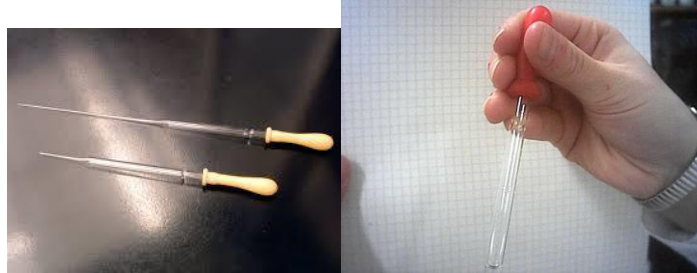


## Analisi dei Farmaci I – I modulo

### Manuale di utilizzo di alcune apparecchiature fornite

#### Pipette

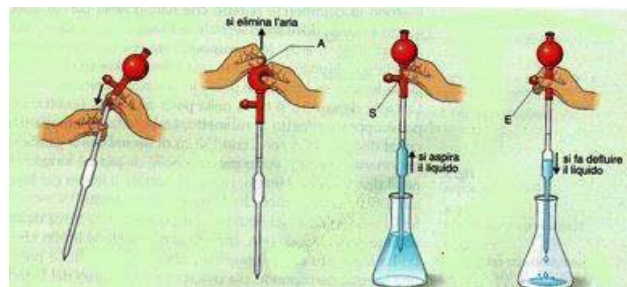
Si usano due tipi di pipette per l'aggiunta e/o la misura di liquidi. In ogni caso non è corretto tenere una pipetta rivolta verso l'alto perché il liquido contenuto può inquinare anche irreversibilmente il sistema di aspirazione.



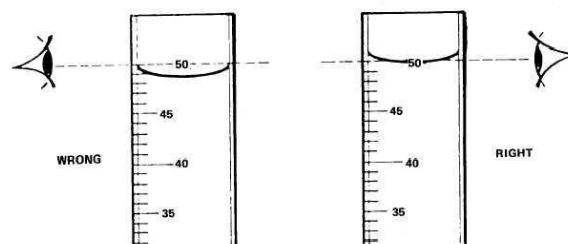
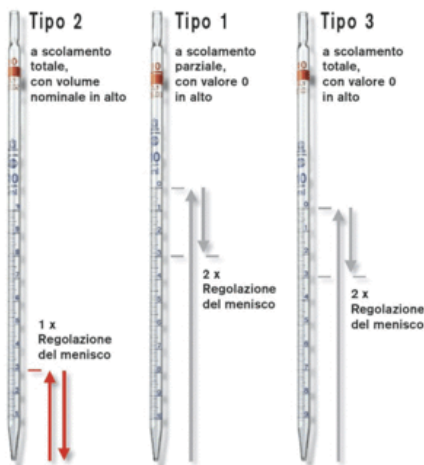
- Le pipette Pasteur si usano solo per trasferimenti non quantitativi.



- Le pipette graduate si usano per la misura e la dispensazione di volumi precisi di liquidi; esse portano sempre l'indicazione del volume complessivo, delle divisioni di tale volume, della classe e della temperatura di esercizio. Devono sempre essere usate solo con la propipetta in gomma, accertandosi che almeno l'ultimo tratto della pipetta sia asciutto prima di inserire la propipetta stessa. Non inserire un tratto troppo lungo di vetro e non applicare troppa forza!



Dalla propipetta si elimina l'aria sempre e solo dalla valvola superiore **A**. Si aspira il liquido tramite la valvola inferiore **S** fino ad arrivare alla tacca dello zero; si dispensa il liquido premendo sulla valvola laterale **E** fino al volume desiderato. Attenzione ad *evitare* che il liquido salga dentro la propipetta!



Misure volumetriche approssimate possono essere fatte con i cilindri graduati.

***pH-metri:***

Per tutti i pH-metri la sequenza operativa è:

- liberare l'elettrodo dal cappuccio protettivo contenente la soluzione di KCl e lavarlo con acqua distillata. Eliminare le gocce residue con carta assorbente;
- lavare ed asciugare l'elettrodo e quindi immergerlo nella soluzione in analisi: il bulbo deve essere interamente sommerso. Se si utilizza l'agitatore magnetico occorre fare attenzione che l'ancoretta magnetica non urti l'elettrodo.
- avviare l'agitatore ed effettuare la lettura dopo l'eventuale deriva (attendere la stabilizzazione);
- al termine lavare l'elettrodo e riporre il cappuccio con la soluzione di conservazione. Non lasciare l'elettrodo a secco.

**Cappe aspiranti**

Le cappe aspiranti lavorano al massimo della loro efficienza con il vetro abbassato oltre i 2/3! Controllare sempre che il motore della cappa sia in funzione.

**Centrifuga**

La centrifuga deve essere sempre bilanciata, quindi disporre sempre le provette, contenenti la stessa quantità di soluzione, sempre l'una di fronte all'altra.

**A fine giornata**

Lavare attentamente tutta la vetreria e fare un ultimo risciacquo con acqua distillata.

Cancellare tutte le scritte fatte sulla vetreria con un pezzetto di carta imbevuto di Alcool.

## ESERCITAZIONI DI LABORATORIO

Il laboratorio durerà 4 giorni, ogni giorno farete una o due esercitazioni diverse tra quelle sotto elencate:

1. separazione di una miscela di cationi ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) (mezza giornata);
2. estrazione, cristallizzazione e filtrazione di una miscela di farmaci organici (menadione, acido benzoico) (una giornata);
3. saggi di riconoscimento di farmaci inorganici: inizierete con il saggio di riconoscimento di farmaci noti per poi passare ad analizzare gli 8 farmaci incogniti che vi sono stati consegnati (una giornata o più);
4. separazione degli ioni presenti in una miscela di due farmaci inorganici noti, per poi passare all'analisi di una miscela di due farmaci inorganici incogniti con relativa separazione (una giornata).



Una delle esercitazioni che effettueremo in laboratorio è la separazione di cationi metallici basata sulla loro precipitazione selettiva. In particolare, seguiremo una metodica che ci consentirà di separare quantitativamente i cationi  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ .

Iniziate con il pesare alla bilancia tecnica tre sali contenenti i tre cationi metallici sopracitati; effettuerete la pesata mettendo un foglietto di carta sul piattello della bilancia, avendo cura che il foglietto sia di dimensioni inferiori al piattello stesso, per evitare che le correnti d'aria presenti in laboratorio facciano oscillare eccessivamente il valore visualizzato sul display della bilancia.

- bario cloruro biidrato (200 mg; PM 244.26)
- ferro(III) cloruro esaidrato (200 mg; PM 270.30)
- rame(II) acetato biidrato (200 mg; PM 199.65)

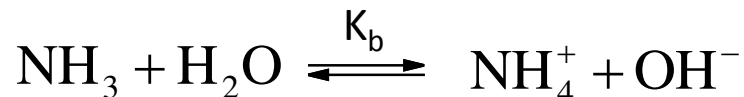
Una volta effettuate le pesate, trasferite quantitativamente i tre sali in una beutina da 50 mL e scioglieteli in 5 mL di acqua deionizzata. Come avrete notato al momento della pesata, il solido con cristalli di dimensioni maggiori è il rame(II) acetato biidrato; per facilitarne la dissoluzione potete romperli con cautela con la bacchetta di vetro (attenzione a non spaccare la beutina!).

A dissoluzione completa, trasferite la soluzione in due tubi da centrifuga utilizzando una pipetta; fate attenzione che il volume sia lo stesso nelle due provette (è importante che il peso dei due tubi sia bilanciato in modo da non rischiare di danneggiare la centrifuga).





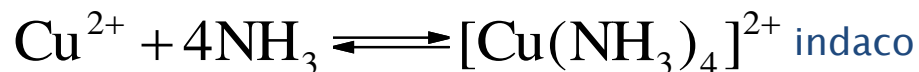
Inizialmente precipiterete  $\text{Fe}^{3+}$  come idrossido. Come reattivo precipitante utilizzeremo l'ammoniaca diluita ( $\text{NH}_3$  2 N, reagentario comune; 2.5 mL per ciascun tubo da centrifuga), che ha un'idrolisi basica:



Aggiungete l'ammoniaca in ciascun tubo da saggio goccia a goccia: inizialmente osserverete la precipitazione simultanea di  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  (bruno) e  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  (blu), entrambi idrossidi poco solubili in acqua:



Proseguendo nell'aggiunta, a mano a mano che la concentrazione di  $\text{NH}_3$  in soluzione aumenta osserverete la ridissoluzione del rame sotto forma di un **complesso** color indaco, mentre sul fondo del tubo da centrifuga rimane un residuo insolubile bruno di  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ . Terminata l'aggiunta, agitate delicatamente con una bacchetta di vetro.





Centrifugate i due tubi da saggio per 7 minuti a una velocità 6-7. Al termine della centrifugazione, decantate il surnatante in altri due tubi da centrifuga, aiutandovi con una pipetta per aspirare l'ultima goccia. Lavate quindi il precipitato di ciascun tubo con 1 mL di  $\text{NH}_3$  2N, risospendendo con una bacchetta di vetro e poi centrifugando nuovamente per 5 minuti. Unite il surnatante a quello raccolto in precedenza, badando a mantenere volumi identici nei due tubi. Lavate una seconda volta utilizzando 1 mL di  $\text{NH}_3$  2N centrifugate ed unite il surnatante. Quindi lavate con 1 mL di acqua deionizzata centrifugate ed eliminate il surnatante.

Al termine dell'operazione i vostri 4 tubi da centrifuga dovrebbero presentarsi così:



tubi da centrifuga  
con ppt di  $\text{Fe}(\text{OH})_3$



tubi da centrifuga  
con soluzione di  
 $\text{Ba}^{2+}$  e  $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$

Mentre aspettate che la centrifuga abbia fatto il suo dovere, calcolate la quantità minima necessaria di  $\text{NH}_3$  (in moli) per precipitare completamente lo ione ferro(III) e complessare quantitativamente lo ione rame(II). Alla luce di questo calcolo, siete in grado di verificare se l'aggiunta di  $\text{NH}_3$  2 N che avete effettuato sia sufficiente ad assolvere entrambi i compiti?

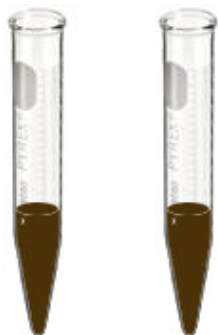




Ora pesate 300 mg di sodio solfato (PM 142.04) e scioglieteli in 3 mL di acqua; quindi aggiungete 1.5 mL di questa soluzione a ciascuno dei due tubi da centrifuga contenenti la soluzione di color indaco; dovrete osservare la precipitazione di un solido bianco:



Ora centrifugate per 5 minuti, decantate il surnatante dei due tubi da centrifuga in un unico beaker da 100 mL. Lavate quindi per due volte il precipitato di ciascun tubo con 1 mL di acqua deionizzata per volta, risospesando con una bacchetta di vetro e poi centrifugando nuovamente per 5 minuti. Unite il surnatante a quello raccolto in precedenza nel beaker. Ora la situazione dovrebbe essere questa:



tubi da centrifuga  
con ppt di  $\text{Fe}(\text{OH})_3$



tubi da centrifuga  
con ppt di  $\text{BaSO}_4$

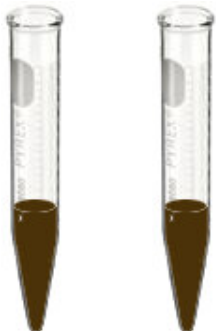
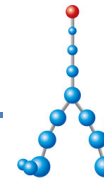


beaker con soluzione  
di  $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$

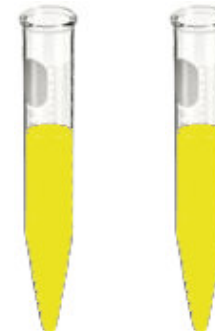
Mentre aspettate che la centrifuga abbia finito, calcolate la quantità minima di  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (in moli) necessaria per precipitare lo ione bario.

Alla luce di questo calcolo, verificate se l'aggiunta di 300 mg di  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  sia stata sufficiente a precipitare quantitativamente il bario.



tubi da centrifuga  
con ppt di  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 

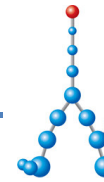
Per verificare indicativamente quanto bene siate riusciti a separare lo ione **ferro(III)** dallo ione **rame(II)** potete provare a ridisciogliere il precipitato di  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  aggiungendo 3 mL HCl 2 N in ciascun tubo da centrifuga; dovrete ottenere una soluzione giallo brillante di  $\text{FeCl}_3$ .



Se invece ottenete una soluzione di colore verdino, questo indica che il vostro precipitato di  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  era inquinato da ioni **rame(II)**, che in soluzione sono di colore azzurro. La somma della colorazione gialla di  $\text{FeCl}_3$  con la colorazione azzurra di  $\text{CuCl}_2$  vi fa percepire una colorazione verdina.

tubi da centrifuga  
con ppt di  $\text{BaSO}_4$ 

La purezza del precipitato di  $\text{BaSO}_4$  è più facile da valutare, dal momento che esso dovrebbe essere perfettamente bianco. Una colorazione giallo-marroncina o azzurrina indica un inquinamento da ioni **ferro(III)** e/o ioni **rame(II)**.



Ora mettete il beaker su una piastra riscaldante impostata a una temperatura di 250 °C, e ricordatevi di mettere una piccola bacchetta di vetro al suo interno in modo da regolarizzare l'ebollizione. Concentrate il volume della soluzione a circa 3-4 mL. Nel corso del riscaldamento osserverete che nel beaker il colore blu della soluzione scompare, mentre compare un precipitato nero di **rame(II) ossido**:



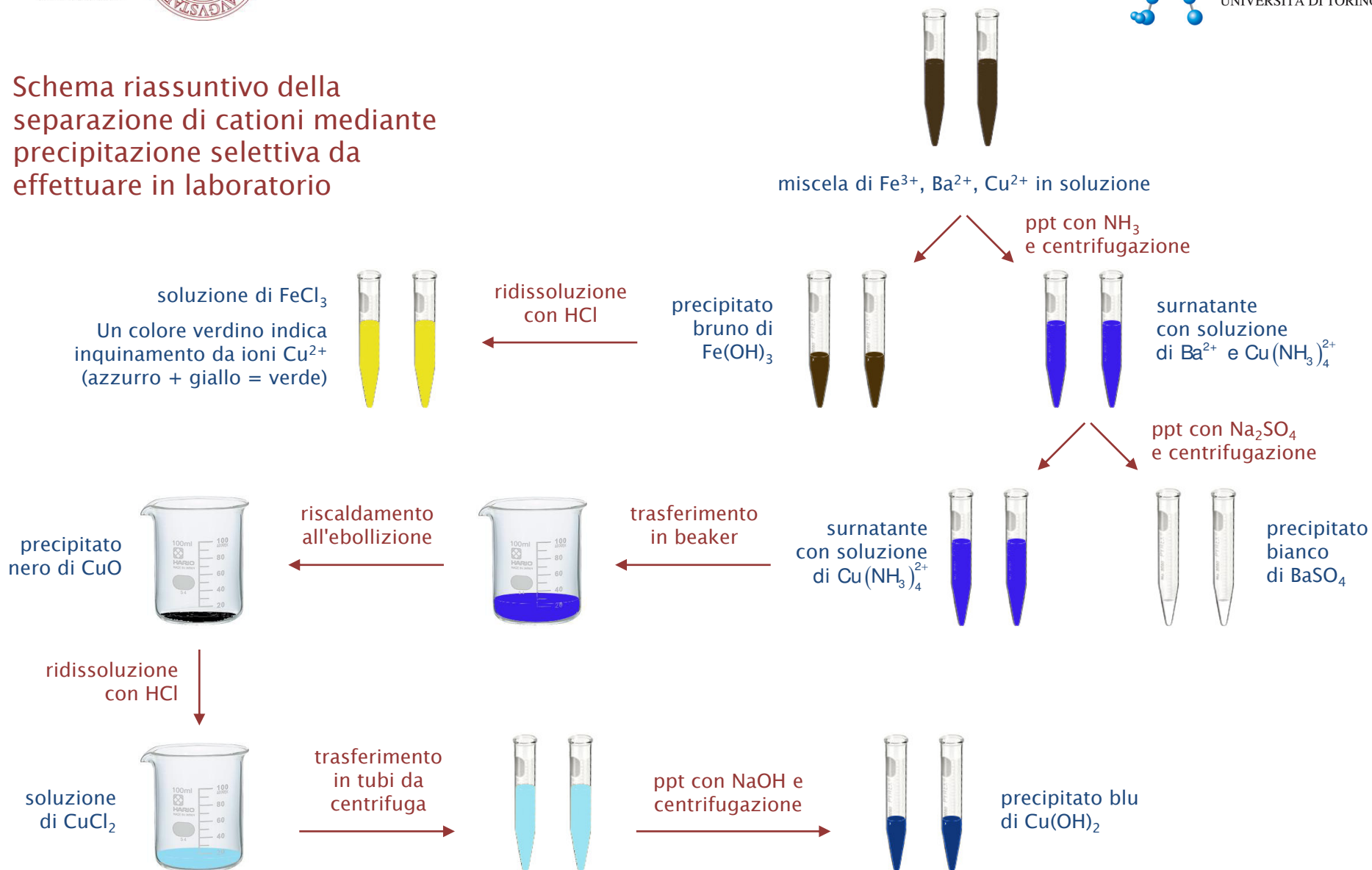
Il riscaldamento promuove l'allontanamento di ammoniaca in forma gassosa dalla soluzione, poiché in base alla legge di Henry la solubilità dei gas diminuisce all'aumentare della temperatura. Al termine dell'operazione, aggiungete 3 mL HCl 2 N al residuo, e aiutandovi con la bacchetta di vetro riuscirete a ridisciogliere completamente il residuo nero:



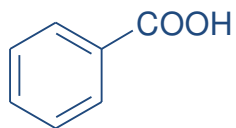
Ora trasferite la soluzione in due tubi da centrifuga (avendo cura di ottenere un uguale volume in ciascun tubo), e poi aggiungete a ciascun tubo 3 mL NaOH 2 N; vedrete comparire un precipitato blu di **Cu(OH)<sub>2</sub>**, che farete sedimentare centrifugando per 5 minuti. Lavate quindi per due volte il precipitato di ciascun tubo con 1 mL di acqua deionizzata per volta, risospesendo con una bacchetta di vetro e poi centrifugando nuovamente per 5 minuti.



Schema riassuntivo della  
separazione di cationi mediante  
precipitazione selettiva da  
effettuare in laboratorio

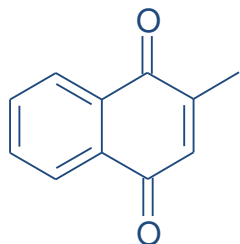


Una delle esercitazioni che effettueremo in laboratorio è proprio la separazione di farmaci organici con diverse proprietà acido base mediante estrazione con solvente. Partiremo da una miscela di due farmaci allo stato solido e dimostreremo che è possibile separarli mediante semplici estrazioni acido-base sfruttando il fatto che uno di loro ha proprietà acide e uno non ha apprezzabili proprietà acide né basiche. L'abbreviazione "mp" sta per *melting point* (punto di fusione).



### Acido benzoico

Il gruppo carbossilico dell'acido benzoico ha proprietà acide ( $K_a = 6.28 \cdot 10^{-5}$ ).  
Solido bianco cristallino, mp 121-124 °C.



### Menadione

Non ha gruppi funzionali dotati di apprezzabili proprietà acido-base.  
Polvere cristallina giallo-pallido, mp 105-108 °C.

Inizierete da una miscela dei due farmaci allo stato solido, ben omogeneizzata in mortaio:

- acido benzoico (800 mg)
- menadione (200 mg)

Tutti e due i farmaci sono caratterizzati da una bassa solubilità in acqua. Solubilizzeremo i farmaci in una miscela di:

- soluzione di NaOH 2 N (40 mL) contenente il 10% (*m/V*) di NaCl
- CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL).



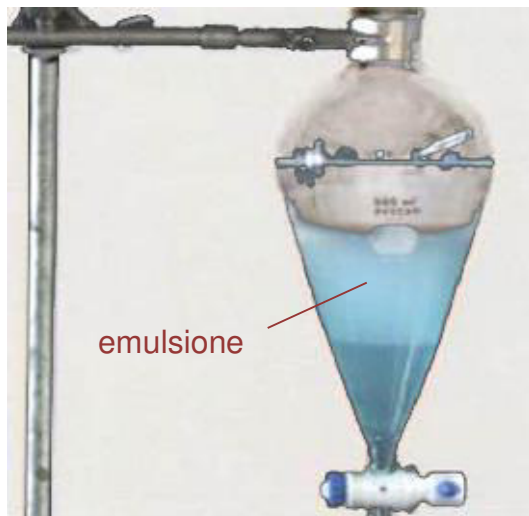
beuta da  
250 mL



cilindro  
graduato  
da 100 mL

La prima cosa da fare sarà pesare 4 g di NaCl e scioglierli nella beuta da 250 mL in 40 mL di NaOH 2 N, in modo da ottenere una soluzione 2 N di NaOH al 10% di NaCl. Trasferirete 20 mL di questa soluzione nel cilindro, e ai 20 mL rimasti nella beuta aggiungerete la miscela dei due farmaci e 30 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Siete già in grado di prevedere come si presenterà il contenuto della beuta? Avete capito perché abbiamo aggiunto NaCl alla soluzione basica?



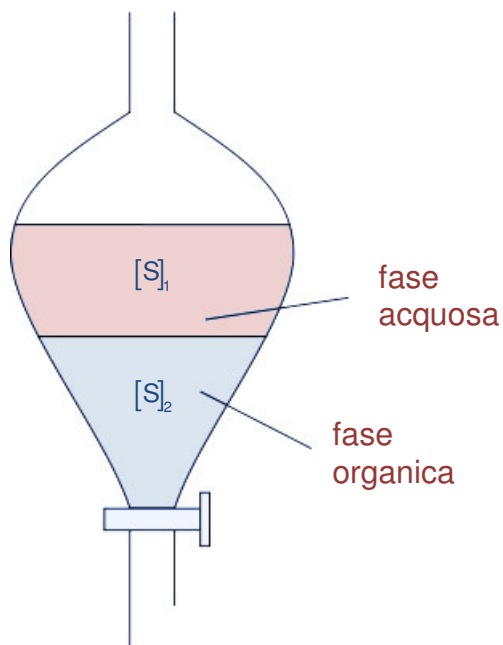
Nell'effettuare un'estrazione in imbuto separatore un inconveniente abbastanza comune è la formazione di **emulsioni** tra la fase acquosa e quella organica.

Le emulsioni sono dovute alla presenza di sostanze **surfactanti** (che abbassano la tensione superficiale) all'interfaccia tra le due fasi. Possono agire da surfactanti:

- molecole organiche ionizzate (e.g., sostanze acide quando la fase acquosa ha pH basico e viceversa); queste molecole hanno proprietà **anfifiliche**, ossia polari (in corrispondenza del gruppo ionizzato) e apolari (in corrispondenza della porzione carboniosa non ionizzata) contemporaneamente

nella stessa struttura. Disponendo la propria porzione apolare verso il solvente organico e quella polare verso la fase acquosa favoriscono la dispersione di una fase nell'altra, stabilizzando l'emulsione. Un modo per risolvere questo tipo di emulsioni è quello di aumentare la **forza ionica** della fase acquosa aggiungendo un sale inerte (e.g., NaCl) in modo da ridurre la solubilità della fase organica in quella acquosa e favorire la separazione tra le due fasi

- sostanze finemente polverizzate insolubili in entrambe le fasi che, posizionandosi all'interfaccia tra le goccioline di ciascuna fase, ne impediscono la coalescenza. Per risolvere questo tipo di emulsioni il modo migliore è filtrare la miscela bifasica, preferibilmente a pressione ridotta su un letto di materiale inerte (e.g., terra di diatomee) per evitare di intasare un filtro di cellulosa, prima di trasferirla nell'imbuto separatore



beaker da  
250 mL

Trasferirete il contenuto della beuta nell'imbuto separatore (fissato a uno stativo mediante un anello di ferro). Tapperete l'imbuto con un tappo in PET o in PTFE (Teflon<sup>®</sup>), quindi girerete l'imbuto con la coda verso l'alto, **mantenendo saldamente tappato l'imbuto** con il palmo di una mano, e aprirete il rubinetto in modo da sfiatare i vapori di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , mentre farete ruotare dolcemente l'imbuto, senza dibattere.

Dopo qualche secondo potrete richiudere il rubinetto, impugnare l'imbuto con due mani sempre mantenendo saldamente tappato l'imbuto con una mano e dibattere **moderatamente** l'imbuto, quindi rivolgere nuovamente la coda verso l'alto e sfiatare i vapori. Successivamente richiederete il rubinetto, riposizionerete l'imbuto sullo stativo e scaricherete la fase inferiore ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) nella beuta usata precedentemente, e verserete la fase superiore (acqua) in un beaker da 100 mL.

Verserete quindi nuovamente la fase organica nell'imbuto separatore e estrarrete altre due volte la fase organica con 10 mL per volta della soluzione basica che avete conservato nel cilindro graduato, unendo le fasi acquose nel beaker usato in precedenza. Infine, trasferite la fase acquosa riunita nel beaker e lavatela 3 volte con 5 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  per volta, riunendo le fasi organiche nella beuta.

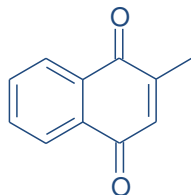
Che cosa c'è in fase acquosa? E in fase organica?



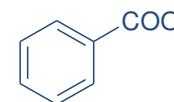
Infine, rimettete nell'imbuto separatore la fase organica riunita e lavatela con 10 mL di **soluzione satura di NaCl** (*brine*).



fase organica  
(menadione)

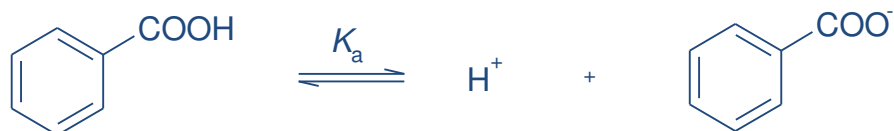


fase acquosa basica  
(sodio benzoato)





Per riottenere acido benzoico dal suo sale di cui disponiamo nella soluzione acquosa basica, dovremo far retrocedere l'equilibrio di associazione e dissociazione, sfruttando il principio di Le Châtelier:



Acidificando la soluzione di sodio benzoato l'equilibrio di dissociazione dell'acido benzoico retrocederà spostandosi verso l'acido benzoico **indissociato**, poco solubile in acqua a freddo, che quindi si separerà dalla soluzione come **precipitato**.

Il prodotto potrà quindi essere isolati per **filtrazione a pressione ridotta**.



Sposterete l'acido libero dal suo sale utilizzando **HCl 37%**, un acido forte concentrato, da maneggiare con cautela. Utilizzerete un acido concentrato per evitare di aumentare eccessivamente il volume della fase acquosa; questo perché la solubilità in acqua dell'acido benzoico a 25 °C è circa **0.3 g/100 mL**, ossia bassa ma non bassissima. Se portaste il volume a 50-100 mL acidificando con un acido diluito rischiereste di perdere una frazione consistente di acido benzoico in soluzione, o addirittura di non osservare alcuna precipitazione.

Aggiungerete l'acido una pipettata alla volta mescolando bene con la bacchetta di vetro finché non osserverete la comparsa di un precipitato bianco persistente; a questo punto verificherete con la cartina universale che il pH sia nettamente acido e poi filtrerete il precipitato grezzo alla pompa, lavandolo con acqua deionizzata per rimuovere le tracce di HCl dal solido.



Per isolare il menadione dai suoi estratti organici dovrete invece evaporare il solvente, ma prima di farlo dovrete assicurarvi di avere **anidrificato** gli estratti. Quando si effettua una ripartizione tra fasi immiscibili, ciascuna fase si satura dell'altra; nel nostro caso, la fase diclorometano si satura di acqua, e viceversa.

Le tracce di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  che rimangono in fase acquosa non costituiscono un grosso problema: si tratta infatti di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  virtualmente puro, dal momento che gli estratti acquosi sono stati lavati tre volte con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  fresco prima di precipitare acido e base liberi.

Le tracce di fase acquosa in fase organica normalmente sono indesiderabili. Il motivo per cui è stato fatto un ultimo lavaggio della fase organica riunita con soluzione satura di NaCl ha due scopi:

- rompere eventuali emulsioni formatesi durante l'estrazione e rimaste in parte in fase organica
- ridurre al minimo la frazione di acqua che si ripartisce in fase organica, dal momento che la fase ad elevata forza ionica si ripartisce pochissimo nel solvente meno polare

Di conseguenza, la pochissima acqua che si trova in fase organica dopo lavaggio con *brine* è molto ricca di NaCl, ed evaporando a pressione ridotta potrebbe inquinare il prodotto di estrazione. Per anidrificare completamente la fase organica ed eliminare ogni traccia di sali precedentemente disciolti in fase acquosa conviene quindi aggiungere un cucchiaino raso di un **agente anidrificante**, come  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  o  $\text{MgSO}_4$  anidro, lasciare riposare qualche minuto agitando occasionalmente la beuta, e quindi filtrare per gravità su filtro a pieghe dentro un pallone da 250 mL. Porterete quindi a secchezza il solvente al rotavapor.



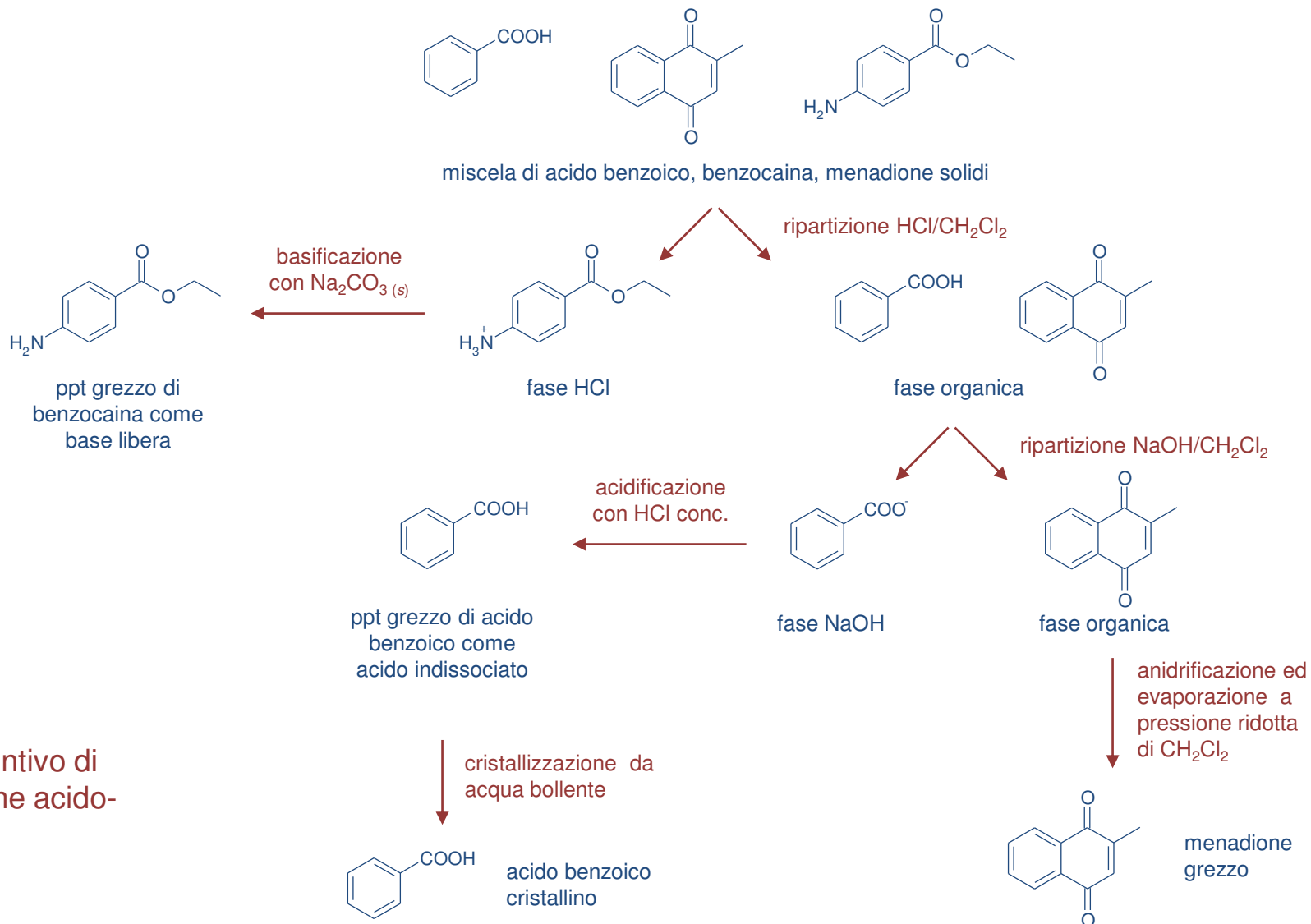
Dopo aver isolato per filtrazione l'acido benzoico dalla fase acquosa acida, per purificarlo effettuerete una **crystallizzazione** da acqua bollente. A questo scopo trasferirete l'acido benzoico grezzo che avete sull'imbuto Hirsch o Büchner in una beutina da 100 mL, coprirete il solido con acqua deionizzata (circa 10-20 mL) e porterete con cautela all'ebollizione su piastra riscaldante, ricordando di inserire nella beutina una bacchetta di vetro in modo da regolarizzare l'ebollizione.

A dissoluzione completa, lascerete riposare le acque madri, dalle quali per raffreddamento dopo qualche minuto inizieranno a separarsi dei cristalli aghiformi bianchi di acido benzoico.

Una volta ultimata la cristallizzazione del prodotto potrete raccoglierlo su filtro, lavarlo con poca acqua deionizzata e lasciarlo seccare brevemente alla pompa mentre si trova ancora sull'imbuto Hirsch o Büchner.

Potrete invece recuperare il menadione grezzo dal pallone da cui avete evaporato il solvente al rotavapor grattandolo con una spatolina di metallo.

Trasferirete i due prodotti in beaker da 10 mL.



Schema riassuntivo di una separazione acido-base

Se è possibile recuperare una sostanza contenuta in una soluzione evaporando il solvente, si usa il rotavapor.

### Modo di operare:

- impostare la T del bagno termostatico
- collegare il pallone con il liquido da evaporare ed assicurarlo con l'apposita pinza
- immergere il pallone nel bagno
- iniziare lentamente la rotazione
- azionare il vuoto
- azionare il refrigerante

