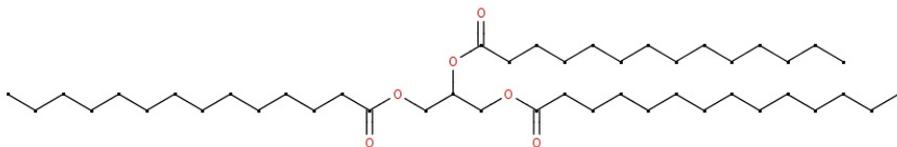
etanolo, raffreddato con bagno di ghiaccio e filtro su Buchner ottenendo 4,93g di trimiristina. Una prima conferma dell'avvenuta purificazione della trimiristina è data dal colore: è diventata bianca. Controllo il processo con una TLC (T = trimiristina filtrata dopo la ricristallizzazione, Grezzo = trimiristina pre-ricristallizzazione Acq = acque madri).

La ricristallizzazione ha purificato significativamente la trimiristina, la macchia di trimiristina residua nelle acque madri è inevitabile e la quantità di prodotto perso è pari alla sua solubilità a freddo nel solvente utilizzato moltiplicato per la quantità di solvente impiegato. E' proprio per questo che si deve cercare di utilizzare la minor quantità possibile di solvente per la ricristallizzazione.

Il **punto di fusione**, misurato dopo essiccazione, è 54,2 – 55,3B °C.

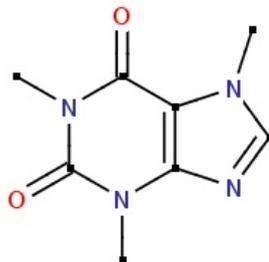
Il **contenuto percentuale** di trimiristina nella polvere di noce moscata è del:  $6,10/10,02g = 60,1\%$ .

La resa del processo di ricristallizzazione è del 80,8% (4,93 g / 6,10 g) da cui si ricava che la trimiristina pura ottenuta è il 48,5% in massa del prodotto di partenza.



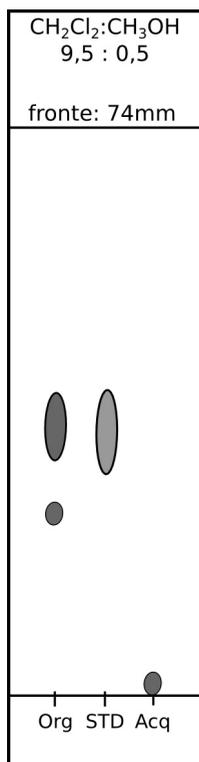
# Esercitazione estrattiva: estrazione della caffeina dalle foglie di tè

La caffeina è una delle sostanze attive presenti nelle foglie del tè. Si tratta di una metilxantina solubile in acqua e quindi la prima estrazione si è usata l'acqua come solvente.



## Procedimento

Verso 10,13g di **foglie tè** macinate ottenute dalle bustine di tè Star in una beuta dove aggiungo 100ml di **acqua bollente**. Dopo 10 minuti di agitazione magnetica (la soluzione ha assunto il caratteristico colore dell'infuso di tè) spegno l'agitatore lascio decantare e rimuovo l'acqua. Durante questa operazione le foglie si rigonfiano d'acqua aumentando di volume. Aggiungo altri 100ml di acqua bollente e proseguo come sopra per altre 2 volte.



Prima di procedere all'estrazione con solvente organico è necessario far raffreddare la fase acquosa. Ciò va sempre fatto poiché i solventi da impiegare nelle estrazioni sono generalmente bassobollenti, e a contatto con l'acqua bollente, o comunque più calda del proprio p.f., evaporerebbero col rischio tra l'altro di far esplodere l'imbuto, se tappato. In questo caso poi una temperatura bassa è anche funzionale ad evitare eventuali emulsioni che potrebbero formare i tannini presenti nelle foglie di tè.

Dagli infusi acquosi **estraggo** la caffeina con tre aliquote di **diclorometano** (100ml), con qualche difficoltà nella terza estrazione a causa della formazione di un'emulsione che però si rompe bucando l'interfaccia l'agitatore in vetro. Poiché il solvente è clorurato presenta una densità maggiore dell'acqua pertanto è facilmente rimosso dal rubinetto

inferiore dell'imbuto separatore. L'avvenuta estrazione è verificata in **TLC** con uno standard di caffeina.

La fase organica presenta un colore residuo giallino.

La fase organica così ottenuta è anidrificata in una beuta con sodio solfato e successivamente seccata al **rotavapor**. Si ottengono così 0,28g di caffeina grezza.

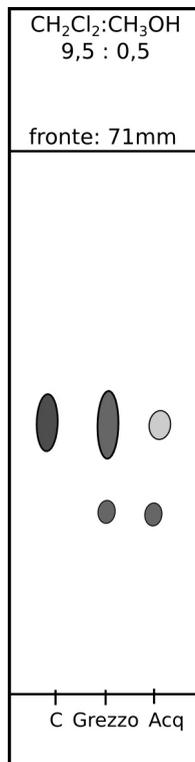
E' ora necessario purificarla mediante **ricristallizzazione**. Il solvente per la ricristallizzazione è l'acetone, dai test in provetta risulta un rapporto di 1,5 ml per 0,5g di caffeina pertanto provo a ricristallizzare in provetta con 1ml di **acetone**. Per portare in soluzione tutto il grezzo, però, devo aggiungere ancora qualche goccia di acetone. La precipitazione della caffeina non è immediata quindi dopo averla posta in bagno di ghiaccio si strofinano con l'agitatore le pareti della provetta per favorire la nucleazione. Si ottiene così un solido bianco che viene isolato per filtrazione sotto vuoto con **Hirsch** vista l'esigua quantità di prodotto. Per il timore di perdere il poco prodotto ottenuto non rifiltro le acque madri per cercare di recuperare la caffeina adesa alle pareti della provetta.

Si ottengono così 0,17g di caffeina (resa ricristallizzazione 61%).

L'avvenuta purificazione è evidenziata dalla TLC di controllo (C = caffeina, Grezzo = caffeina pre-ricristallizzazione, Acq = acque madri).

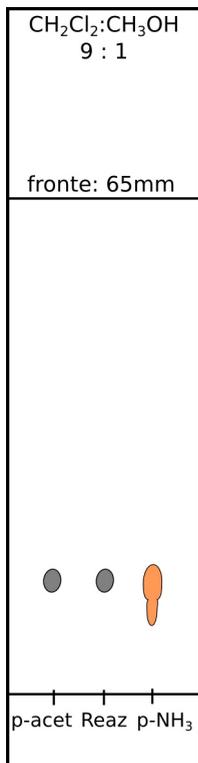
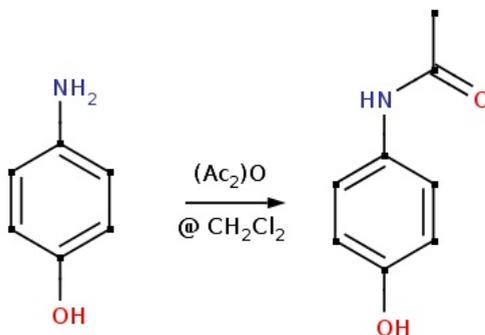
Il **contenuto percentuale** di caffeina nelle foglie di tè era quindi del 2,8% (0,28g / 10,13g) calcolata sulla caffeina grezza mentre la percentuale di prodotto puro ottenuto è dell'1,6% in massa.

Il punto di fusione calcolato sul prodotto asciutto è 235,9 - 236,7°C.



# Esercitazione sintetica: sintesi del paracetamolo a partire da p-aminofenolo

Il paracetamolo è un FANS di largo impiego anche grazie alla sua struttura semplice che ne consente una sintesi facile ed economica. In questa esercitazione il paracetamolo è preparato a partire dal suo precursore p-aminofenolo per acetilazione selettiva dell'ammina.



## Procedimento

0,05 moli di **p-aminofenolo**, pari a 5,46g (P.M. 109,13 g/mol), sono sospese in un pallone a due colli con 80 ml di diclorometano. Una volta raffreddato il pallone con un bagno di ghiaccio gocciolo l'**anidride acetica** (un eccesso misurato di 1,3eq) dal collo laterale.

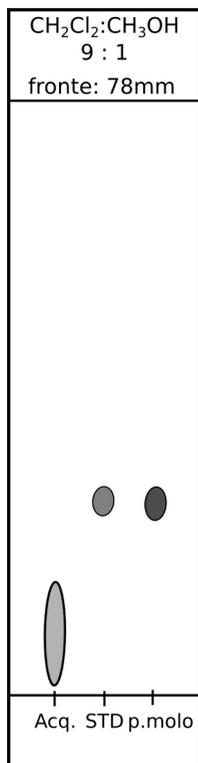
1,3 equivalenti rispetto alle 0,05 mol di p-aminofenolo significano 0,065 mol ovvero (P.M. 102,09 g/mol) 6,64g che divisi per la densità di 1,05g/ml sono pari a 6,3ml.

Dopo aver gocciolato l'anidride rimuovo il bagno di ghiaccio e lascio reagire per 30 minuti sempre sotto agitazione magnetica, dopo di che verifico la scomparsa del p-aminofenolo in TLC.

In questo caso risulta particolarmente utile la **camera allo iodio** poiché p-aminofenolo e paracetamolo sono strutturalmente simili hanno  $R_f$  non molto diversi, ma solo il prodotto non reagisce al colore di arancio con lo iodio pertanto è possibile appurarne la scomparsa dalla miscela di

reazione. (Reaz = miscela di reazione, p-NH<sub>3</sub> = p-aminofenolo, p-acet = paracetamolo).

L'acetaminofene viene quindi **filtrato sotto vuoto** con Buchner e il solido ottenuto, 7,86g, è lasciato ad **asciugare**.



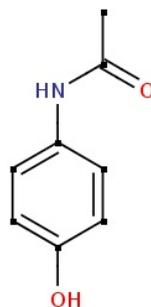
Il solido biancastro così ottenuto viene successivamente purificato per **ricristallizzazione da acqua**. Il rapporto di solubilità a caldo ottenuto dalle prove di ricristallizzazione è di 1:3. Sciolgo quindi il p.molo in 23,5ml di acqua e aggiungo gli ebollitori per la ricristallizzazione. Dopo lento raffreddamento (per evitare l'incorporazione di impurezze nel reticolo cristallino) e finendo con un bagno di ghiaccio si ottengono 7,23g di cristalli bianchi che vengono filtrati sotto vuoto. L'avvenuta purificazione, già intuibile dal colore e dalla più regolare forma dei cristalli è confermata dalla **TLC** (Acq. = acque madri, STD = paracetamolo di riferimento, p.molo = paracetamolo filtrato).

### Calcolo rese

Come detto il reagente limitante era il p-aminofenolo (0,05mol) pertanto le moli teoriche di paracetamolo (stechiometria 1:1) sono 0,05.

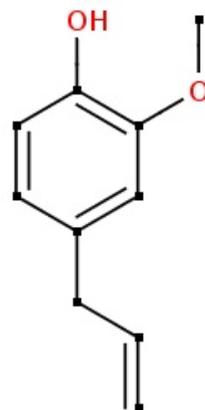
Il P.M. Del paracetamolo è 151,17, ne ho ottenuti 7,86g grezzi ovvero 0,051 mol (ma prima di essicarlo, pertanto il prodotto era bagnato oltre che non puro). La quantità finale di paracetamolo puro era 7,23g ovvero 0,047 mol per una resa del 95% (47,8 mmol / 50 mmol).

Il **punto di fusione**, infine, è compreso tra 168,9 e 170,7° C, compatibile con quello tabulato di 169° C.



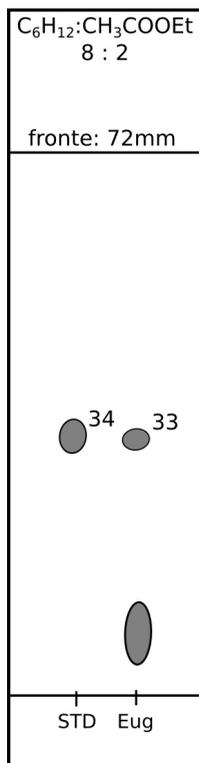
# Esercitazione estrattiva: estrazione dell'eugenolo dai chiodi di garofano

L'eugenolo è un derivato del fenilpropano presente nei chiodi di garofano, ai quali conferisce la caratteristica profumazione, ed è impiegato come analgesico ed antisettico. In questa esercitazione dopo averlo estratto con diclorometano verrà purificato mediante l'utilizzo di una colonna cromatografica.



## Procedimento

Prelevo 4,03g di chiodi di garofano in polvere e li pongo in un pallone da 100 ml con 50 ml di diclorometano e scaldo con bagno d'acqua a ricadere e sotto agitazione magnetica per 15 minuti.



Si esegue una TLC per controllare l'estrazione e per trovare la miscela eluente idonea alla successiva purificazione in colonna, tenendo presente che a causa della diversa polarità dei gruppi silanolicci tra silicie impaccata in colonna e legata sul supporto per la TLC la miscela di eluizione andrà variata diminuendone la polarità.

La miscela eluente impiegata per la TLC è stata cicloesano:acetato di etile 8:2, in colonna dovrei utilizzare 9:1 ma poiché con 8:2 l'analita non “corre” molto posso mantenere lo stesso rapporto.

Una volta raffreddata la miscela, allontano i residui solidi mediante filtrazione con Buchner. Gli estratti organici sono tirati a secco con il rotavapor in un pallone tarato; ottengo così 0,76g di prodotto grezzo.

## ***Purificazione in colonna***

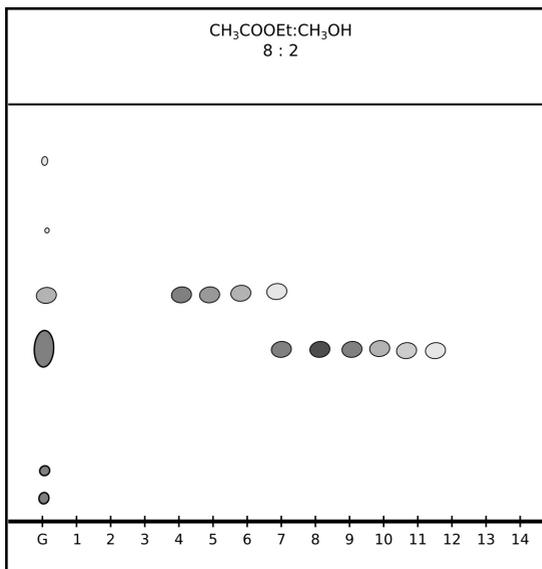
Il primo passo per la purificazione in colonna dell'eugenolo è la preparazione del “**polverino**” ovvero della sospensione silice-eugenolo che sarà caricata in colonna.

Il grezzo ottenuto al rotavapor, quindi, sarà sospeso in diclorometano con una quantità doppia (in massa) di silice rispetto al grezzo. In questo caso sono quindi necessari 1,5g di silice. La sospensione è tirata a secco al rotavapor e si ottiene così il polverino che andrà caricato in colonna.

Per quanto riguarda la preparazione della colonna si procede come segue:

1. si pone del cotone sul fondo della colonna di vetro. Questa operazione viene effettuata per prima perché è necessaria la bacchetta di vetro lunga di uso comune.
2. Il cotone viene bagnato (con la miscela eluente). Si prepara quindi la fase stazionaria costituita da gel di silice. La quantità di gel di silice può variare in un intervallo compreso tra 1:20 e 1:100 in rapporto al grezzo in funzione di diversi parametri quali il diametro interno della colonna e la quantità di impurezze presenti. In questo caso ho aggiunto 15g di silice per un'altezza in colonna di circa una spanna. La silice da aggiungere è sospesa nella miscela eluente (l'idratazione è esotermica e si avverte un lieve riscaldamento del becker).
3. Si carica la fase stazionaria mantenendo il rubinetto aperto, la silice sedimenterà sul fondo. In questa fase è cruciale evitare la formazione di bolle che creano cammini preferenziale all'interno del letto della colonna. Per fare ciò si picchiettano le pareti in vetro con un tubo di gomma. Si lascia scendere l'eluente in eccesso fino a 0,5cm dal setto.
4. A questo punto si carica il polverino, qualora sia versato male può rimanere sulle pareti in questo caso queste ultime si puliscono facendo scendere miscela eluente lungo la parete interna con l'aiuto della pipetta Pasteur. Si apre il rubinetto e si manda a secco il setto,

chiudendo il rubinetto non appena s'intravede la superficie del polverino. D'ora in poi la colonna non dovrà mai più andare a secco: se si seccasse la silicie disidratata diminuirebbe di volume creando un'intercapedine tra la fase stazionaria e la parete interna della colonna.



5. Una volta caricato il polverino si aggiunge la miscela eluente e si inizia lo sviluppo della colonna. La prima frazione, pari al volume della colonna, costituisce il cosiddetto volume morto e può non essere raccolto ed analizzato, tutto l'eluente successivo, invece, andrà raccolto in provette e analizzato periodicamente in TLC.

Poiché lo scopo di queste **TLC** è solo quello di controllare quando inizia a scendere il prodotto d'interesse, non è necessario farle correre molto e pertanto possono essere riutilizzate due volte, capovolgendole.

Sono state raccolte in totale **14 provette**, l'eugenolo è sceso tra la 7° e la 12°, le macchie in tlc si colorano debolmente allo iodio e diventano dopo qualche tempo viola-tenui.

Gli **estratti organici** contenenti l'eugenolo sono **riuniti** in un pallone tarato e tirati a secco al **rotavapor**. Si ottengono così 0,57g di eugenolo puro (un olio denso e giallo).

Se ne può quindi calcolare il **contenuto percentuale** rispetto al prodotto di partenza.

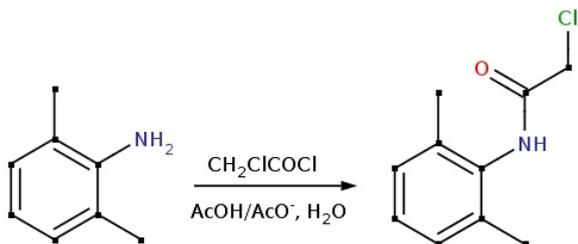
$$0,57\text{g}/4,03\text{g} = 14,1\%$$

# Esercitazione sintetica: sintesi della lidocaina

La lidocaina è un anestetico locale ed antiaritmico; la sua sintesi avviene in due fasi:

- acetilazione al gruppo amminico della 2,6-dimetil anilina
- alchilazione con un'ammina alifatica, la dietilammina.

## Acetilazione 2,6-dimetilanilina



In questa prima fase della reazione il cloroacetil cloruro, cloruro dell'acido acetico, acetila l'azoto della 2,6-dimetilanilina. Si utilizza il cloroacetil

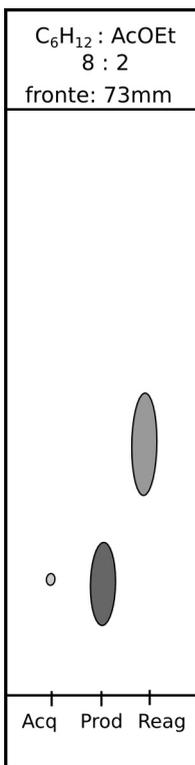
cloruro e non il semplice cloruro d'acetile perché sarà necessario aver funzionalizzato il carbonio in alpha all'amide per la reazione successiva.

In un pallone dal 100ml a 3 colli introduco 1,5ml (1,45g,  $\rho=0,985$ ) di **2,6-dimetilanilina** sciolti in 7,5ml (7,88g,  $\rho=1,05$ ) di **acido acetico** glaciale e successivamente gocciolo lentamente 1ml (1,42g,  $\rho=1,400$ ) del reattivo **cloroacetil cloruro**. La miscela è mantenuta sotto agitazione magnetica e aggiungo una soluzione acquosa ottenuta sciogliendo 2g di **acetato sodico** in 12,5ml di acqua. Si forma quindi un tampone acetato in cui parte dell'ammina è presente come ammina libera (che può, quindi, reagire a dare l'amide) e non come sale d'ammonio.

La reazione è istantanea e l'amide precipita, bianca, istantaneamente.

Aggiungo poi 30ml di acqua fredda e lascio in agitazione altri 15'.

Successivamente **filto** su **Buchner** il prodotto solido (una sottile polvere bianca), schiacciandolo e lasciandolo sul filtro a lungo in modo



da farlo asciugare il più possibile. Ottengo così 2,77g di prodotto che controllo in **TLC** assieme alle acque madri (Prod = N(2,6-dimetilfenil)cloroacetammide, Acq = acque madri di filtrazione, Reag = 2,6-dimetilanilina).

### Calcoli

Il reagente limitante era la 2,6 dimetilanilina, lieve eccesso di cloroacetil cloruro, due equivalenti di acetato di sodio ed acido acetico come solvente.

2,6-dimetilanilina:  $1,45g / 121,18g/mol = 0,0122mol$   
 $\rightarrow 12,2mmol$

cloroacetil cloruro:  $1,42g / 112,9g/mol = 0,0126mol$   
 $\rightarrow 12,6mmol$

acido acetico:  $7,88g / 60,05g/mol$   
 $= 0,13122mol \rightarrow 131,2mmol$

acetato di sodio:  $2g / 82,04g/mol = 0,02438mol \rightarrow$

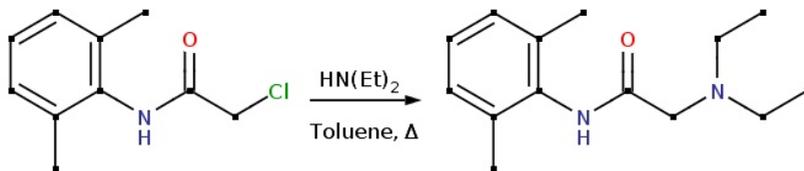
24,38mmol

2,77g di prodotto (P.M. 197,66) sono 14,01mmol, pertanto

$14,01mmol / 12,2mmol = 114,9\%$

La resa non può essere superiore al 100%, pertanto sospetto che il prodotto sia bagnato.

## Alchilazione con dietilammina



In questa seconda fase della reazione una reazione di sostituzione nucleofila introduce la dietilammina sulla catena laterale a completare la struttura della lidocaina.

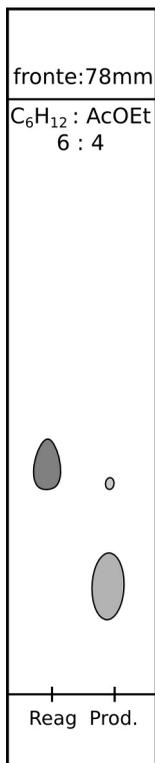
Trasferisco il precipitato in un pallone e aggiungo 3,75ml (2,65g) di **dietilammina** e 24ml di **toluene** (poiché è necessario un solvente aprotico).

Scaldo a riflusso per un'ora con il termomanto. Durante la reazione si genera HCl che è prontamente tamponato dall'eccesso di ammina alifatica che, reagendo con l'acido, dà il cloridrato, solubile in acqua, che sarà successivamente estratto.

Si controlla in **TLC** il completamento della reazione (Reag = N(2,6dimetilfenil)cloroacetamide, Prod = miscela di reazione). La scomparsa del reagente è quasi completa, la TLC successiva sviluppata subito dopo questa mostra l'effettiva scomparsa del reagente. Proseguo quindi con l'estrazione.

Una volta lasciata raffreddare trasferisco la miscela di reazione in imbuto separatore, dove **lavo** 2 volte con 100ml di **acqua** per rimuovere il cloridrato della dietilammina e la dietilammina in eccesso.

La **lidocaina** è quindi **estratta** con due aliquote (10ml ciascuna) di **acido cloridrico** 3M. Si tratta di un'estrazione acido-base analoga a quella della difenidramina: l'ammina si protona a dare cloridrato



solubile in acqua. La **soluzione acquosa** di lidocaina cloridrato così estratta è quindi posta in un becker in bagno di ghiaccio dove viene **basificata** con soda 3M fino a pH basico. La **lidocaina** base libera **precipita** come solido bianco.

Il prodotto è quindi filtrato alla pompa con **Buchner** dove viene lavato con acqua per rimuovere la soda e schiacciato per asciugarlo. Effettuo quindi una TLC di controllo (Rea = prodotto intermedio, A1 = fase acquosa estrazione, Org = fase organica, A2 = acque madri di filtrazione, Lid = lidocaina). Ho così ottenuto 0,49g di prodotto

E' ora necessario purificare il solido ed ottenere una forma cristallina migliore mediante **ricristallizzazione**. Il solvente di ricristallizzazione è l'**esano** in rapporto 1:3. Ne utilizzo pertanto 1,5ml.

Dalla ricristallizzazione da esano ottengo 0,28g di lidocaina con una resa della ricristallizzazione del 57% (0,28g /0,49g).

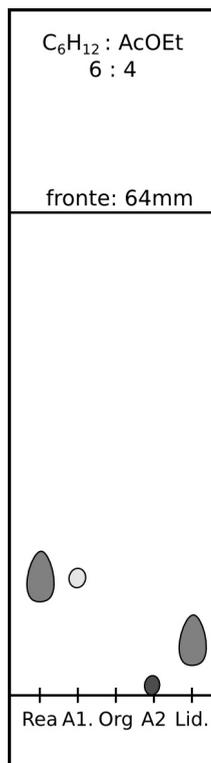
Il **punto di fusione** misurato qualche giorno dopo è 65,5 – 67,2° C (compatibile con quello tabulato di 64-66).

## Calcoli

Per la resa complessiva della sintesi considero come reagente limitante ancora la 2,6dimetilnilina (12,2mmol) perché l'intermedio di reazione era bagnato e la sua quantità superiore a quella teorica.

0,28g di lidocaina (P.M. 234,34) sono 1,12mmol pertanto:

Resa:  $1,12\text{mmol} / 12,2\text{mmol} = 9,2\%$



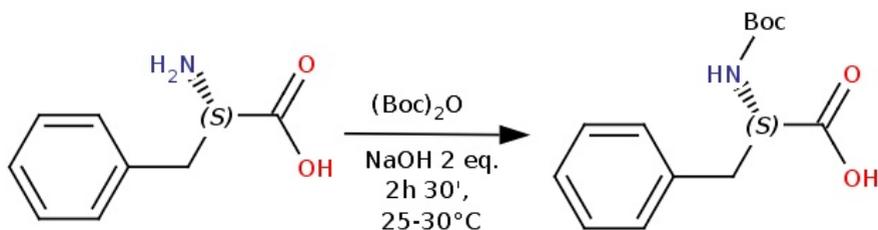
# Esercitazione sintetica: sintesi del dipeptide Phe-Phe

Gli oligopeptidi fino a qualche decina di residui amminoacidici possono essere preparati sinteticamente con buone rese ricorrendo alla sintesi in fase solida mediante resine. Per la sintesi di un semplice dipeptide, invece, è sufficiente la una sintesi in fase liquida.

Nel nostro caso abbiamo sintetizzato il dipeptide Phe-Phe ponendo a reagire la fenilalanina etil-estere con la Boc-Phe in presenza di attivatori del carbonile (DCC). Il dipeptide protetto è stato infine purificato con una colonna cromatografica.

## Protezione della fenilalanina con Boc

Il primo passaggio per la sintesi del dipeptide è la preparazione dei due amminoacidi, uno protetto all'estremità C-terminale (reagirà all'N-term) e l'altro protetto all'estremità N. Per la **protezione in N** si utilizza un gruppo protettore per gli amminoacidi di impiego comune: il **Boc**.



Pongo 0,80g di **fenilalanina** in un pallone da 100ml, aggiungo 2 equivalenti di NaOH 1M (pari a 9,7ml) perché la reazione avviene in ambiente basico ed è necessario evitare che gli H<sup>+</sup> prodotti dalla reazione ne impediscano la continuazione. Prelevo quindi 2 equivalenti (2,12g) di **Boc-anidride**. La Phe è il reagente limitante anche tenuto conto delle inevitabili perdite nell'aggiunta della (Boc)<sub>2</sub>O che, avendo p.f. di 22-24°C si è parzialmente solidificata nella pipetta.

Al termine dell'aggiunta la miscela viene lasciata a reagire sotto agitazione per due ore e mezza, la temperatura ottimale perché avvenga

la reazione è compresa tra i 25 ed i 30°C.

**Estraggo** con 30 ml di acetato d'etile la **Boc-anidride non reagita**. In questo modo nella fase acquosa resta il sale sodico della Boc-Phe. Procedo quindi **acidificando** con HCl diluito la fase acquosa per liberare la fenilalanina-boc dal suo sale sodico, in questo modo diventa apolare e può essere estratta con solventi organici.

**Estraggo** la **Boc-Phe** con 3 aliquote da 30ml di acetato d'etile. L'analisi in TLC mostra la Boc-Phe solo nella fase organica, le acque madri non mostrano macchie visibili all'UV (il Boc non si vede). Anidrifico quindi su sodio solfato che rimuovo con filtro a pieghe e tiro a secco al **rotavapor**. Ottengo così 1,12g di un liquido trasparente e denso.

### Calcoli Boc-Phe

La **L-Phe** ha PM di 165,19, ne ho prelevati 0,8g, per cui:

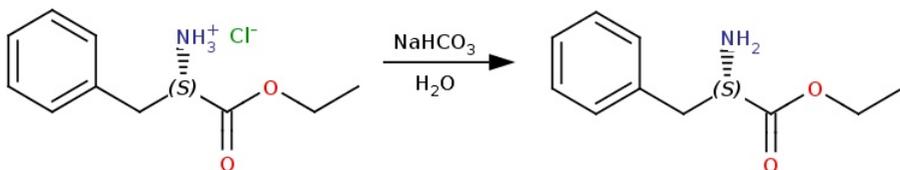
$$0,8g / 165,19g/mol = 0,00484mol \rightarrow 4,84mmol$$

Due equivalenti di **NaOH** 1M (PM 40) significa:

$$2 * 4,84mmol = 9,68 mmol \rightarrow \approx 9,7ml \text{ (1mol} = 1l; 1mmol = 1ml)$$

Anche per la **Boc-anidride** (PM 265,31) sono necessari 2eq. ovvero 9,68mmol:

$$0,00968mol * 218,30 g/mol = 2,12g$$



Infine la **resa** della reazione.

$$1,12g / 265,31g/mol = 0,00422 mol \rightarrow 4,22 mmol \text{ di Boh-Phe}$$

$$4,22mmol \text{ (ottenute)} / 4,84 mmol \text{ (teoriche)} = 87,2\%$$

## Liberazione della Phe-etilestere

Il secondo amminoacido da far reagire è l'etil-estere della fenilalanina. Esso è disponibile come cloridrato e pertanto va liberato basificando ed estraendolo.

*(Per questa parte procedo con il mio compagno di banco che è rimasto senza cloridrato perché era finito.)*

1,2g di fenilalanina etilestere cloridrato sono sciolti in acqua (20 ml ca.) e basificati con una soluzione di bicarbonato di sodio al 5% (5g in 100ml) fino a pH 8 (da cartina indicatrice, necessari 15ml).

La soluzione è quindi posta in imbuto separatore dove **l'ammina è estratta** con acetato d'etile (3 aliquote da 10 ml). La **TLC** conferma la completa estrazione dell'ammina.

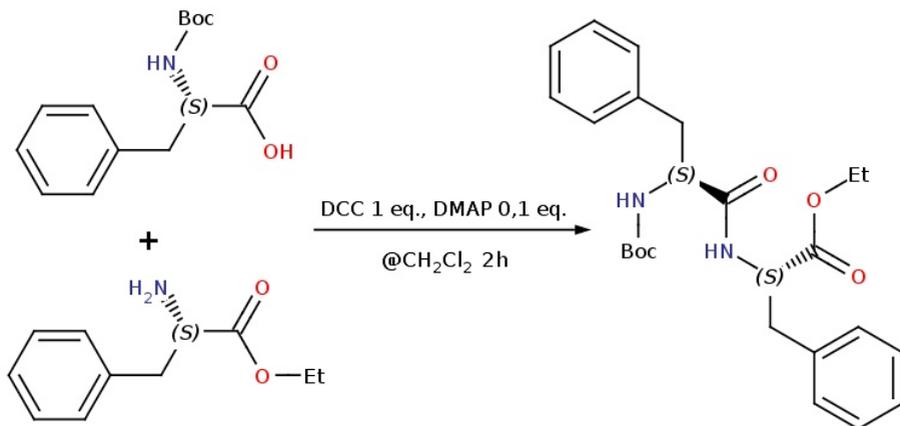
La **fase organica** è quindi anidrificata su sodio solfato, **tirata a secco** in rotavapor e seccata ulteriormente alla pompa meccanica.

Si ottengono 0,87g di un liquido giallognolo e denso.

I P.M. del cloridrato e dell'ammina libera sono, rispettivamente, 229,70 e 193,24. Pertanto ricavo la **resa** della reazione:

$$0,87\text{ g} / 193,24\text{ g/mol} = 0,0045\text{ mol} \rightarrow 4,5\text{ mmol}$$

## Formazione del legame peptidico



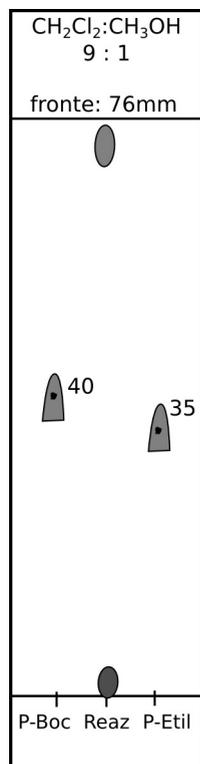
Poiché è stato necessario dividere la fenilalanina etilestere tra più persone esso è diventato il reagente limitante e si sono fatti i calcoli sulla quantità disponibile di quest'ultima.

Phe-etilestere  $\rightarrow$  0,44 g  $\rightarrow$   
2,28mmol (P.M. 193,24)

Pertanto dovrò farla reagire equimolarmente con la Boc-Phe, ovvero:

Boc-Phe  $\rightarrow$  2,28mmol  $\rightarrow$  0,60g (P.M. 265,31)

Aggiungo la **fenilalanina etilestere** pesata nel pallone dove ho rimosso **Boc-Phe** in eccesso fino ad averne 0,44g. Scioglio il tutto in

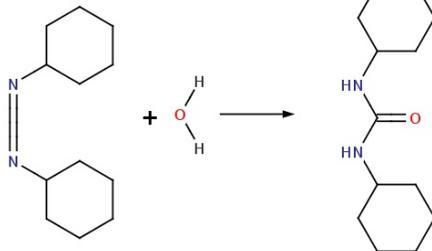


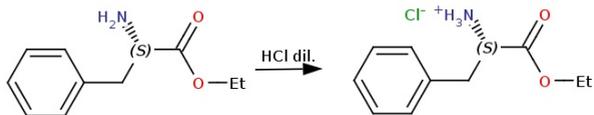
diclorometano e metto sotto agitazione. Aggiungo quindi 1 eq. (0,47g) di **DCC** (dicicloesilcarbodiimide) e 0,1 eq. (0,0027  $\approx$  0,03g) di **DMAP**. Nella miscela di reazione osservo la formazione di un precipitato bianco di dicicloesilurea, prodotto di addizione di H<sub>2</sub>O della DCC formatosi come sottoprodotto della reazione. Dopo due ore effettuo una **TLC** per controllare il **completamento** della **reazione** (P-Boc = Boc-fenilalanina, Reaz = miscela di reazione, P-etil = fenilalanina-etilestere). Nella miscela di reazione si distinguono il DMAP (polare, non corre: è la macchia al palo) ed il dipeptide formatosi (meno polare degli aminoacidi liberi, corre più degli altri).

**Rimuovo** la **dicicloesilurea** (presente come precipitato dopo l'azione di DCC come agente condensante attivatore del carbonile per permettere la formazione del legame peptidico) per **filtrazione** con filtro a pieghe.

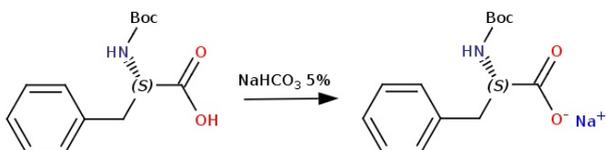
La soluzione è posta nell'imbuto separatore e lavata tre volte:

- il primo lavaggio, con **HCl** diluito (20ml), trasforma la fenilalanina





**etilestere** non reagita che dovesse essere presente nel suo **cloridrato**, polare, che è quindi lavato via nella fase acquosa.



- Il secondo lavaggio con una soluzione al 5% di **bicarbonato** sodico (5g/100ml, ne uso 20ml) serve a **salificare**, ottenendone l'anione, il carbossile della **Boc-Phe** eventualmente non reagita.

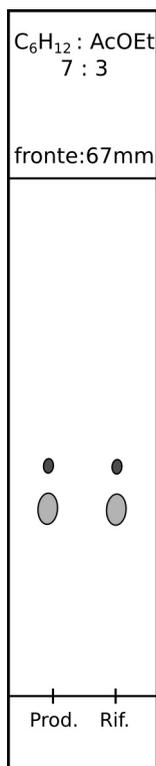
- Il terzo lavaggio con una soluzione satura di **NaCl** (salamoia) per aumentare la forza ionica della fase acquosa e quindi diminuire la solubilità del dipeptide in quest'ultima

Si effettua quindi una **TLC** di controllo sul dipeptide (Prod. = dipeptide prodotto, Rif. = dipeptide riferimento).

Anidrifico infine la fase organica risultante su sodio solfato anidro, filtro e tiro a secco con il **rotavapor**, dove ottengo un olio denso, 0,56g. Dopo aver conservato in Eppendorf un riferimento del grezzo da seminare nelle TLC di sviluppo della colonna procedo alla **purificazione in colonna cromatografica**.

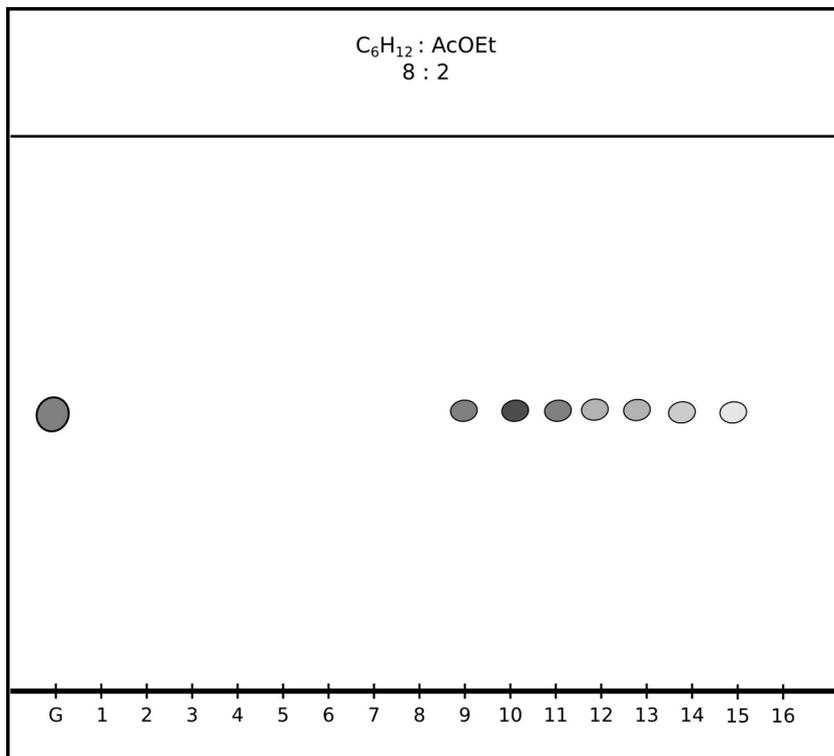
### **Purificazione in colonna**

Il primo passaggio è la preparazione del **polverino**: il dipeptide è sciolto in diclorometano ( $\approx 10\text{ml}$ ) e se ne aggiunge il doppio in massa i gel di silice (1,1g). La miscela è tirata a secco al rotavapor fino ad ottenimento



di una polvere bianca che sarà quella che sarà caricata come campione in colonna.

Poiché per la TLC ho usato come miscela eluente cicloesano:acetato

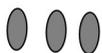


7:3 la miscela eluente per la colonna sarà in rapporto di 8:2. Con questa sospendo 15g di gel di **silice** che carico in colonna come **fase stazionaria**.

La preparazione della colonna è uguale a quella dell'eugenolo. Procedo quindi con lo sviluppo campionando ogni 4 provette (5 semine considerando il riferimento). Il dipeptide inizia ad eluire all'ottava e termina alla quindicesima, **unisco** gli estratti **organici** delle provette in cui è presente (9-15, particolarmente utile in questo caso la camera allo iodio in cui si colora il dipeptide ma non le impurezze) e secco al **rotavapor** dove ottengo come prodotto finale una polvere bianca, 0,51g.

C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>: AcOEt  
7 : 3

fronte: 67mm



Boc Et. std D Grez.

La **resa** della **purificazione** in colonna, pertanto, è del 91% (0,51g / 0,56g).

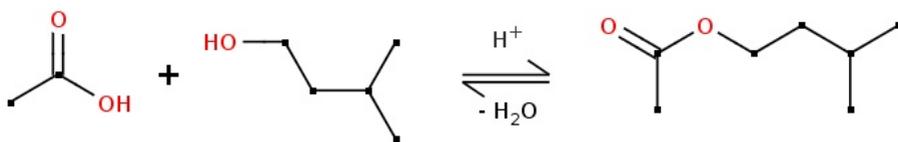
Effettuo la **TLC finale** di confronto tra i reagenti, il grezzo ed il purificato (Boc = Boc-Phe, Et. = Boc-etilestere, std = dipeptide riferimento, D = dipeptide colonna, Grez = grezzo).

La **resa** complessiva della formazione del legame peptidico (P.M. dipeptide 440,53), rispetto al prodotto purificato è:

$$0,51\text{g} / 440,53\text{ g/mol} = 0,00112\text{mol} \rightarrow 1,12\text{ mmol}$$

$$1,12\text{mmol} / 2,28 = 41\%$$

# Esercitazione sintetica: sintesi dell'aroma di banana



L'acetato di isopentile è una molecola organica dal caratteristico aroma di banana; in quanto tale viene impiegata come additivo alimentare.

In questa esperienza di laboratorio l'acetato di isopentile è sintetizzato per esterificazione con acido acetico dell'alcool isopentilico. Le esterificazioni sono reazioni di equilibrio, in questo caso l'equilibrio è stato spostato verso i prodotti con un eccesso di acido acetico (il più economico e facilmente eliminabile dal prodotto dei due reagenti).

## Procedimento

In un pallone da 100ml a tre colli pongo 15ml di alcool isopentilico e 20ml di acido acetico glaciale. Sotto agitazione magnetica gocciolo 4ml di acido solforico concentrato che rende l'ambiente di reazione acido catalizzando la reazione.

Al termine dell'aggiunta si scalda a refluxo con termomanto per un'ora. Dopodiché la miscela di reazione è lasciata raffreddare prima di essere posta in un imbuto separatore dove viene lavata.

Il primo lavaggio, con 15ml di acqua, rimuove l'acido acetico non reagito.

Il secondo lavaggio, con 15ml di soluzione di **bicarbonato** di sodio al 5%, tampona gli eventuali residui di acido acetico nella fase organica. Si osserva lo sviluppo di bolle prodotte dall'equilibrio tra acido carbonico e CO<sub>2</sub> in seguito alla protonazione del bicarbonato.

Il terzo lavaggio con **acqua** rimuove le tracce di carbonati residue dalla fase organica dal lavaggio precedente.

L'ultimo lavaggio con una **soluzione satura** di **NaCl** (salamoia) diminuisce la solubilità dell'acetato di isopentile nella fase acquosa e la aumenta in quella organica.

La fase organica ottenuta è anidrificata con **sodio solfato** che viene poi filtrato via su filtro a pieghe.

Ne ottengo a questo punto 11,34g,

Il prodotto è, infine, purificato per distillazione.

## Distillazione acetato di isopentile

Trasferisco il filtrato in un pallone da 100ml dove ho aggiunto 2 ebollitori. Collego al **Claisen** e scaldo con il termomanto per iniziare la distillazione, controllando con il termometro la temperatura dei vapori. La distillazione è nel pieno pertanto il prodotto è atteso intorno al suo p.f. ovvero tra 134° e 143° C.

Prima dei 134°C raccolgo solo **poche** gocce di **teste** (0,06g), da **135°** inizia a gocciolare il prodotto che continuo a raccogliere fino alla temperatura di 142°C quando nella camera restano solo dei residui carbonizzati e la temperatura accenna a risalire.

Nel pallone del prodotto sono raccolti 8,63g di acetato di isopentile.

Il prodotto è un **olio trasparente** dall'intenso aroma di banana.

Nel calcolo della **resa** tengo conto dell'alcool isopentilico che è il reagente limitante (0,138 mol).

$$8,63\text{g} / 130,19\text{ g/mol} = 0,066\text{mol}$$

$$0,066\text{ mol} / 0,138\text{ mol} \rightarrow 48\%$$

La resa è inficiata dalla perdita di parte della fase organica nei 4 lavaggi.

