

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Иркутский национальный исследовательский технический университет

Кафедра Химии и биотехнологии имени В.В. Тутуриной

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по организации и проведению лабораторных работ
по дисциплине

БИОИНЖЕНЕРИЯ

Направление подготовки:	19.04.01 «Биотехнология»
Программа:	«Технология биологически активных веществ»
Квалификация	магистр
Составитель методических указаний:	Протопопова М.В., доцент, к.б.н.

Иркутск
2026 г.

Биоинженерия: методические указания по организации и проведению лабораторных работ для направления 19.04.01 «Биотехнология», магистерская программа «Технология биологически активных веществ», Составитель: Протопопова М.В. 2026, - 40 с. Электронный вариант

Методические указания составлены в соответствии с учебным планом и рабочей программой дисциплины «Биоинженерия» и предназначены для магистрантов очной формы обучения по направлению подготовки 19.04.01 – Биотехнология.

Лабораторные работы являются одним из видов практического обучения, целью которых является закрепление теоретических знаний в области генетической и клеточной инженерии, приобретение и развитие практических навыков в использовании методов молекулярно-генетического анализа, навыков работы с научно-техническими протоколами и технической документацией к современному оборудованию, навыков планирования и проведения экспериментальных работ и анализа полученных результатов, навыков подготовки научно-технических отчетов и документации.

Общий план выполнения лабораторных работ:

1. Ознакомиться с теоретическим введением. Ознакомление может осуществляться также в форме научной дискуссии с преподавателем.
2. Ознакомиться с методикой и последовательностью выполнения работы.
3. Выполнить требуемые расчеты, заполнить таблицы привести схемы процессов. Для расчетов использовать инструкцию к реактивам, а также другой методический раздаточный материал, предоставляемый преподавателем.
4. Проанализировать результаты и сделать выводы, ответить на контрольные вопросы (при наличии).
5. Оформить отчет в установленный преподавателем срок в соответствии с выставленными требованиями.

ПРАВИЛА РАБОТЫ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

Общие правила выполнения лабораторных работ

При выполнении лабораторных работ необходимо строго соблюдать следующие правила:

1. Ключ к успеху в практической работе - думайте, прежде чем делать. Поэтому сначала познакомьтесь с ходом выполнения лабораторной работы, отчетливо уясните цели и задачи работы, обдумайте каждое действие.
2. Необходимо знать основные свойства используемых и получаемых веществ, их действие на организм, правила работы с ними, на основе этого принять все меры для безопасности проведения работ.
3. Запрещается проводить опыты в грязной посуде, а также пользоваться для проведения опытов веществами из склянок без этикеток или с неразборчивой надписью.
4. Нельзя выливать избыток реактива обратно в реактивную склянку. Сухие соли набирать чистым шпателем или ложечкой.
5. Не следует путать пробки от разных склянок. Чтобы внутренняя сторона пробки оставалась чистой, пробку кладут на стол внешней поверхностью.
6. Нельзя уносить реактивы общего пользования на свое рабочее место.
7. Дорогостоящие реактивы (например, остатки солей серебра) собирают в специально отведенную посуду. Нельзя выливать в раковину остатки растворителей, горючих веществ, реакционные смеси, растворы кислот, щелочей и других вредных веществ. Они должны собираться в специальную посуду.

8. Все твердые отходы следует выбрасывать в урну.
9. Старайтесь бережно расходовать реактивы, электричество и воду. Нельзя оставлять без надобности включенные электроприборы и горящие спиртовки. По окончании работ нужно немедленно отключить электроприборы.
10. Выполнение лабораторной работы и каждого отдельного опыта требует строгого соблюдения всех указаний, содержащихся в описании работы. Опыт должен исполняться тщательно, аккуратно и без спешки.
11. Категорически запрещается без разрешения преподавателя проводить какие-либо опыты, не относящиеся к данной работе, или изменять порядок проведения опыта.
12. Если работа не может быть закончена в течение одного занятия, то необходимо заранее обсудить с преподавателем, на каком этапе работа должна быть прервана и когда можно будет ее закончить.
13. Перед уходом из лаборатории тщательно мойте руки.
14. По окончании работы полученный продукт сдать преподавателю.

Правила техники безопасности при работе в лаборатории

При работе в химической лаборатории следует помнить следующее:

1. Необходимо соблюдать правила техники безопасности, быть чистоплотным и аккуратным в работе:
 - а) не принимать пищу в лаборатории, не трогать руками лицо и глаза, не пробовать на вкус химические вещества, не наклоняться над реагирующей смесью;
 - б) работать только на лабораторном столе, все работы с ядовитыми и сильно пахнущими веществами, с концентрированными растворами кислот, щелочей, а также упаривание их растворов следует проводить только в вытяжном шкафу.
2. Измельчение твердых веществ, дающих едкую пыль (щелочей, извести, йода и др.), разбавление концентрированных кислот и щелочей, приготовление хромовой смеси и т.п. нужно проводить в фарфоровой посуде в вытяжном шкафу, защитив глаза очками, а руки перчатками.
3. Разбавляя концентрированные кислоты, особенно серную, осторожно вливать кислоту в воду.
4. С легковоспламеняющимися жидкостями нельзя работать вблизи нагревательных приборов. Запрещается нагревать летучие легковоспламеняющиеся жидкости, вещества (эфир, бензины, спирты, ацетон и т.д.) на открытом пламени. Для этого необходимо использовать водяную или масляную баню.
5. При смешивании двух жидкостей жидкость с большей плотностью приливается к жидкости с меньшей.
6. Не пользоваться неисправными приборами, неподписанными реагентами, а также реагентами, не используемыми в данной работе.

7. Запрещается набирать ртом при помощи пипетки или трубки любые вещества. Для этого следует пользоваться сифоном или резиновой грушей.

8. Особенно внимательно нужно проводить сборку установок из стекла. При этом нельзя зажимать стеклянные изделия в лапки штативов без соответствующей мягкой прокладки. Особенно осторожно обращайтесь с тонкостенной посудой, термометрами и холодильниками.

9. Нельзя нагревать закупоренные аппараты и сосуды, кроме тех, которые специально для этого предназначены. Нельзя нагревать жидкости в толстостенной и мерной посуде.

10. Нельзя работать на влажной поверхности с щелочными металлами.

11. При промывании посуды следует предварительно включить воду и разбавить остатки продукта реакции.

12. Категорически запрещается оставлять действующие приборы без присмотра.

13. Нельзя класть на лабораторные столы посторонние предметы (сумки, шапки и др.), а также вешать в лаборатории верхнюю одежду.

14. О любом происшествии в лаборатории, даже самом незначительном, необходимо сообщить преподавателю или инженеру.

15. Не стесняйтесь спрашивать обо всем, в чем у вас есть сомнения!

Правила противопожарной безопасности

1. Осторожно обращайтесь с нагревательными приборами. Запрещается работать с неисправным оборудованием и приборами. Категорически запрещается использовать для подключения электроприборы с оголенными проводами или с поврежденной изоляцией.

2. При проведении опытов, в которых может произойти самовозгорание, имейте под руками асбестовое одеяло, песок, совок и т.п.

3. В случае воспламенения горючих веществ быстро выключите вентиляцию вытяжного шкафа, обесточьте электронагревательные приборы, уберите сосуды с огнеопасными веществами и приступите к тушению пожара:

а) горящие жидкости прикройте асбестом, а затем, если нужно, засыпьте песком, но не заливайте водой;

б) в случае воспламенения щелочных металлов гасите пламя только сухим песком, но не водой;

в) в случае возгорания одежды на человеке накрывайте его асбестовым одеялом;

г) небольшие локальные пожары тушите при помощи углекислотного огнетушителя, при большом задымлении используйте противогаз.

4. В случае пожара в лаборатории немедленно вызывайте пожарную команду по телефону «01» (за исключением воспламенения щелочных металлов), и, не ожидая прибытия пожарников, принимайте все меры к ликвидации

пожара собственными силами и имеющимися средствами. Студенты, не участвующие в тушении пожара, должны покинуть лабораторию.

Правила безопасной работы с легковоспламеняющимися жидкостями (ЛВЖ)

Органические растворители, особенно ЛВЖ – одни из главных источников опасности при работе в лаборатории, так как они легко воспламеняются, быстро горят и трудно гасятся. Пары многих органических жидкостей образуют с воздухом взрывоопасные смеси. В зависимости от температуры вспышки в открытом тигле ЛВЖ разделяются на три группы: особо опасные (температура вспышки до $-13\text{ }^{\circ}\text{C}$), постоянно опасные (от -13 до $27\text{ }^{\circ}\text{C}$) и опасные при повышенной температуре (от 27 до $66\text{ }^{\circ}\text{C}$). К первой группе относятся ацетон, бензин, гексан, диэтиламин, диэтиловый эфир, петролейный эфир, тетрагидрофуран; ко второй – метиловый, этиловый, изопропиловый и трет-бутиловый спирты, гептан, диоксан, дихлорэтан, пиридин, толуол, триэтиламин, этилацетат; к третьей – бензилхлорид, бутиловый спирт, диметилсульфат, уксусный ангидрид, хлорбензол, циклогексанол.

Необходимо выполнять следующие правила:

1. Нельзя держать эти растворители вблизи огня, в тёплом месте или вблизи нагревательных приборов.
2. Нельзя нагревать такие вещества на открытом огне, на сетке, вблизи огня или в открытых сосудах; для этой цели следует пользоваться водяной баней с обратным водяным холодильником.
3. Нельзя хранить ЛВЖ в тонкостенной посуде с закрытой пробкой.
4. Нельзя выливать их в раковину.
5. Нельзя держать на рабочем месте большие количества таких веществ.

Первая помощь при несчастных случаях

В лаборатории бывают случаи, требующие неотложной медицинской помощи: порезы рук стеклом, ожоги горячими предметами, кислотами, щелочами. Для оказания первой помощи в лаборатории имеется аптечка. В серьезных случаях необходимо пострадавшего сопроводить к врачу.

Основные правила первой помощи сводятся к следующему:

1. При мелких порезах стеклом удалите осколки из раны, смойте кровь, продезинфицируйте раствором йода и перевяжите бинтом.
2. При ожоге рук или лица реактивом смойте реактив большим количеством воды, затем в случае ожога щелочью – 1%-ным раствором уксусной кислоты, в случае ожога кислотой – 3%-ным раствором гидрокарбоната натрия, а затем – опять водой. Одежду, соприкасающуюся с реактивами, следует снять.
3. При ожоге горячей жидкостью или горячим предметом обожженное место промойте проточной холодной водой в течение 5-10 мин. Затем следует обратиться в ближайшее лечебное учреждение.
4. При попадании химического вещества в глаза их необходимо обильно промыть в течение 10-15 мин струей холодной воды так, чтобы она стекала от

носа к виску. Веки пораженного глаза во время промывания должны быть осторожно развернуты. Контактные линзы перед промыванием следует снять. Затем в любом случае пострадавшего незамедлительно доставить в глазную клинику.

5. При попадании яда внутрь необходимо вызвать рвоту принятием теплого раствора поваренной соли (3-4 чайные ложки на стакан воды) и затем надавить пальцем на заднюю часть зева, давая пострадавшему пить большое количество теплой воды. Если пострадавший потерял сознание или же отравление вызвано проглатыванием растворителя, кислоты или щелочи, то рвоту вызывать нельзя. Необходимо пострадавшего перенести на свежий воздух и оставить в спокойном положении в тепле и немедленно вызвать бригаду неотложной помощи.

6. При поражении электрическим током необходимо быстро освободить пострадавшего от действия тока путем отключения электроэнергии общим рубильником, вынести пострадавшего на свежий воздух и при необходимости сделать искусственное дыхание и массаж сердца, немедленно вызвать скорую помощь.

Перечень лабораторных работ

Семестр № 1

№	Наименование лабораторной работы	Кол-во академических часов
1	Состав, строение, и виды нуклеиновых кислот.	4
2	Генетический код и строение мРНК: принцип перевода нуклеотидной последовательности в аминокислотную.	4
3	Рестрикция ДНК и эндонуклеазы рестрикции, практическое использование различных классов рестриктаз в генно-инженерных подходах.	4
4	Полимеразная цепная реакция (ПЦР): Принцип метода, основные компоненты, этапы и их параметры.	8
5	Лигирование фрагментов ДНК для получения рекомбинантных молекул.	4

6	Методы верификации генно-инженерных конструкций.	4
---	--	---

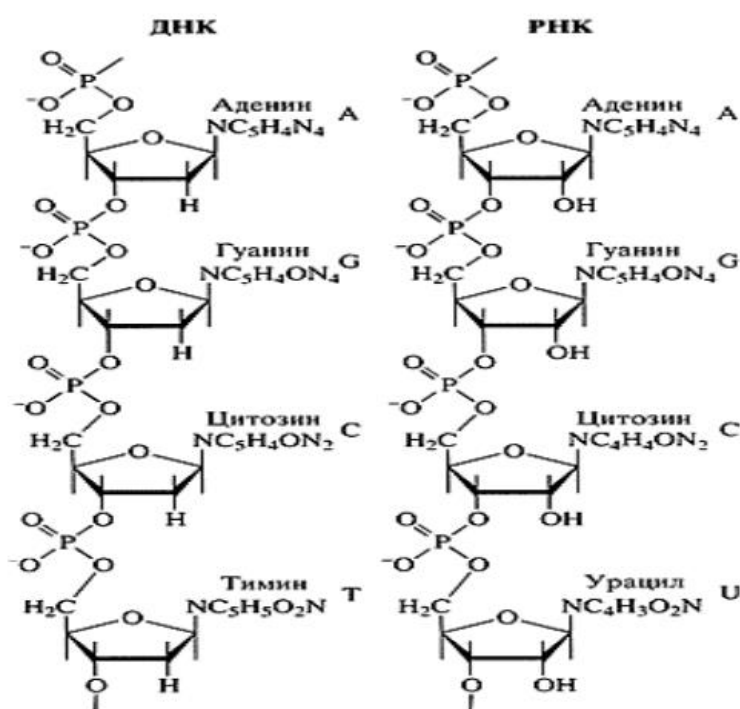
Лабораторная работа 1

Состав, строение, и виды нуклеиновых кислот.

Из сложных биологических молекул особое значение имеют нуклеопротеиды, играющие роль в передаче наследственных признаков, в синтезе белков и во многих процессах обмена. Нуклеопротеиды состоят из белков и нуклеиновых кислот, которые в своем составе содержат азотистые основания (А, Т, Г, Ц или У, входящий в 24 РНК). Кроме того, в состав нуклеиновых кислот (Н.К.) входят углеводы (моносахариды - пентоза) и фосфорная кислота



Строение нуклеотида-мономера нуклеиновых кислот.



Различия в первичной структуре ДНК и РНК.

Различают рибонуклеиновые кислоты (РНК) и дезоксирибонуклеиновые (ДНК) кислоты, которые отличаются не только по содержанию У и Т, но и в зависимости от входящего моносахарида - рибозы (РНК) и дезоксирибозы (ДНК)

Так как все три компонента (азотистые основания, углеводы и фосфорная кислота) входят в состав нуклеиновых кислот всегда в постоянных молярных концентрациях (в соотношении 1:1:1), определение нуклеиновых кислот обычно проводят, исследуя содержание какого-либо одного из компонентов, в частности, фосфора.

Оборудование: Спектрофотометр СФ-26 или СФ-46 для измерения оптической плотности растворов; кварцевые кюветы для фотометрирования; центрифуга типа Т 23 D или рефрижераторная К-24, объем центрифужных пробирок 30-50мл; весы для уравнивания центрифужных пробирок; водяная баня (96°С); мерная посуда - цилиндры или пробирки на 25-50мл (2 шт.); пробирки (мерные «пальчики» - 2 шт.); стаканы, реторты; микропипетки на 100 и 1000мкл; наконечники для пипеток; стеклянные палочки; маркер; бинт; фильтровальная бумага; штативы.

Реактивы: Проба крови или навеска мышечной ткани; 0,2Н, 0,5Н и 0,6Н растворы хлорной кислоты; дистиллированная вода (дН₂O)

Схема работы:

1. 10 и 500 мг мышечной ткани крупного рогатого скота поместить в центрифужные пробирки.

2. Добавить по 10 мл 0,2 Н хлорной кислоты. Перемешать стеклянной палочкой

3.Осадок отделить центрифугированием при 3000 об/мин (Т 23D) в течение 5 мин (20°С). Осадок повторно отмыть.

4. К осадкам добавить по 10 мл 0,5 Н раствора хлорной кислоты, закрыть пробирки ретортой, нагревать в течение 30 мин в кипящей бане.

5. Гидролизат охладить под струей холодной воды и центрифугировать при 3000 об/мин (Т 23D) в течение 5 мин (20°С).

6. Перелить надосадочную жидкость в чистые стеклянные пробирки и замерить поглощение растворов (E₂₇₀ и E₂₉₀); контроль 0,5Н раствор хлорной кислоты

Оценка результатов: Рассчитать концентрацию ДНК и РНК. Так как нуклеиновые кислоты экстрагированы из ткани, сделать расчет по формуле:

$$C_{\text{(мкг/мл)}} = [(E_{270} - E_{290}) / 0,19] \times 10,3 \times V/V_1$$

V - объем исследуемой пробы; 190 удельная экстинкция 1 мг фосфора нуклеиновой кислоты в 1 мл раствора.

Вывод: Сравнить содержание РНК и ДНК в соматических клетках мышечной ткани.

Лабораторная работа 2

Генетический код и строение мРНК: принцип перевода нуклеотидной последовательности в аминокислотную.

Оборудование: Спектрофотометр СФ-26 или СФ-46; аналитические весы; два штатива с пробирками по 10 штук в каждом; автоматические пипетки переменного объема; наконечники; стаканы стеклянные с носиком.

Реактивы: 1) яичный белок - 1%-ный раствор (белок куриного яйца фильтруют через марлю и разводят дН₂O 1/10; 2) NaOH - 10%-ный раствор; 3) CuSO₄·5H₂O - 1%-ный раствор.

Ход определения: 1. В пробирку внести: → 5 капель 1%-ного р-ра яичного белка 2. Добавить: → 3 капли 10%-ного р-ра NaOH → 1 каплю 1%-ного р-ра CuSO₄, перемешать.

Оценка результатов: Если содержимое пробирки приобрело сине-фиолетовое окрашивание, значит произошла реакция между пептидными связями яичного белка и сульфатом меди.

Лабораторная работа 3

Рестрикция ДНК и эндонуклеазы рестрикции, практическое использование различных классов рестриктаз в генно-инженерных подходах

Оборудование: Центрифуга (К-23; угловой ротор; объем пробирок-30 мл). Ареометр (прибор для измерения плотности раствора) с пределами измерений от 1,060 г/см до 1,090 г/см. Камера Горяева. Микроскоп.

Лабораторная посуда, конические центрифужные пробирки, весы для уравнивания центрифужных пробирок, пастеровские пипетки и др.

Реактивы: Фиколл-400 - полисахарид. Пак - рентгеноконтрастное вещество (аналоги: верографин, изопак, урографин, уротраст, низотраст-370, триозил, ронпакон, омнипак и др.). 3ФР -забуференный физраствор, рН 7,2; раствор Хенкса; 3%-ный раствор цитрата натрия. Кровь с гепарином (Система-«Vacutainer Systems», фирма Becton Dickinson (Англия);

Подготовка реагентов: 1. Р-р 1: Фиколл: 4.32 г порошка фиколла-400 растворяют в 48 мл дистиллированной воды (8,25%-вес/объем, d ≈ 1,03 (20°C)). 2. Р-р 2: Раствор рентгеноконтрастного вещества (например, уротраста): 10.14 мл 76% раствора уротраста доводят дистиллированной водой до 21 мл (≈ 36,6%-объем/объем). 3. Градиент плотности: полученные объемы растворов фиколла (р-р 1) и уротраста (р-р 2) смешивают. Измеряют ареометром плотность полученного раствора (1.077 г/см). Если плотность выше, добавляют раствор фиколла, если ниже - раствор уротраста. Градиент плотности можно

хранить в течение 30 суток при температуре + 4°C в склянке из оранжевого стекла. 4. Забуференный изотонический раствор хлорида натрия (ЗФР): 3,56 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (м.м. 178) растворить в дистиллированной воде, доведя объем до 100 мл (р-р А); 3,12 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (м.м. 156) растворить в дистиллированной воде, доведя объем до 100 мл (р-р Б). Смешать 72 мл 40 раствора А и 28 мл раствора Б, в полученной смеси растворить 0,85 г NaCl ; рН раствора должен составить 7,2-7,4.

Схема выделения:

1. Ополоснуть пробирки на 10 мл цитратом натрия.
 2. Смешать 2 мл крови с равным объемом ЗФР в пробирке на 10 мл
 3. Взять шприцем 3(2) мл раствора фиколла и внести в пробирку.
 4. Тщательно наслоить 4 (6) мл разведенной крови на фиколл (рис.21).
- Внимание! Не смешивать образец с фиколлом. Наслаивать по стенке пробирки. Соотношение объемов градиент / плазма выдерживают в пределах 1:1 - 1:3.
5. Собрать лимфоциты чистой пастеровской пипеткой. • Примечание. Избыток крови ведет к загрязнению тромбоцитами. Избыток фиколла ведет к загрязнению гранулоцитами.
 6. Для дополнительной очистки к осадку клеток добавить, примерно, 6мл ЗФР, перемешать (Осторожно!) и центрифугировать при 100 g в течение 10 мин. (Повторить очистку 2 раза).
 7. После третьего центрифугирования удалить надосадочную жидкость, ресуспензировать лимфоциты в среде, выбранной для опыта.

Контрольные вопросы:

1. Привести основные области применения анилина.
2. Почему для очистки анилина применяют перегонку с паром?
3. Опишите электронный спектр анилина: по закону Бугера-Ламберта-Бера рассчитайте десятичный логарифм коэффициента молярного поглощения $\lg \epsilon$.
4. Опишите теоретические спектры ЯМР ^1H и ^{13}C для анилина.
5. Опишите схему лабораторной установки.
6. Изложите порядок выполнения работы.

Лабораторная работа №4.

ВЫДЕЛЕНИЕ АБИЕТИНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ТАЛЛОВОЙ КАНИФОЛИ

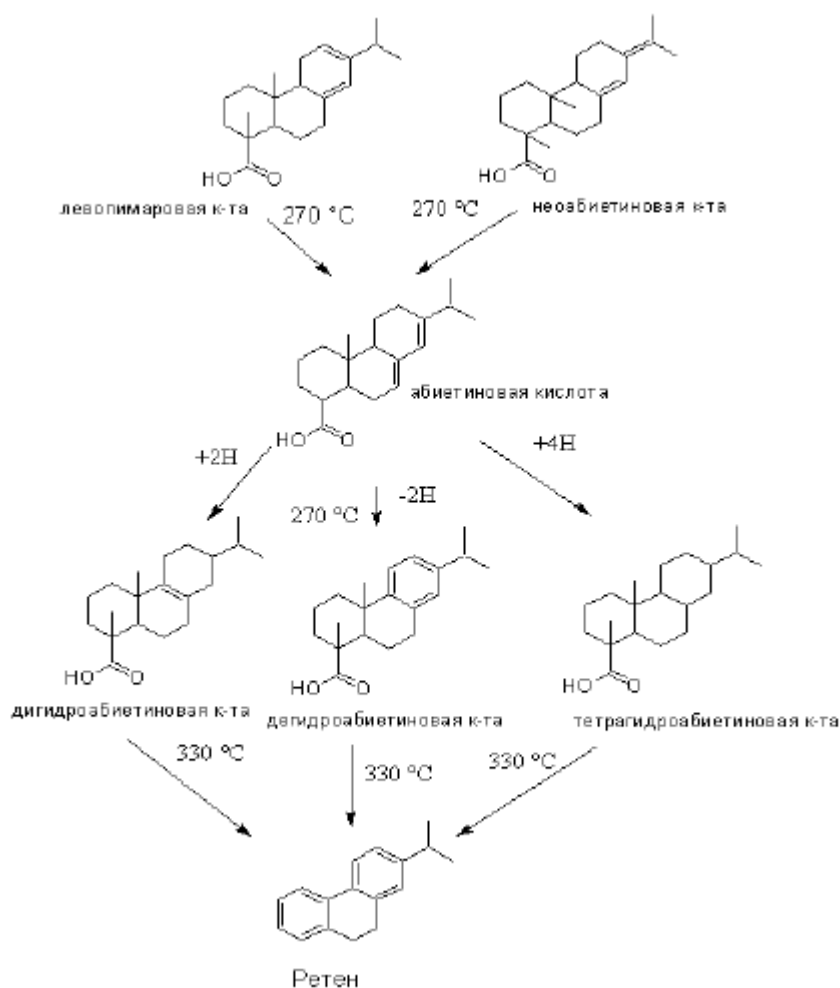
Цель работы: овладеть методикой выделения абиетиновой кислоты (АК) из канифоли.

Задание на выполнение ЛР:

1. Провести изомеризацию смоляных кислот, входящих в состав канифоли под действием концентрированной соляной кислоты; выделить из полученного изомеризата АК путем получения диэтиламмониевой соли с последующим разложением этой соли концентрированной уксусной кислотой.
2. Методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) подтвердить чистоту продуктов.
3. Определить температуру плавления АК.
4. Измерить УФ спектр АК и канифоли, рассчитать логарифмы коэффициента молярного поглощения $\lg \epsilon$.
5. Рассчитать теоретические ЯМР ^1H и ^{13}C спектры для АК и канифоли.
6. Предсказать с помощью пакета программ Pass online биологическую активность АК и диэтиламмониевой соли АК.

Порядок выполнения работы

Диспропорционирование абиетиновой кислоты



I стадия. Изомеризация канифоли

Реактивы: канифоль 25 г; этанол 75 мл; соляная кислота 5 мл; аргон

Приборы: колба круглодонная на 250 мл; обратный холодильник; термометр, $0\div 100\text{ }^{\circ}\text{C}$; склянка Алифанова или Дрекслея; газоотводная трубка; электроплитка; водяная баня

В трехгорлую колбу, снабженную, термометром, обратным холодильником и газоотводной трубкой, помещают 25 г предварительно измельченной талловой канифоли, затем при интенсивном перемешивании добавляют 75 мл этанола и 5 мл концентрированной соляной кислоты под аргоновой подушкой (*примечание*). Реакционную смесь кипятят в течение 2 ч. По окончании процесса изомеризации реакционная масса становится прозрачной, причем цвет раствора изменяется от светло-желтого до темно-желтых оттенков.

Внимание!

Для контроля за скоростью потока газа используют склянку Алифанова, соединенную с системой через обратный холодильник.

II стадия. *Отгонка смеси растворителей с водяным паром*

Реактивы: Реакционная масса I стадии.

Приборы: колба круглодонная на 500 мл; холодильник либиха; аллонж; приемник на 250 мл; электроплитка; паровик

Горячий изомеризат переносят в круглодонную колбу на 500 мл и отгоняют с водяным паром смесь этанола соляной кислоты. По мере удаления из системы растворителя начинается выделение твердой фазы изомеризата в виде воскообразных комочков желтого цвета. По окончании отгонки установку разбирают, оставшийся растворитель декантируют.

III стадия. *Промывка изомеризованной канифоли от остатков соляной кислоты и этилового спирта*

Реактивы: изомеризованная канифоль; диэтиловый эфир 100 мл; дистиллированная вода 180 мл; сульфат магния прокаленный 3 г

Приборы: делительная воронка на 500 мл; химический стакан на 250 мл; колба Эрленмейера на 100 мл; стеклянная пробка

Отфильтрованную твердую фазу (канифоль) - продукт II стадии, переносят в делительную воронку, и добавляют 100 мл диэтилового эфира. Воронку осторожно встряхивают несколько раз до полного растворения изомеризата, после чего эфирный раствор промывают 60 мл дистиллированной воды. Когда эмульсия расслоится водную фазу (нижний слой) отделяют и повторяют операцию промывки свежей порцией воды еще 2 раза, затем промытый эфирный раствор изомеризованной канифоли переносят в колбу Эрленмейера, засыпают сульфат магния и сушат.

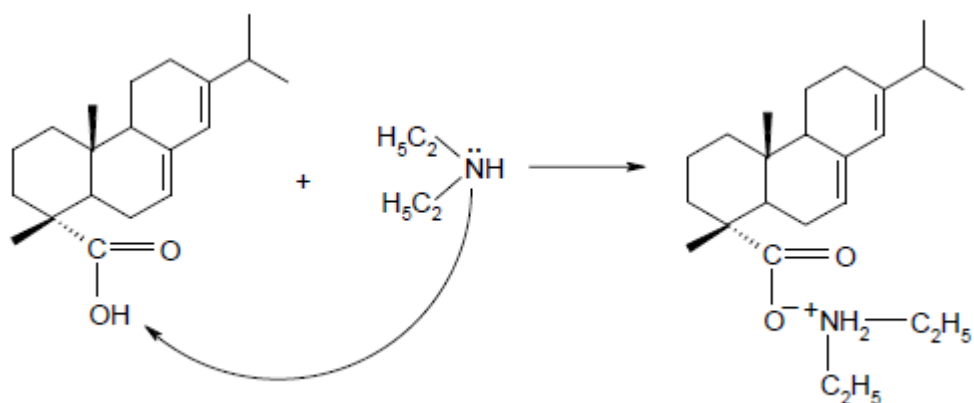
IV стадия. *Очистка диэтиламина методом простой перегонки*

Реактивы: диэтиламин 50 м.

Приборы: колба круглодонная на 100 мл; термометр, 0-150 °C; холодильник Либиха; насадка Вюрца; аллонж; приемник на 100 мл; электроплитка; водяная баня

В круглодонную колбу на 100 мл помещают 50 мл диэтиламина и проводят простую перегонку. Диметиламин – бесцветная жидкость с резким запахом, т. кип. 55,5 °C, n_{D20} 1,3860.

V стадия. *Получение абиетата диэтиламмония*



Реагенты: высушенная канифоль; диэтиламин 8 мл.

Приборы: колба Эрленмейера на 100 мл; коническая воронка; стеклянная палочка

После высушивания эфирный раствор изомеризованной канифоли (продукт III стадии) отделяют от сульфата магния, затем к раствору осторожно добавляют 8 мл свежеперегнанного диэтиламина и перемешивают стеклянной палочкой, после чего колбу закрывают пробкой и охлаждают. Через несколько часов из раствора начинают выпадать игольчатые кристаллы абиеата диэтиламмония.

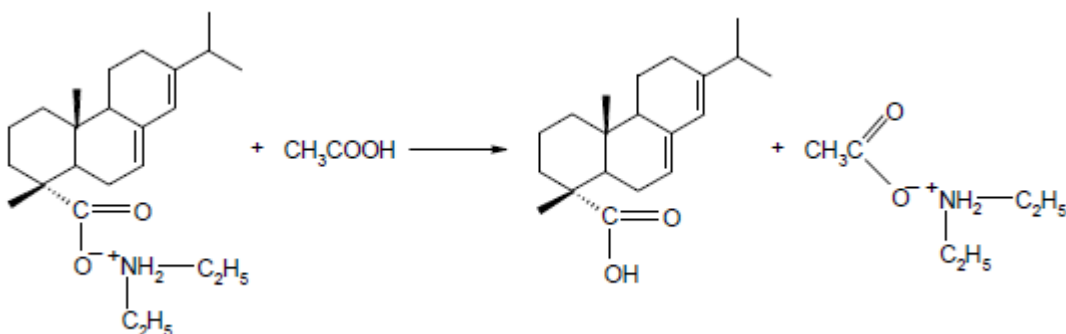
VI стадия. *Выделение и очистка абиеата диэтиламина*

Реактивы: абиеат диэтиламмония; гексан охлажденный 150 мл; петролейный эфир (фр. 70 ÷ 100 °С)

Приборы: колба плоскодонная коническая на 250 мл; химический стакан на 250 мл; воронка Бюхнера; колба Бунзена; фильтр Шотта; электроплитка

Выпавшие кристаллы абиеата диэтиламмония (продукт V стадии) отфильтровывают на воронки Бюхнера и промывают небольшими порциями охлажденного гексана до исчезновения запаха диэтиламина. Затем промытую соль переносят в плоскодонную коническую колбу и перекристаллизовывают из горячего петролейного эфира не менее 3-х раз, после чего очищенный абиеат диэтиламмония отделяют от маточного раствора на фильтре Шотта, промывают охлажденным гексаном и сушат в вакуум-эксикаторе над P₂O₅.

VII стадия. *Получение абиеиновой кислоты путем разложения абиеата диэтиламмония*



Реактивы: высушенный абиеат диэтиламмония; дистиллированная вода 700 мл; ледяная уксусная кислота

Приборы: химический стакан на 750 мл; мерный стакан на 500 мл; цилиндр на 50 мл; воронка Бюхнера; колба Бунзена; механическая мешалка

Высушенную соль абиеата диэтиламмония (продукт VI стадии) взвешивают и рассчитывают по уравнению реакции необходимое количество ледяной уксусной кислоты. Затем соль переносят в химический стакан и перемешивают механической мешалкой до полного ее растворения, после чего медленно небольшими порциями добавляют ледяную уксусную кислоту. Выпадает белый творожистый осадок абиеиновой кислоты, которую отфильтровывают на воронке Бюхнера, промывают дистиллированной водой и сушат с начала на воздухе, затем в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 .

VIII стадия. Перекристаллизация абиеиновой кислоты

Реактивы: сырец абиеиновой кислоты; этанол.

Приборы: колба плоскодонная коническая на 100 мл; обратный холодильник; химический стакан на 250 мл; мерный стакан на 100 мл; коническая воронка; фильтр Шотта; электроплитка; водяная баня

Высушенную абиеиновую кислоту (продукт VII стадии) переносят в плоскодонную коническую колбу на 100 мл, снабженную холодильником, добавляют небольшое количество этанола и начинают нагревать на водяной бане, постепенно добавляя этанол через обратный холодильник до полного растворения всей кислоты. Затем горячий раствор фильтруют через складчатый фильтр в химический стакан. Выпадают белые кристаллы абиеиновой кислоты, которую отфильтровывают на фильтре Шотта, промывают дистиллированной водой и сушат с начала на воздухе, затем в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 .

Контрольные вопросы:

1. Привести основные области применения канифоли и ее производных.
2. Приведите схему диспропорционирования смоляных кислот ряда абиеана в АК при нагревании в присутствии кислоты.
3. Для чего при изомеризации канифоли применяется аргон?
4. Опишите электронный спектр АК, по закону Бугера-Ламберта-Бера рассчитайте десятичный логарифм коэффициента молярного поглощения $lg\epsilon$.
5. Опишите теоретические спектры ЯМР ^1H и ^{13}C для АК и канифоли.
6. Опишите процедуру выделения АК из канифоли.

Лабораторная работа №5.

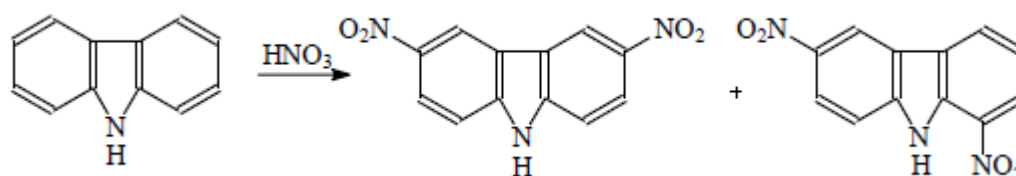
СИНТЕЗ 1,3- и 1,6-ДИНИТРОКАРБАЗОЛА

Цель работы: овладеть методикой нитрования конденсированных циклически соединений на примере карбазола.

Задание на выполнение ЛР:

1. Провести нитрование карбазола в среде уксусной кислоты с помощью HNO_3 .
2. Разделить смесь нитрокарбазолов на 1,3- и 1,6-изомеры методом дробной кристаллизации.
3. Методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) подтвердить чистоту продуктов.
4. Определить температуры плавления изомерных нитрокарбазолов.
5. Измерить УФ спектр нитрокарбазолов, рассчитать логарифмы коэффициента молярного поглощения $\lg \epsilon$.
6. Рассчитать теоретические ЯМР ^1H и ^{13}C спектры для нитрокарбазолов с использованием пакета программ ACDLabs.
7. Предсказать с помощью пакета программ Pass online биологическую активность нитрокарбазолов.

Порядок выполнения работы



Реактивы: карбазол 20 г; ледяная уксусная кислота 250 мл; азотная кислота 70 %- я 17 мл; 1,4-диоксан 310 мл; дистиллированная вода 200 мл; 3,6-динитрокарбазол.

Приборы: колба круглодонная на 500 мл; обратный холодильник; капельная воронка на 25 мл; термометр 0-150°C; колба Бунзена; воронка Бюхнера; механическая мешалка; электроплитка; масляная баня

К 20 г карбазола в 100 мл ледяной уксусной кислоты при 85 °С прикапывают 17 мл 70 %-й азотной кислоты с такой скоростью, чтобы температура реакционной массы держалась в интервале 85-87 °С. После введения всей кислоты температуру в колбе поднимают до 95°C и выдерживают 4 ч. Полученную смесь 1,6- и 3,6-динитрокарбазолов отфильтровывают под вакуумом, промывают 150 мл ледяной уксусной кислоты, затем водой до нейтральной реакции и сушат на воздухе. Полученную смесь изомеров кипятят в 200 мл 1,4-диоксана 1 ч. Не растворившийся в 1,4-диоксане продукт отфильтровывают, промывают 1,4-диоксаном, смешивают со 100 мл 1,4-диоксана и повторяют описанную операцию. Остаток, не растворимый в 1,4-диоксане после двойной обработки, представляет собой 3,6-динитрокарбазол. Выход 3,6-динитрокарбазола составляет 51 %, т.пл. 379-381 °С, Rf 0,42. По литературным данным т.пл. 386-387°C.

Смесь изомерных 3,6- и 1,6-динитрокарбазолов разделяют способом, основанном на их различной растворимости в 1,4-диоксане. Так, 1,6-динитрокарбазол переходит в раствор, из которого его упаривают в вакууме. Выход 3,6-динитрокарбазола составляет 51 %, а 1,6-динитрокарбазола – 40 %, чистота полученных соединений подтверждают методом ТСХ.

1,6-Динитрокарбазол получают путем отгонки 1,4-диоксана в виде желто-оранжевых кристаллов. Выход 1,6-динитрокарбазола составляет 40 %, т.пл. 342-344 °С. $R_f = 0,51$. По литературным данным т. пл. 344-346 °С (испр. из нитробензола).

Контрольные вопросы:

1. Привести основные области применения карбазола и его производных.
2. Почему при нитровании температура реакционной массы не должна превышать 85-87 °С?
3. Опишите электронные спектры 1,3- и 1,6-динитрокарбазолов, по закону Бугера-Ламберта-Бера рассчитайте десятичные логарифмы коэффициентов молярного поглощения $\lg \epsilon$.
4. Опишите теоретические спектры ЯМР ^1H и ^{13}C для 1,3- и 1,6-динитрокарбазолов
5. Описать процедуру дробной кристаллизации 1,3- и 1,6-динитрокарбазолов.
6. Изложите порядок выполнения работы.

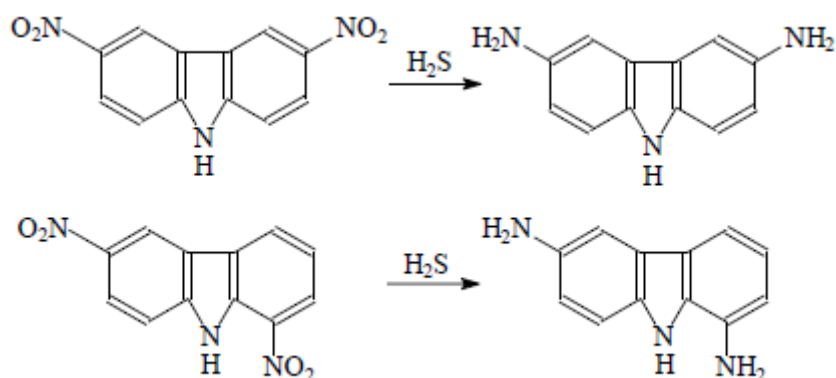
Лабораторная работа № 6
СИНТЕЗ 1,3- И 1,6-ДИАМИНОКАРБАЗОЛА

Цель работы: овладеть методикой восстановления нитрогруппы нитрокарбазолов с помощью сульфида натрия.

Задание на выполнение ЛР:

1. Провести восстановление нитрогруппы карбазолов сульфидом натрия.
2. Определить температуры плавления изомерных аминокарбазолов.
3. Проверить чистоту диаминокарбазола методом ТСХ.
4. Измерить УФ спектры 1,6-диаминокарбазола, рассчитать логарифмы коэффициентов молярного поглощения $\lg \epsilon$.
5. Рассчитать теоретические ЯМР ^1H и ^{13}C спектры для 1,6- диаминокарбазолов с помощью пакета программ ACDLabs..
6. Предсказать с помощью пакета программ Pass online биологическую активность

Порядок выполнения работы



Реагенты: 1,3- или 1,6-динитрокарбазол 25,7 г; сульфид натрия 96 г; медный купорос водный раствор 5 мл; соляная кислота 30 мл; активированный уголь; оу марка «а» 5 г; аммиак водный около 10 мл; дистиллированная вода 900 мл.

Приборы: колба круглодонная на 1000 мл; обратный холодильник; термометр, 0-150 °С; стаканы на 100 и 500 мл; цилиндр на 50 мл; колба Бунзена; воронка Бюхнера; механическая мешалка; электроплитка; масляная баня.

В трехгорлую колбу емкостью 1 л, снабженную обратным холодильником и мешалкой, загружают раствор 96 г сульфида натрия в 200 мл воды и нагревают до 100 °С, после чего добавляют суспензию 25,7 г 1,3- или 1,6-динитрокарбазола в 160 мл воды. Реакционную массу выдерживают при 100 °С в течение 1 ч и охлаждают. Осадок отфильтровывают и промывают водой до полного отсутствия сульфид-иона в промывных водах. Остаток растворяют при нагревании в 30 мл концентрированной соляной кислоты и 400 мл воды, кипятят с активированным углем, фильтрат охлаждают и нейтрализуют водным аммиаком до нейтральной реакции. Осадок отделяют, промывают водой и сушат на воздухе. Выход 1,6-диаминокарбазола составляет 66 % от теоретического.

Контрольные вопросы:

1. Привести основные области применения карбазола и его производных.
2. Какие еще восстанавливающие агенты используются для перевода нитрогруппы в аминогруппу?
3. Как определяется отсутствие в промывных водах сульфид-аниона?
4. Опишите электронные спектры 1,3- и 1,6-диаминокарбазолов, по закону Бугера-Ламберта-Бера рассчитайте десятичные логарифмы коэффициентов молярного поглощения $\lg \epsilon$.
5. Опишите теоретические спектры ЯМР ^1H и ^{13}C для 1,6-диаминокарбазола.
6. Изложите порядок выполнения работы.