



Politechnika Wroclawska

Wydział Chemiczny

ANALIZA JAKOŚCIOWA ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH

*Materiały do zajęć laboratoryjnych dla studentów
kierunków Chemia i Analityka dla Przemysłu oraz Biotechnologia*

Renata Siedlecka
Artur Mucha

Wrocław 2018



Projekt współfinansowany ze środków Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) na lata 2014-2018
dla Wrocławskiego Centrum Biotechnologii

Spis treści:

1. Wstęp
2. Analiza wstępna – badanie właściwości fizykochemicznych
3. Elementarna analiza jakościowa
 - 3.1. Spalanie – próba na obecność węgla i wodoru, wykrywanie pierścieni aromatycznych
 - 3.2. Wykrywanie heteroatomów: azotu, siarki oraz fluorowców
 - 3.2.1. Wykrywanie azotu w postaci amoniaku
 - 3.2.2. Wykrywanie azotu w postaci CN^-
 - 3.2.3. Wykrywanie siarki w postaci siarczków
 - 3.2.4. Wykrywanie fluorowców
4. Rozpuszczalność
 - 4.1. Używane rozpuszczalniki
 - 4.2. Badanie rozpuszczalności
 - 4.3. Przyporządkowanie do charakterystycznych grup rozpuszczalności
5. Wykrywanie grup funkcyjnych
 - 5.1. Wykrywanie węglowodorów aromatycznych
 - 5.1.1. Próba z chloroformem i AlCl_3
 - 5.1.2. Próba z formaldehydem
 - 5.1.3. Stałe pochodne węglowodorów aromatycznych
 - 5.1.3.1. Pochodne nitrowe
 - 5.2. Związki z grupą karbonylową (aldehydy i ketony)
 - 5.2.1. Reakcja z 2,4-dinitrofenylohydrazyną
 - 5.2.2. Reakcja z chlorowodorkiem hydroksyloaminy
 - 5.2.3. Wykrywanie aldehydów
 - 5.2.3.1. Próba Tollensa
 - 5.2.3.2. Reakcja z odczynnikiem Fehlinga
 - 5.2.3.3. Reakcja z odczynnikiem Benedicta
 - 5.2.3.4. Reakcja z odczynnikiem Schiffa
 - 5.2.4. Wykrywanie ketonów
 - 5.2.4.1. Próba Legal'a (wykrywanie metyloketonów)
 - 5.2.4.2. Próba jodoformowa
 - 5.2.4.3. Reakcja Zimmermanna (z *m*-dinitrobenzenem)

- 5.2.5. Stałe pochodne dla aldehydów i ketonów
 - 5.2.5.1. 2,4-Dinitrofenylohydrazony
 - 5.2.5.2. *p*-Nitrofenylohydrazony
 - 5.2.5.3. Oksymy
 - 5.2.5.4. Semikarbazony
- 5.3. Wykrywanie alkoholi
 - 5.3.1. Próba ogólna na obecność alkoholi
 - 5.3.2. Próba Lucasa – określanie rzędowości alkoholi
 - 5.3.3. Reakcja z odczynnikiem Bordwella i Wellmana – określanie rzędowości alkoholi
 - 5.3.4. Próba z kwasem nitrochromowym (alkohole I i II-rzędowe)
 - 5.3.5. Próba jodoformowa (alkohole II-rzędowe)
 - 5.3.6. Stałe pochodne dla alkoholi
 - 5.3.6.1. *p*-Nitrobenzoesan (lub 3,5-dinitrobenzoesan)
- 5.4. Wykrywanie węglowodanów
 - 5.4.1. Próba Molischa z α -naftolem – wykrywanie węglowodanów
 - 5.4.2. Reakcja z odczynnikiem Barfoeda – rozróżnianie mono- i oligosacharydów)
 - 5.4.3. Reakcja z molibdenianem(VI) amonu – odróżnienie monosacharydów od oligosacharydów
 - 5.4.4. Reakcja z floroglucyną – odróżnienie pentoz od heksoz
 - 5.4.5. Reakcja wobec FeCl_3 – próba Biała (pentozy)
 - 5.4.6. Wykrywanie aldoz wodą bromową
 - 5.4.7. Wykrywanie ketoz - próba Seliwanowa z rezorcyną
 - 5.4.8. Stałe pochodne węglowodanów
 - 5.4.8.1. Osazony
- 5.5. Wykrywanie związków o charakterze zasadowym – aminy
 - 5.5.1. Próba z papierkiem Kongo – próba na zasadowość
 - 5.5.2. Zobojętnianie wobec wskaźnika – próba na zasadowość
 - 5.5.3. Reakcja z kwasem azotowym(III) – rozróżnienie rzędowości amin
 - 5.5.4. Reakcja izocyjankowa (aminy I-rzędowe alifatyczne i aromatyczne)
 - 5.5.5. Reakcja tworzenia barwników azowych (aminy I-rzędowe aromatyczne)
 - 5.5.6. Reakcja z nitroprusydkiem sodu
 - 5.5.7. Reakcja Okhumi (III-rzędowe aminy alifatyczne)
 - 5.5.8. Stałe pochodne amin

- 5.5.8.1. Pochodne acetylowe
- 5.5.8.2. Pochodne benzoilowe
- 5.5.8.3. Pochodne pikrynowe – sole z kwasem pikrynowym
- 5.6. Wykrywanie związków nitrowych
 - 5.6.1. Reakcja z wodorotlenkiem sodu
 - 5.6.2. Redukcja cynkiem do amin
- 5.7. Wykrywanie związków o charakterze kwaśnym – fenole
 - 5.7.1. Badanie odczynu – próba ogólna
 - 5.7.2. Próba z FeCl_3
 - 5.7.3. Próba z bromem
 - 5.7.4. Próba indofenolowa (fenole nieposiadające podstawników jednocześnie w pozycji *orto* i *para*)
 - 5.7.5. Stałe pochodne fenoli
 - 5.7.5.1. Octany
 - 5.7.5.2. 3,5-Dinitrobenzoesany
 - 5.7.5.3. Pochodne bromowe
- 5.8. Wykrywanie związków o charakterze kwaśnym – kwasy karboksylowe
 - 5.8.1. Badanie odczynu
 - 5.8.1.1. Próba ze wskaźnikiem uniwersalnym
 - 5.8.1.2. Próba z fenoloftaleiną
 - 5.8.1.3. Próba jodan-jodek na obecność słabych kwasów
 - 5.8.2. Reakcja z NaHCO_3
 - 5.8.3. Reakcja z FeCl_3
 - 5.8.4. Reakcja z rezorcyną
 - 5.8.5. Stałe pochodne kwasów
 - 5.8.5.1. Estry *p*-nitrobenzylowe
 - 5.8.5.2. Amidy z aniliną lub *p*-toluidyną
- 5.9. Wykrywanie estrów
 - 5.9.1. Próba z hydroksyloaminą
 - 5.9.2. Pochodne estrów
- 5.10. Wykrywanie amidów pierwszorzędowych i nitryli
 - 5.10.1. Hydroliza
 - 5.10.2. Próba z hydroksyloaminą
 - 5.10.3. Pochodne krystaliczne amidów

- 5.10.3. Pochodne krystaliczne nitryli
- 5.11. Wykrywanie eterów
 - 5.11.1. Próba ze stężonym kwasem siarkowym
 - 5.11.2. Próba jodowa – wykrywanie tlenu
 - 5.11.3. Próba Ferrox – odróżnienie od związków beztlenowych
 - 5.11.4. Pochodne krystaliczne eterów alkilowych
- 5.12. Wykrywanie węglowodorów nienasyconych
 - 5.12.1. Rozpuszczanie jodu
 - 5.12.2. Próba Baeyera z manganianem(VII) potasu
 - 5.12.3. Przyłączenie bromu
- 5.13. Wykrywanie aminokwasów
 - 5.13.1. Reakcja z NaHCO_3
 - 5.13.2. Reakcja z azotanem(III) sodu
 - 5.13.3. Kompleksowe sole aminokwasów z miedzią
 - 5.13.4. Reakcja aminokwasów z ninhydriną
 - 5.13.5. Pochodne krystaliczne aminokwasów: *N*-benzoilopochodne
- 6. Metody spektroskopowe
 - 6.1. Spektrometria mas
 - 6.2. Spektroskopia IR
 - 6.3. Spektroskopia ^1H NMR
- 7. Spis literatury

1. Wstęp

Analiza związków organicznych, jak i cała chemia, zmieniła się na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci. Dziś wyodrębnianie i analizowanie budowy związków metodami chemicznymi zostało niemalże zastąpione przez metody chromatograficzne i spektroskopowe (NMR, IR, UV, HRMS). Jednak wprowadzenie klasycznej analizy do programu nauczania chemii organicznej jest jak najbardziej uzasadnione. Zarówno w zakresie teorii, jak i praktyki stanowi pierwsze elementarne wprowadzenia do samodzielnych badań. Samodzielne podejście do metodyki pracy, samodzielne planowanie i prowadzenie doświadczeń, logiczne wnioskowanie oraz systematyczne prowadzenie notatek przybliży do problematyki prowadzenia badań naukowych. Analizę jakościową związków organicznych ułatwia możliwość klasyfikowania ich do stosunkowo niewielkiej liczby szeregów homologicznych lub klas. W obrębie takiego szeregu związki ulegają podobnym, charakterystycznym reakcjom, o czym decydują występujące grupy funkcyjne. Systematyczne określenie szeregu właściwości fizycznych i chemicznych pozwala na stopniowe zawężanie (drogą eliminacji) zakresu związków, do których badana substancja może należeć. Wybór reakcji koniecznych do przeprowadzenia oraz kolejność ich wykonania zależy od inwencji i intuicji prowadzącego analizę. Wykonywanie wszystkich byłoby niezmiernie czasochłonne i w wielu przypadkach niecelowe. Bardzo istotnym elementem prowadzenia analizy jest więc wyciąganie wniosków zarówno z pozytywnych, jak i negatywnych prób, oraz planowanie następnego kroku. Skrupulatność w wykonywaniu eksperymentów, podpisywanie próbek oraz systematyczne prowadzenie notatek bardzo to zadanie ułatwiają. Prawidłowe wykonanie analizy obejmuje następujące etapy (niekoniecznie wg przedstawionej kolejności):

- obserwacje ogólne wraz z oznaczeniem stałych fizykochemicznych
- analiza elementarna – oznaczenie składu pierwiastkowego
- analiza rozpuszczalności – przypisanie badanego związku do jednej z grup rozpuszczalności
- reakcje charakterystyczne – wykrywanie grup funkcyjnych
- otrzymanie stałych pochodnych

Wykonanie reakcji ogólnych dla związków z wyznaczonej grupy rozpuszczalności. Nie wykonuje się wszystkich reakcji charakterystycznych tylko te, które **dotyczą** związków występujących w wykrytej grupie rozpuszczalności, starając się drogą eliminacji zawężyć krąg możliwości.

Do reakcji ogólnych należą:

- Reakcje na aromatyczność (5.1)
- Reakcja charakterystyczna na związki karbonylowe (5.2)
- Reakcja charakterystyczna na alkohole (5.3)
- Reakcja charakterystyczna na cukry (5.4)
- Reakcja potwierdzająca własności kwaśne dla fenoli i kwasów (5.7 i 5.8)
- Reakcja potwierdzająca własności zasadowe dla amin (5.5)

Wykrytą grupę funkcyjną należy potwierdzić wykonując inną reakcję charakterystyczną, uściślając dodatkowo np. rzędowość związku, aromatyczność itp.

Następnie dla badanej substancji otrzymuje się pochodną krystaliczną (stałą), charakterystyczną dla danej grupy związków.

Ostatni etap stanowi porównanie właściwości fizykochemicznych zmierzonych zarówno dla badanego związku, jak i jego pochodnych z odpowiednimi danymi literaturowymi. Analiza jakościowa prowadzi ostatecznie do stwierdzenia identyczności badanej substancji z jednym spośród wielu znanych związków organicznych.

Współczesna analiza związków organicznych w dużej mierze opiera się na analizie spektroskopowej. Dlatego ważne jest również umiejętne i systematyczne podejście do wyciągania informacji z otrzymanych widm IR, NMR oraz GC/MS. Wskazówki przydatne w samodzielnej interpretacji danych spektroskopowych zostały zawarte w rozdziale 6.

2. Analiza wstępna – badanie właściwości fizykochemicznych

Podczas wstępnych badań obserwuje się stan skupienia, barwę oraz zapach próbki. Mogą one dostarczyć wielu informacji, jednak należy je interpretować bardzo ostrożnie. Wiele związków ma charakterystyczny zapach: np. niższe węglowodory alifatyczne – zapach benzyny, węglowodory aromatyczne – zapach benzenu, aminy – zapach „rybi” podobny do amoniaku, niektóre estry kwasu octowego – zapach owocowy itp.

Bardziej szczegółowych informacji dostarcza pomiar stałych fizycznych, tj. temperatury topnienia dla ciał stałych, a dla cieczy temperatury wrzenia oraz współczynnika załamania światła. Zmierzone wartości mogą zostać wprost porównane z odpowiednimi parametrami wyszukanyymi w literaturze chemicznej. Pomiary temperatury stanowią też pewną podstawę do określenia czystości związku. Czyste związki topią się (stałe) lub destylują (ciekłe) w wąskim przedziale temperatur, tj. 1-2°C. Należy jednak pamiętać, że wiele związków może posiadać taką samą lub podobną temperaturę topnienia czy wrzenia, oraz że sam pomiar może być obarczony pewnym błędem.

3. Elementarna analiza jakościowa

Analiza jakościowa związków organicznych sprowadza się do wykrycia rodzaju atomów pierwiastków wchodzących w skład cząsteczki (głównie: C, H, O, N, S, P, chlorowce). Metoda wykrywania heteroatomów polega na rozkładzie związku organicznego na proste sole nieorganiczne przez spalanie lub stapianie z metalicznym sodem, a następnie wykrywaniu anionów metodami jakościowej analizy nieorganicznej.

3.1. Spalanie – próba na obecność węgla i wodoru, wykrywanie pierścieni aromatycznych

Analizę jakościową związku organicznego rozpoczyna się zwykle od próby spalania. Jeżeli badana substancja pali się płomieniem (często kopcącym), lub po odpowiednim prażeniu daje czarną pozostałość, która stopniowo zanika, substancja ta zawiera węgiel.

Wykonanie: Spalanie związków organicznych

Ok. 0,1 g badanej substancji umieszcza się na metalowej łyżce (szpatułce) lub w porcelanowym tygielku i ogrzewa się początkowo bardzo ostrożnie w płomieniu palnika, następnie silniej, wreszcie praży się. Należy obserwować zachodzące zjawiska – kolor płomienia i dymu, rodzaj pozostałości (sadza lub inne). Związki posiadające wiele atomów węgla w cząsteczce palą się dalej po wyjęciu z płomienia. Związki posiadające pierścień aromatyczny palą się charakterystycznym, kopcącym płomieniem. Jeśli w pozostałości stwierdza się związki nieorganiczne, może to świadczyć o obecności heteroatomów (P, As itp.) lub metali.

Obecność **węgla** w związku organicznym można stwierdzić przez działanie na badaną substancję stężonym kwasem siarkowym, powodującym jej zwęglanie.

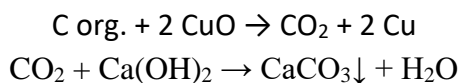
Wykonanie: Wykrywanie węgla za pomocą stężonego kwasu siarkowego(VI)

Umieścić w probówce ok. 0,1 g badanej substancji i wlać ok. 1 ml stężonego kwasu siarkowego(VI). Jeżeli badana substancja jest związkiem organicznym, to po kilku minutach następuje jej zwęglanie.

Próba ta nie zawsze daje pozytywny wynik w przypadku niektórych związków organicznych, czarne zabarwienie węgla może być niewyraźne.

Stosuje się wówczas ogrzewanie badanej substancji z tlenkiem miedzi(II).

Tlenek miedzi(II) utlenia węgiel do dwutlenku węgla, którego obecność można stwierdzić na podstawie zmętnienia wodorotlenku baru(II) lub wapnia.



Jeżeli w chłodniejszej części tej probówki pojawią się na ścianach kropelki wody, świadczą one o obecności wodoru w badanej substancji.

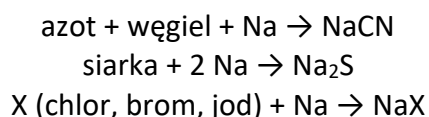


Wykonanie: Wykrywanie węgla i wodoru za pomocą CuO

W probówce umieścić ok. 0,1 g badanej substancji uprzednio osuszonej i zmieszać się z 1-2 g wyprażonego tlenku miedziowego. Probówkę zatyka się korkiem z rurką zgiętą pod takim kątem, aby wydzielające się gazy mogły być odprowadzane pod warstwę klarownego roztworu wodorotlenku wapniowego (wody wapiennej) znajdującego się w drugiej probówce. Po odpowiednim zestawieniu aparatury ogrzewa się zawartość probówki z substancją początkowo bardzo ostrożnie, potem stopniowo, aż do ciemnej czerwieni. Powstający w tych warunkach CO₂ powoduje zmętnienie wody wapiennej, względnie powstanie białego osadu.

3.2. Wykrywanie heteroatomów: azotu, siarki oraz fluorowców

Pozostałe pierwiastki znajdujące się w analizowanym związku organicznym (azot, siarkę, fluorowce) wykrywa się dopiero po przekształceniu ich w połączenia jonowe, dobrze rozpuszczalne w wodzie. W tym celu wykonuje się stapianie z metalicznym sodem, które powoduje rozkład związku, a pierwiastki, z których jest zbudowany, przekształcają się w aniony.



Azot, siarka i fluorowce, znajdują się w roztworze w postaci anionów: cyjankowego CN⁻, siarczkowego S²⁻, chlorkowego Cl⁻, bromkowego Br⁻, jodkowego J⁻. Poszczególne aniony wykrywa się, metodami, stosowanymi w analizie jakościowej nieorganicznej.

3.2.1. Wykrywanie azotu w postaci amoniaku

Azot zawarty w związkach organicznych w formie grup aminowych można wykryć za pomocą wapna sodowanego przez przekształcenie go w amoniak. Wydzielający się gaz można zidentyfikować po charakterystycznym zapachu i po zabarwieniu na niebiesko zwilżonego czerwonego papierka lakmusowego.

Wykonanie: Wykrywanie azotu za pomocą wapna sodowanego

Ok. 0,1 g badanej substancji umieścić się w suchej probówce, dodać 0,1 g wapna sodowanego i ogrzewać. W trakcie wydzielania się gazowego amoniaku można wyczuć charakterystycznym

zapach. Przez chwilę potrzymać zwilżony wodą destylowaną papierek lakmusowy u wylotu próbówki i zaobserwować zmianę jego barwy. Pojawienie się niebieskiej barwy świadczy o występowaniu azotu w cząsteczce.

Wykonanie: *Stapianie z metalicznym sodem*

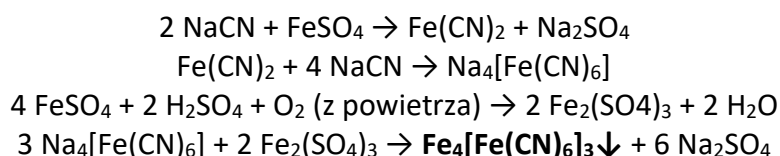
- *Stapianie z sodem należy prowadzić koniecznie w okularach ochronnych.*
- *Wszystkie czynności wykonuje się pod dygestorium z opuszczoną szybą przy zachowaniu szczególnej ostrożności.*
- *Sodu nie wolno dotykać palcami.*
- *Sód gwałtownie reaguje z wodą z wydzieleniem wodoru zapalającego się w powietrzu.*

W małej, suchej próbówce (ok. 60 × 5 mm) umieszcza się mały kawałeczek metalicznego sodu (wielkości ziarnka groszku) oraz niewielką ilość analizowanej substancji. Należy zwrócić uwagę, czy sód reaguje na zimno z badanym związkim, co może być dowodem na obecność czynnych atomów wodoru (połączonych z heteroatomem). Całość ogrzewa się najpierw delikatnie nie dopuszczając do wyrzucenia zawartości próbówki na zewnątrz (na skutek gwałtownego przebiegu reakcji), oraz unikając zapalenia się par u jej wylotu. Jeżeli substancja jest bardzo lotna i podczas ogrzewania odparowuje zbyt szybko można do próbówki z próbką i sodem dodać na zimno kilka kryształków sacharozy. Następnie fiolkę rozgrzewa się „do czerwoności” i gorącą fiolkę wpuszcza się do parowniczkę zawierającej około 10 ml wody destylowanej. Jeżeli próbówka nie pęknie można rozbić ją za pomocą szklanej bagietki, próbówkę rozdrabnia się i miesza zawartość parowniczy. Parowniczkę z roztworem ogrzewa się do wrzenia i sączy przez karbowany sączek. Przesącz, który powinien być bezbarwny lub jasnożółty i alkaliczny, służy do wykrywania azotu, siarki i fluorowców.

3.2.2. Wykrywanie azotu w postaci CN⁻

Wykonanie: *Metoda Lassaigne'a*

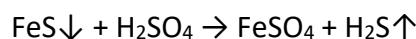
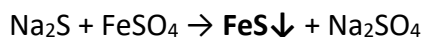
Do próbówki zawierającej około 1 ml przesącza otrzymanego po stapianiu analizowanej substancji z sodem dodaje się kilka kryształków FeSO₄ (lub FeSO₄·7H₂O), ogrzewa do wrzenia, chłodzi i zakwasza 1 M kwasem siarkowym. Obecność cyjanków w przesączu powoduje powstanie zielononiebieskiego zabarwienia roztworu, z którego po chwili wytrąca się ciemnoniebieski osad. Przy niskiej zawartości cyjanków (spowodowanym zbyt dużym rozcieńczeniem przesącza) może pojawić się tylko niebieskie zabarwienie roztworu lub nikły osad powstający po dłuższym czasie. Niekiedy powstawanie osadu ułatwia dodatek soli Fe³⁺.



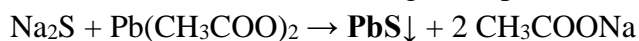
Wytrącenie się niebieskiego osadu Fe₄[Fe(CN)₆]₃ (błękit pruski) lub pojawienie się niebieskiego zabarwienia roztworu, świadczą o obecności azotu w cząsteczce.

3.2.3. Wykrywanie siarki w postaci siarczków

Jeśli po dodaniu FeSO_4 do roztworu po stąpieniu z sodem wytrąca się czarny osad siarczku żelaza(II) FeS , oznacza to, że analizowana próbka zawiera siarkę. Osad FeS rozpuszcza się po dodaniu rozcieńczonego H_2SO_4 , z wydzieleniem siarkowodoru (nieprzyjemny zapach).



Do wykrywania **siarki** występującej w związkach organicznych w postaci grup $-\text{SH}$ (tiolowej) lub $-\text{S}-$ (tioeterowej) można wykorzystać reakcje hydrolizy alkalicznej i wytrącenie jonu S^{2-} przy pomocy octanu ołowiu(II) lub tworzenie barwnego kompleksu z nitroprusydkiem sodu.



Wykonanie: Reakcja z octanem ołowiu

Do próbki wsypać ok. 0,1 g substancji organicznej, dodać 2 ml 20% roztworu NaOH i 0,5 ml roztworu octanu ołowiu(II). Zawartość próbki ogrzewać przez kilka minut na łaźni wodnej. Wytrącenie się czarnego osadu PbS świadczy o obecności siarki w badanym związku.

Wykonanie: Reakcja z nitroprusydkiem sodu ($\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}$)

Do 1 ml roztworu po stopieniu z sodem dodaje się kilka kropli świeżo przygotowanego, rozcieńczonego roztworu nitroprusydku sodowego. Pojawienie się zabarwienia czerwono-fioletowego, zanikającego po chwili, świadczy o obecności siarki.

3.2.4. Wykrywanie fluorowców

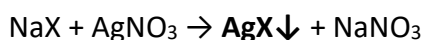
W wysokiej temperaturze związki niektórych metali wyparowują, a ich pary pobudzone do świecenia zabarwiają płomień palnika w charakterystyczny dla siebie sposób. Płomień palnika musi być maksymalnie bezbarwny. Obserwacja zmiany barwy palnika musi być dokonana na białym tle (np. na tle czystych kafelków w laboratorium), w pomieszczeniu z białym oświetleniem lub w ciemności.

Wykonanie: próba Beilsteina

Na drucie lub siatce **miedzianej**, wyprażonej w płomieniu palnika aż do zaniku zielonego zabarwienia i ochłodzonej, umieszcza się szczyptę badanej substancji lub jej kroplę i wprowadza się do nieświecącego płomienia palnika. W tych warunkach następuje rozkład związku organicznego z wytworzeniem lotnych połączeń halogenomiedziowych, barwiących nieświecący płomień na kolor intensywnie zielony lub zielononiebieski. Barwa szybko zanika. Z uwagi na fakt, że pozytywny wynik tej reakcji mogą dawać również związki nie zawierające chlorowca lecz zawierające azot (w postaci CN^- lub CNS^-), tylko negatywny wynik daje pewność, że związek nie zawiera chlorowca. Pozytywna próba Beilsteina wymaga potwierdzenia w reakcji z AgNO_3 .

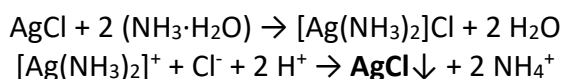
Dalsze postępowanie zależy od tego czy próba zawiera bądź nie azot lub siarkę.

Jeśli badana substancja nie zawiera azotu ani siarki do zakwaszonej próby dodaje się roztwór AgNO_3 , a wytracenie się białego osadu AgX świadczy o obecności chlorowca w badanym związku organicznym:

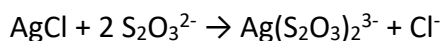


W celu sprawdzenia czy wytrącony osad jest chlorkiem (bromkiem, jodkiem) srebra, przeprowadza się próby rozpuszczania.

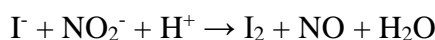
Osad chlorku srebra roztwarza się łatwo w rozcieńczonym amoniaku, dając chlorek diaminasrebra(I), który po zakwaszeniu kwasem azotowym ponownie przechodzi w wytrącony AgCl .



Chlorek srebra roztwarza się również w tiosiarczanie(VI) sodu, dając bis(tiosiarczano)-srebrzan(I):



Otrzymanie kremowego osadu w reakcji z AgNO_3 (nierozpuszczalnego w 10% roztworze amoniaku) świadczy o obecności jonów bromkowych lub jodkowych. W celu rozróżnienia tych pierwiastków przeprowadza się próbę pozwalającą na wykrycie jodu, opartą na reakcji:



Jeśli badana substancja zawierała azot lub siarkę, zakwaszoną próbkę najpierw ogrzewa się na łaźni wodnej w celu usunięcia jonów cyjankowych (CN^-) i utlenienia jonów siarczkowych S^{2-} do siarczanowych(VI) SO_4^{2-} . Następnie wykonuje się detekcję chlorowca dodając roztwór AgNO_3 jak opisano powyżej.

Wykonanie: Jeśli badana substancja nie zawiera azotu ani siarki

Do 1 ml przesącza dodać kwas azotowy(V) w celu zakwaszenia próbki, a następnie kilka kropel azotanu(V) srebra. Wytracenie się białego osadu (AgCl) świadczy o obecności chlorków. Kremowy kolor osadu świadczy o występowaniu bromków (AgBr) natomiast żółty wskazuje na obecność jodków (AgI). Rozróżnienie osadów halogenków srebra na podstawie barwy jest niejednoznaczne i konieczne jest zbadanie ich rozpuszczalności w 10% amoniaku, w którym rozpuszczeniu ulegają tylko osady AgCl . Jodki identyfikuje się w odrębny sposób.

Wykonanie: Jeśli badana substancja zawiera azot lub siarkę

Ok. 1 ml przesącza zakwasić roztworem HNO_3 , a następnie roztwór ogrzewać w probówce na łaźni wodnej ok. 10 min. Do tak przygotowanej próbki należy dodać kilka kropel azotanu(V) srebra i prowadzić obserwacje jak powyżej.

Wykonanie: Wykrywanie jodu

Do 3 ml przesącza po stopieniu z sodem dodaje się 2 M H_2SO_4 do wyraźnie kwaśnego pH, a następnie około 2 ml chloroformu. Do tak przygotowanego roztworu dodaje się 1-3 kropli 10% wodnego roztworu $NaNO_2$. Pojawienie się różowofioletowego zabarwienia warstwy chloroformowej świadczy o obecności jodu w badanej próbce. Jony chlorkowe i bromkowe dają reakcję negatywną – zarówno warstwa wodna jak i chloroformowa pozostają bezbarwne.

4. Rozpuszczalność

Związek jest najlepiej rozpuszczalny w rozpuszczalniku, do którego jest najbardziej zbliżony budową czy charakterem. Zgodnie z tą zasadą związki polarne dobrze rozpuszczają się w polarnych rozpuszczalnikach, a kiepsko lub wcale w rozpuszczalnikach niepolarnych. Niższe człony szeregów homologicznych związków tlenowych (alkohole, aldehydy, ketony, kwasy) rozpuszczają się w wodzie znacznie lepiej niż ich odpowiedniki o większej liczbie atomów węgla. Rozpuszczalniki reagujące z badanym związkiem pomagają określić jego charakter chemiczny, np. jeśli próbka rozpuszcza się w rozpuszczalniku zasadowym, to prawdopodobnie ma charakter kwaśny i tworzy rozpuszczalną sól, i na odwrót. Dobrze wykonane oznaczenie rozpuszczalności pozwala zakwalifikować badany związek do jednej z grup rozpuszczalności (klasyfikacja Shrinera, Fusona, Curtina – patrz Tabela 1) i upraszcza dalszą identyfikację.

4.1. Używane rozpuszczalniki

W przyjętym systemie badania rozpuszczalności używa się dwóch typów rozpuszczalników:

- Rozpuszczalniki obojętne (woda, eter) – wynikiem świadczącym o rozpuszczalności w tej próbce jest powstanie klarownego roztworu.
- Rozpuszczalniki reaktywne (kwasy, zasady) w których rozpuszczalność zachodzi w wyniku reakcji chemicznej lub wymiany jonowej. Pozytywny wynik tej próby polega zarówno na otrzymaniu klarownego roztworu, ale informacji dostarcza też pojawienie się osadu, wyraźna zmiana barwy lub wydzielanie się gazu. Należy uważać aby nie pomylić emulsji świadczącej o braku rozpuszczalności od ewentualnego osadu produktu reakcji.

Woda – należy do rozpuszczalników polarnych, rozpuszcza związki organiczne silnie polarne należące najczęściej do niższych członów homologicznych.

Eter dietylowy – jest związkiem niskocząsteczkowym posiadającym słabo zasadowe wolne pary elektronowe mogące tylko w małym stopniu uczestniczyć w tworzeniu wiązań wodorowych z kwasami. Eter rozpuszcza związki rozpuszczalne w wodzie (grupa E₁) zawierające pewne grupy niepolarne z niewielkimi fragmentami polarnymi (np. alkohole jednowodorotlenowe). Nie rozpuszcza związków z dominującymi grupami polarnymi (grupa E₂) (np. cukry).

5% roztwór NaOH – jest rozpuszczalnikiem związków, które z zasadą sodową dają sole rozpuszczalne w wodzie. Reakcjom tym ulegają kwasy nierozpuszczalne w wodzie ze względu na zbyt dużą cząsteczkę w stosunku do ilości grup polarnych.

5% roztwór NaHCO₃ – różnicuje nierozpuszczalne w wodzie kwasy na mocniejsze (grupa K₁) lub słabsze (grupa K₂) od H₂CO₃.

5% roztwór HCl – pozwala na rozpuszczenie związków o charakterze zasadowym tworzących w wodzie rozpuszczalne chlorowodoroki.

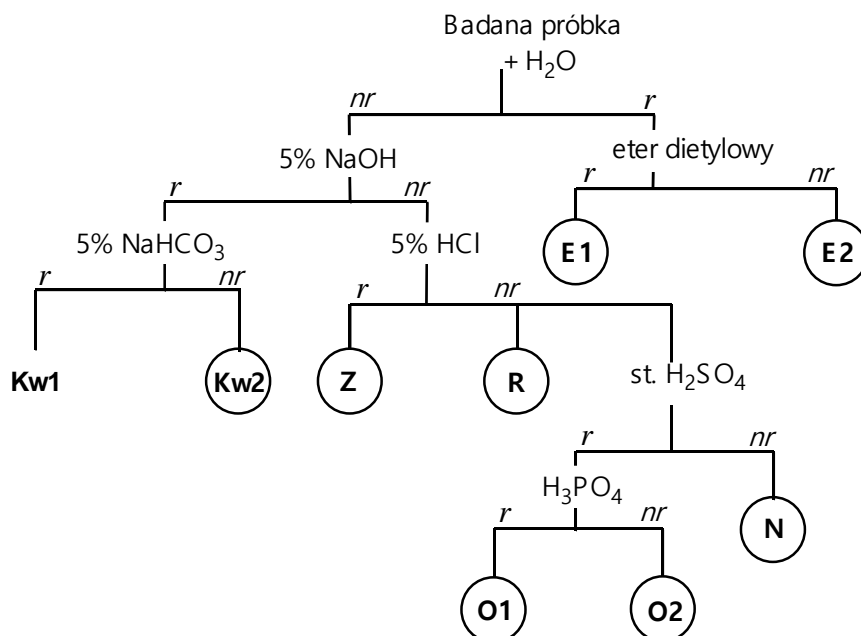
stężony H_2SO_4 – rozpuszcza wszystkie związki z wyjątkiem związków typowo niepolarnych. Przy badaniu rozpuszczalności w tym rozpuszczalniku często pojawia się nierozpuszczalny osad produktu reakcji badanego związku z kwasem siarkowym.

85% H_3PO_4 – jest kwasem nieco mniej polarnym i protonodonorowym niż stężony H_2SO_4 , dlatego rozpuszcza związki o niezbyt dużych różnicach w zawartości grup niepolarnych w stosunku do polarnych (grupa O_1). Kwas ortofosforowy(V) nie rozpuszcza związków z przewagą grup niepolarnych (grupa O_2).

4.2. Badanie rozpuszczalności

Prawidłowe oznaczenie rozpuszczalności zależy od staranności i dokładności wykonania. Szczególną uwagę należy zwrócić na kolejność przeprowadzanych prób (Schemat 1.) oraz użycie dokładnych ilości badanej próbki związku oraz stosowanego rozpuszczalnika. Badanie rozpuszczalności prowadzi się w temperaturze pokojowej. Substancje stałe należy w miarę możliwości maksymalnie rozdrobnić, gdyż duże kryształy rozpuszczają się powoli, co może być mylnie ocenione jako brak ich rozpuszczalności. Po zmieszaniu związku z rozpuszczalnikiem próbkę energicznie się wytrząsa.

Schemat 1.



Wykonywane czynności uczą dokładnej pracy ilościowej, analitycznego spojrzenia i wyciągania wniosków.

Wykonanie:

Ok. 0,1 g substancji stałej lub ok. 0,2 ml ciekłej umieścić w probówce, a następnie dodać ok. 3 ml odpowiedniego rozpuszczalnika i wytrząsnąć.

Za związek nierozpuszczalny uznajemy taki, którego 0,1 g (lub 0,2 ml) nie uległo rozpuszczeniu w ok. 3 ml rozpuszczalnika, mimo że przykładowo dodanie ok. 10 ml powodowałoby już jego rozpuszczenie.

UWAGA:

W przypadku badania rozpuszczalności w eterze dietylowym oraz stężonym H_2SO_4 albo 85% H_3PO_4 należy próbę wykonywać pod dygestorium oraz pamiętać o użyciu suchej probówki!

4.3. Przeporządkowanie do charakterystycznych grup rozpuszczalności

Tabela 1. Podział substancji organicznych na grupy rozpuszczalności.

Grupa I E1	Substancje rozpuszczalne w wodzie i w eterze dietylowym	Związki monofunkcyjne: alkohole, aldehydy, ketony, kwasy, estry, amidy aminy i nityle (zawierające do pięciu atomów węgla w cząsteczce)
II E2	Substancje rozpuszczalne w wodzie i nierozpuszczalne w eterze	Związki polifunkcyjne: alkohole wielowodorotlenowe, cukry, kwasy wielokarboksyłowe, hydroksykwas, aminokwas
IIIa Kw1	Substancje nierozpuszczalne w wodzie a rozpuszczalne w 5%-wym NaOH i $NaHCO_3$	Związki o charakterze kwaśnym: kwasy o większej liczbie węgla, halogenowane kwasy, nitropodstawione kwasy, halogeno- lub nitropodstawione fenole
IIIb Kw2	Substancje nierozpuszczalne w wodzie i $NaHCO_3$ a rozpuszczalne w 5%-wym NaOH	Związki o charakterze kwaśnym: fenole, tiofenole, imidy, β -diketony, pierwszo- i drugorzędowe sulfonamidy, pierwszo- i drugorzędowe nitrozwiązki alifatyczne
IV Z	Substancje nierozpuszczalne w wodzie a rozpuszczalne w 5%-wym HCl	Związki o charakterze zasadowym: aminy pierwszorzędowe, drugo- i trzeciorzędowe aminy alifatyczne, niektóre , drugo- i trzeciorzędowe aryloalkiloaminy , hydrazyny, niektóre trzeciorzędowe amidy
V R	Substancje nierozpuszczalne w wodzie, 5%-wym NaOH ani w 5%-wym HCl	Związki zawierające S lub N: diaryloaminy, aminofenole, nityle, amidy, aromatyczne lub trzeciorzędowe nitrozwiązki, związki karbonyłowe z grupami nitrowymi, azotany, tioetery, sulfotlenki, sulfony, siarczany
VI O1 O2	Substancje nierozpuszczalne w wodzie, NaOH ani w HCl, rozpuszczalne w stęż. H_2SO_4	Obojętne związki nie zawierające S lub N: alkohole, aldehydy, ketony, estry, etery, alkeny, alkiny, polialkilobenzeny
VII N	Substancje nierozpuszczalne w wodzie, NaOH, HCl, ani w stęż. H_2SO_4	Niereaktywne związki nie zawierające S lub N: aromatyczne i alifatyczne węglowodory, aromatyczne i alifatyczne chlorowcopochodne, etery dwuaryłowe, związki perfluorowane

W Tabeli 1. przedstawiono zależność rozpuszczalności substancji od ich przynależności do określonych grup związków organicznych.

Przyporządkowanie do charakterystycznych grup rozpuszczalności ma jednak tylko wartość orientacyjną (pomocniczą) i do końca nie przesądza o budowie badanej substancji. Pojawiające się trudności dotyczą szczególnie związków zawierających kilka grup funkcyjnych. Duże

problemy stwarza np. obecność grup nitrowych w badanych związkach. Wynik analizy należy więc przede wszystkim opierać na wykryciu grupy funkcyjnej występującej w badanym związku na podstawie reakcji charakterystycznych.

5. Wykrywanie grup funkcyjnych

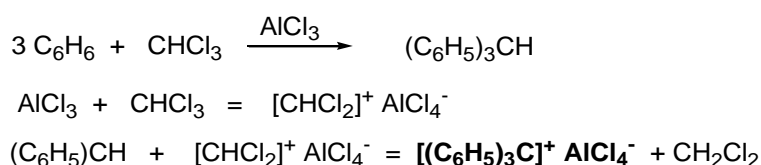
Aby określić jaką grupę(y) funkcyjną tj. decydującą o sposobie reagowania zawiera badana substancja należy wykonać szereg prób ze specjalnymi odczynnikami (tzw. reakcje grupowe). Każdą próbę na obecność grup funkcyjnych należy wykonać bardzo starannie, aby być pewnym jej odtwarzalności. Zwykle pozytywny wynik z jednej reakcji należy potwierdzić wykonaniem innej. W razie wątpliwości zaleca się wykonanie tzw. „ślepej próby” lub próby z użyciem wiadomego związku. Jeżeli substancja zawiera więcej niż jedną grupę funkcyjną, zaliczenie jej do odpowiedniej grupy związków organicznych odbywa się na podstawie wykrycia grupy aktywniejszej (dającej się łatwiej ustalić). Np. kwas *p*-nitrobenzoesowy lub *p*-metoksybenzoesowy będą zakwalifikowane do grupy Kw1 na podstawie reaktywności grupy karboksylowej; nie ma potrzeby wykrywania obecności grupy -NO₂ lub -OCH₃. Ostateczna identyfikacja odbywa się na podstawie porównania zmierzonych właściwości fizycznych analizowanej substancji oraz jej stałych pochodnych (dla kwasów np. odpowiednie estry lub amidy) lub na podstawie otrzymanych analiz spektroskopowych.

5.1. Wykrywanie węglodorów aromatycznych

Pierwszą oznaką, że badana substancja zawiera układ aromatyczny jest charakterystyczny kopcący płomień podczas wykonywania próby spalania. Poniżej przedstawiono reakcje pozwalające potwierdzić obecność pierścienia aromatycznego w cząsteczce, opierające się na charakterystycznej dla arenów substytucji elektrofilowej.

5.1.1. Próba z chloroformem i AlCl₃

Bezwodny chlorek glinu (kwas Lewisa) reaguje ze związkami aromatycznymi dając w chloroformie barwne związki kompleksowe, wg poniższego schematu. Aromatyczne związki jednopierścieniowe dają zwykle zabarwienie czerwone bądź pomarańczowe, dwupierścieniowe - czerwone lub niebieskie, wielopierścieniowe – zielone.



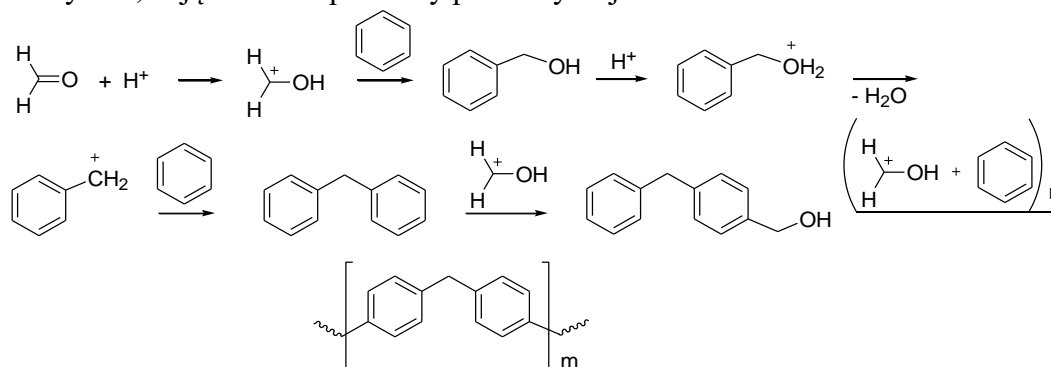
Wykonanie:

Do probówki zawierającej 2 ml bezwodnego chloroformu dodaje się 4 krople (lub ok. 0,1 g) badanego związku i miesza starannie, aby zwilżyć ścianki probówki. Następnie do przechylonej probówki, po ściance wsypuje się niewielką ilość **bezwodnego AlCl₃**. Należy obserwować zabarwienie proszku na ściankach probówki i w roztworze. W skutek reakcji związków aromatycznych z chloroformem i AlCl₃ barwi się roztwór (od żółtego, pomarańczowego po

czzerwony lub niebiesko-zielone) oraz osad na ściance. Jeśli zabarwienie nie pojawia się natychmiast, probówkę należy odstawić na kilka minut. Pozytywny wynik tej próby mogą dawać też niearomatyczne związki zawierające brom lub jod.

5.1.2. Próba z formaldehydem

Próba ma zastosowanie przy wykrywaniu związków aromatycznych nierozpuszczalnych w kwasie siarkowym (grupa N). W obecności stężonego H_2SO_4 związki aromatyczne reagują z formaldehydem, dając barwne produkty polimeryzacji.



Wykonanie:

Najpierw przygotowujemy odczynnik formaldehydowy: 1 kroplę formaliny (ok. 40%-wy wodny roztwór formaldehydu) wkraplamy do 1 ml stężonego kwasu siarkowego i wytrząsamy. W drugiej probówce przygotowujemy roztwór 0,1 g analizowanej substancji w ok. 1 ml rozpuszczalnika niearomatycznego (heksan, cykloheksan). Dodajemy 1-2 krople tego roztworu do próbki z odczynnikiem formaldehydowym. Obserwuje się barwę powstającą na granicy warstw oraz zabarwienie roztworu po wytrząsaniu. Jeśli badana próbka była węglowodorem aromatycznym, roztwór przyjmuje zabarwienie pomarańczowe (benzen, toluen), różowe, pomarańczowe, niebieskozielone lub zielone (naftalen, fenantren). Halogenki arylowe barwią roztwór na kolor różowy.

5.1.3. Stałe pochodne węglowodorów aromatycznych

5.1.3.1. Pochodne nitrowe

Bezpośrednie nitrowanie nitrowanie jest jedną z najbardziej charakterystycznych reakcji dla układów aromatycznych. Jest to typowa substytucja elektrofilowa, a elektrofilem jest jon NO_2^+ . Do nitrowania używamy mieszaniny nitrującej, a sama reakcja powinna być prowadzona ostrożnie, w sposób kontrolowany.

Wykonanie:

W kolbie okrągłodennej (50 ml) umieszczamy ok. 1 ml (lub 1 g) węglowodoru aromatycznego lub jego halogenopochodnej i ostrożnie dodajemy 4 ml stężonego H_2SO_4 . Całość chłodzimy do ok. $10^\circ C$ i powoli wkraplamy 4 ml stężonego HNO_3 , stale wstrząsając w celu wymieszania. Kolbę zaopatrujemy w chłodnicę zwrotną i pozostawiamy do ustania reakcji egzotermicznej, a następnie ogrzewamy do wrzenia przez 15 min. Po ochłodzeniu, całość wylewamy do zlewki z

pokruszonym lodem (ok. 25 g). Wytrącony osad odsączamy na lejku Büchnera, przemywamy wielokrotnie wodą do zaniku kwaśnego odczynu. Surowy produkt krystalizujemy z 70%-wego etanolu. Po wysuszeniu mierzymy temp. topnienia nitropochodnej i porównujemy jej wartość z odpowiednimi wartościami odnalezionymi w literaturze.

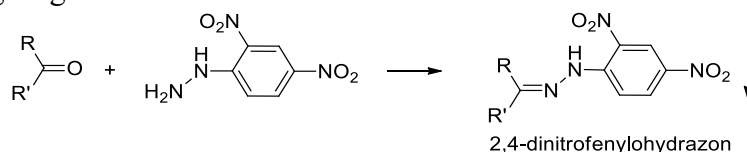
5.2. Związki z grupą karbonylową (aldehydy i ketony)

Reaktywność aldehydów i ketonów wiąże się z występowaniem grupy C=O w tych związkach i jej charakterem. Jest to grupa silnie spolaryzowana, a atom węgla posiadający deficyt elektronów podatny jest na atak odczynników nukleofilowych. Grupa –CHO ma obojętny charakter chemiczny, tzn. nie odszczepia ani nie przyłącza protonów. Jednocześnie grupa karbonylowa aktywuje atomy wodoru przy węglu α . Identyfikację należy zacząć od potwierdzenia, że w badanej próbce grupa karbonylowa występuje (reakcje z pochodnymi hydrazyny lub aminami). Dopiero w następnej kolejności należy rozstrzygnąć, czy jest ona do aldehydów, czy też ketonów, wykorzystując różnice w reaktywności tych grup związków (reakcja utleniania, substytucja na węglu α).

Obecna w cząsteczkach aldehydów i ketonów grupa karbonylowa sprawia, że związki te wykazują podobne własności chemiczne, m.in. ulegają reakcji addycji nukleofilowej.

5.2.1. Reakcja z 2,4-dinitrofenylohydrazyną

Ogólna reakcja, pozwalająca na stwierdzenie obecności grupy karbonylowej dla aldehydów i ketonów przebiega wg równania:



Daje ona jednoznaczną odpowiedź, tj. jeśli w badanym związku występuje grupa karbonylowa, obserwuje się wytrącanie żółtopomarańczowego lub nawet czerwonego osadu.

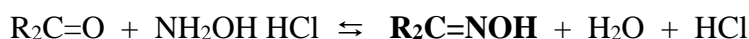
Wykonanie:

Do 2-3 kropli (lub 0,1 g) badanej substancji, rozpuszczonej w jak najmniejszej ilości wody lub etanolu, dodaje się ok. 3 ml odczynnika dinitrofenylohydrazynowego i mocno wstrząsa. Jeśli osad nie powstaje natychmiast pozostawia się roztwór na ok. 15 min w temp. pokojowej lub ogrzewa w łaźni wodnej.

Odczynnik dinitrofenylohydrazynowy – 2 g 2,4-dinitrofenylohydrazyny rozpuszcza się w 10 ml stęż. H_2SO_4 . Roztwór należy dodać do 150 ml chłodzonego etanolu, ciągle mieszając, następnie całość rozcieńczyć 500 ml wody destylowanej. Ewentualny osad odsączyć.

5.2.2. Reakcja z chlorowodorkiem hydroksyloaminy

W powyższej reakcji na skutek kondensacji grupy karbonylowej ze słabo zasadową hydroksyloaminą powstaje oksym nie posiadający własności zasadowych.



Wykonanie:

Do próbówki zawierającej około 1 ml 5% roztworu chlorowodoru hydroksyloaminy ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) dodać 2-3 krople oranżu metylowego, a następnie kroplami 0.1 M NaOH, mieszając aż do zmiany barwy z czerwonej na cebulkową. Następnie dodać kilka kropli badanego roztworu. Jeśli czerwone zabarwienie powróci, świadczy to o obecności grupy karbonylowej.

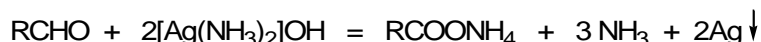
UWAGA! 1. Należy wystrzegać się nadmiaru wodorotlenku
2. Badany związek musi mieć odczyn obojętny

5.2.3. Wykrywanie aldehydów

Aldehydy, w przeciwieństwie do ketonów, ulegają utlenieniu do kwasów przy użyciu nawet słabych utleniaczy (Ag_2O , CuO).

5.2.3.1. Próba Tollensa

Próba Tollensa polega na redukcji amoniakalnego roztworu tlenku srebra(I) do metalicznego srebra, które osadza się na probówce – stąd też nazwa „próba lustra srebrowego”. Przebiega wg ogólnego równania:



Należy zadbać, aby próbówka była czysta i odtłuszczona. Reakcja Tollensa pozwala odróżnić aldehydy od ketonów. Ulegają jej również cukry redukujące (aldozy). Reaktywność aldehydów w tej próbie spada ze wzrostem ich masy cząsteczkowej.

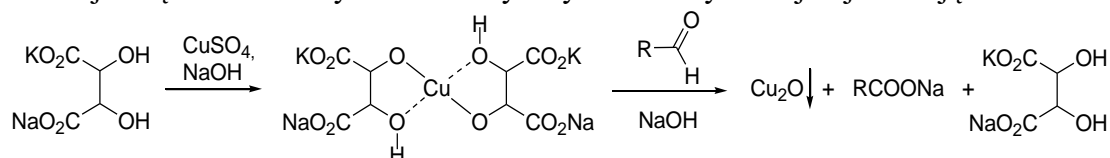
Wykonanie:

Do starannie oczyszczonej próbówki dodać 0,5 ml 1% roztworu wodnego AgNO_3 , 0,5 ml roztworu 5% NaOH oraz kroplami wodę amoniakalną (2% roztwór amoniaku), do chwili rozpuszczenia utworzonego osadu.

Następnie dodać kilka kropli analizowanej substancji (lub jej roztworu w minimalnej ilości alkoholu, gdy sama nie rozpuszcza się w wodzie). Wymieszać i pozostawić, obserwując tworzenie lustra na ściankach lub osad srebra. Jeśli reakcja na zimno nie zachodzi, ogrzać we wrzącej łaźni wodnej.

5.2.3.2. Reakcja z odczynnikiem Fehlinga

Odczynnik Fehlinga, będący mieszaniną roztworu CuSO_4 (Fehling I) i alkalicznego roztworu winianu sodowo-potasowego (Fehling II), utlenia aldehydy alifatyczne i powstaje ceglasty osad Cu_2O (jony Cu^{2+} redukują się do jonów Cu^+) wg podanego niżej równania. Rola winianu potasu sodu polega na wiązaniu jonów Cu^{2+} w związek kompleksowy co zapobiega powstawaniu osadu $\text{Cu}(\text{OH})_2$. Reakcji tej ulegają zazwyczaj aldehydy alifatyczne i cukry redukujące (sacharoza nie daje tej próby). Formaldehyd jako silny reduktor powoduje wytrącenie miedzi metalicznej. Większość aldehydów aromatycznych i ketony reakcji tej nie dają.



Wykonanie:

Do probówki zawierającej dwie krople lub ok. 0,1 g badanej substancji dodać mieszaninę odczynników Fehling I i Fehling II (po 1 ml) i ostrożnie ogrzewać na łaźni wodnej. W obecności aldehydu alifatycznego wytrąca się ceglastoczerwony osad tlenku miedzi(I).

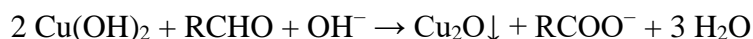
Fehling I: 17,3 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ w 250 ml wody zadany 3 kroplami stęż. H_2SO_4

Fehling II: 86,5 g winianu sodowo-potasowego i 30 g NaOH w 250 ml wody

5.2.3.3. Reakcja z odczynnikiem Benedicta

Reakcja jest charakterystyczna wyłącznie dla aldehydów alifatycznych, służy także do wykrywania większości cukrów (oprócz np. sacharozy).

Odczynnik Benedicta to ciemnoniebieski cytrynianowy kompleks miedzi(II) sporządzany przez rozpuszczenie w wodzie siarczanu miedzi(II), cytrynianu sodu i węglanu sodu. W porównaniu z odczynnikiem Fehlinga jest znacznie mniej zasadowy (ze względu na zastąpienie wodorotlenku sodu węglanem), bardziej czuły i bardziej odporny na substancje towarzyszące.



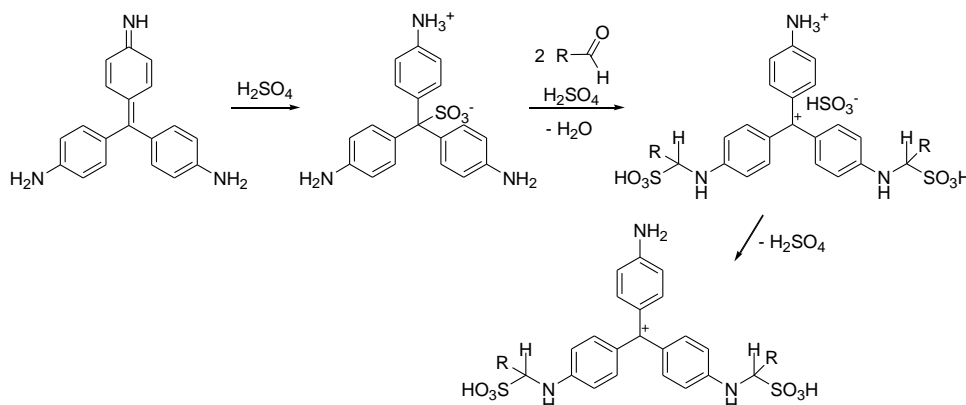
Wykonanie:

Do ok. 1 ml 2% wodnego lub alkoholowego roztworu badanej substancji dodaje się 5 ml odczynnika Benedicta i ogrzewa do wrzenia. W obecności aldehydów z roztworu powinien wytrącić się ceglastoczerwony osad Cu_2O , a w przypadku bardzo małej ilości substancji po dłuższym czasie osad żółty lub żółtozielony.

Odczynnik Benedicta – 86,5 g cytrynianu sodu ($2\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 11\text{H}_2\text{O}$) i 50 g bezwodnego Na_2CO_3 rozpuszczone w około 300 ml wody łączy się z wodnym roztworem siarczanu miedzi zawierającym 8,65 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (w jak najmniejszej ilości wody), a następnie dopełnia wodą do 500 ml.

5.2.3.4. Reakcja z odczynnikiem Schiffa

Próba Schiffa stosowana jest do jakościowego wykrywania aldehydów oraz cukrów redukujących. W próbie stosuje się odczynnik Schiffa, czyli wodny roztwór fuksyny nasycony tlenkiem siarki (SO_2). Związek ten reaguje z dwiema cząsteczkami aldehydu dając nietrwały produkt przyłączenia, który traci kwas siarkowy(IV) i powstaje fioletowo-purpurowa barwa od kationu trytylowego, zgodnie z reakcją:



Wykonanie:

Do 1 ml roztworu badanej substancji dodać 5 kropli odczynnika Schiffa. Zawartość probówki ostrożnie wymieszać. Jeśli analizowany związek jest aldehydem, po upływie ok. 5 min pojawia się purpurowo-fioletowe zabarwienie. Nie należy próbki ogrzewać.

5.2.4. Wykrywanie ketonów

Do wykrywania ketonów wykorzystuje się głównie ich reaktywność w pozycji α (kwaśne wodory podatne na substytucję). Dlatego najlepiej wykrywa się metylo- lub metylenoketony.

5.2.4.1. Próba Legala (wykrywanie metyloketonów)

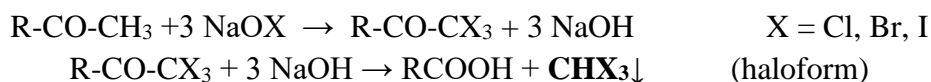
Metyloketony dają charakterystyczne zabarwienie z nitroprusydkiem sodowym.

Wykonanie:

W probówce miesza się 2-3 krople wodnego lub etanolowego roztworu badanej substancji z 2-3 kroplami 2% roztworu nitroprusydku sodu i pozostawia na kilka minut. Następnie dodać 1-2 kropli roztworu NaOH. Pojawienie się brunatno-czerwonego zabarwienia świadczy o obecności metyloketonów. Po dodaniu 1-2 kropli kwasu octowego zabarwienie zmienia się na czerwone lub niebieskie. Przebieg reakcji nie jest dokładnie znany, ale odznacza się ona dużą czułością i znajduje zastosowanie do wykrywania związków ketonowych w moczu, w przypadku cukrzycy.

5.2.4.2. Próba jodoformowa

Metyloketony $R-CO-CH_3$ są wyjątkową grupą ketonów, gdyż łatwo ulegają utlenieniu do kwasu karboksylowego w reakcji haloformowej. W reakcji tej utleniaczem jest, w zależności od użytego chlorowca, chloran(I) sodu, bromian(I) sodu lub jodan(I) sodu.



Reakcja ta zachodzi też dla II° alkoholi o wzorze ogólnym $R-CH(OH)-CH_3$.

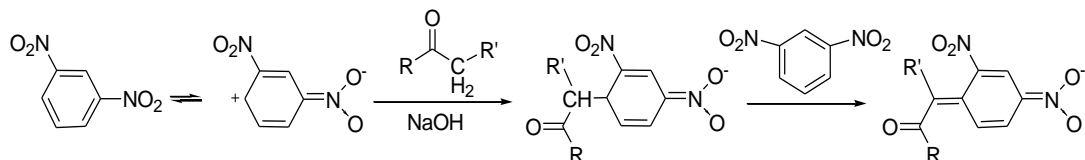
Wykonanie:

Do probówki wprowadza się 2 ml roztworu badanego związku w wodzie (lub w dioksanie) i 2 ml roztworu jodu w jodku potasu, a następnie kroplami 5%-owy roztwór NaOH, do stałej, ciemnej barwy jodu (należy unikać nadmiaru NaOH). Po kilku minutach wytrącają się drobne żółte kryształki jodoformu (trijodometanu) o specyficznym zapachu. Jeśli nie, należy ogrzać próbkę do 60°C.

5.2.4.3. Reakcja Zimmermanna (z *m*-dinitrobenzenem)

Reakcja Zimmermanna jest charakterystyczna dla metyloketonów lub związków zawierających fragment $-CH_2-C=O$ oraz niektórych aldehydów. Próba wykorzystuje reakcje substytucji

nukleofilowej w *m*-dinitrobenzenie, zachodzące w środowisku alkalicznym, w wyniku których, tworzą się połączenia ulegające utlenieniu do barwnych produktów. Rolę utleniacza spełnia *m*-dinitrobenzen (sam w środowisku alkalicznym ulega redukcji do *m*-nitrofenylohydroksylaminy). Za barwę odpowiedzialny jest sprzężony układ czterech wiązań podwójnych w powstającym produkcie.



Wykonanie:

Do niewielkiej ilości badanej substancji ciekłej (lub roztworu w etanolu) dodać kilka kryształków *m*-dinitrobenzenu, a następnie kilka kropli 15%-wego KOH. Pojawienie się po chwili fioletowoczerwonego zabarwienia wskazuje na obecność związku zawierającego: CH₃-C=O lub -CH₂-C=O.

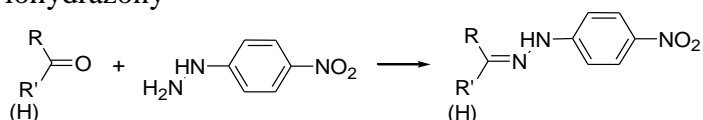
5.2.5. Stałe pochodne dla aldehydów i ketonów

5.2.5.1. 2,4-Dinitrofenylohydrozyny

Wykonanie:

W kolbie okrągłodennej rozpuszcza się 0,5 g 2,4-dinitrofenylohydrozyny w 20 ml etanolu i dodaje 0,2 g (lub 0,3 ml) związku karbonylowego. Kolbę zamyka się chłodnicą zwrotną i ogrzewa do wrzenia. Po 2 min kolbę powoli się ochładza i dodaje 0,5 ml stężonego HCl a następnie ponownie ogrzewa do wrzenia przez 5 min. Mieszaninę wylewa się do zlewki i chłodzi. Powstały osad sączy się i krystalizuje z czystego lub rozcieńczonego etanolu.

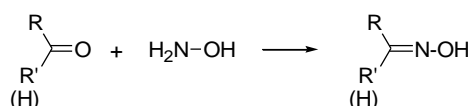
5.2.5.2. *p*-Nitrofenylohydrozyny



Wykonanie:

W kolbie okrągłodennej w 10 ml etanolu zadanego 2 kroplami stężonego kwasu octowego rozpuszcza się 0,5 g *p*-nitrofenylohydrozyny i 0,5 g (lub 0,5 ml) związku karbonylowego. Kolbę zamyka się chłodnicą zwrotną i ogrzewa przez 20 min. Mieszaninę wylewa się do zlewki i chłodzi, a powstały osad sączy i krystalizuje z etanolu.

5.2.5.3. Oksymy

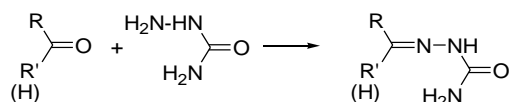


Wykonanie:

W kolbie okrągłodennej rozpuszcza się 0,5 g chlorowodoru hydroksylaminy w 2 ml wody, a następnie dodaje się 2 ml 10% roztworu NaOH i 0,2 g (lub 0,3 ml) związku karbonylowego. Jeżeli roztwór nie jest klarowny, dodaje się minimalną ilość etanolu konieczną do

rozpuszczenia osadu. Kolbę zaopatruje się w chłodnicę zwrotną i ogrzewa przez 30 min. Mieszaninę wylewa się do zlewki i chłodzi. Jeżeli z zimnego roztworu osad nie wypada dodaje się wody (nawet trzykrotną objętość). Powstały osad odsącza się i krystalizuje z czystego lub rozcieńczonego etanolu.

5.2.5.4. Semikarbazony



Wykonanie:

- *Dla aldehydów i ketonów rozpuszczalnych w wodzie*

W probówce umieszcza się 0,4 g (lub 0,5 ml) związku karbonylowego oraz 0,5 g chlorowodoru semikarbazynu. Następnie dodaje się 0,8 g trihydratu octanu sodu i całość rozpuszcza w 5 ml wody. Roztwór ogrzewa się przez kilka minut we wrzącej łaźni wodnej, pozostawia do ostudzenia, a następnie chłodzi w wodzie z lodem. Wydzielone kryształy semikarbazonu odsącza się i krystalizuje z wody lub rozcieńczonego (25-50%) etanolu.

- *Dla aldehydów i ketonów nierozpuszczalnych w wodzie*

W probówce rozpuszcza się 0,4 g (lub 0,5 ml) związku karbonylowego w 5 ml etanolu, dodaje wody do lekkiego zmętnienia, które następnie usuwa się kilkoma kroplami etanolu. Następnie dodaje się 0,5 g chlorowodoru semikarbazynu i 0,8 g trihydratu octanu sodu, dokładnie miesza i postępuje jak dla związków rozpuszczalnych w wodzie.

5.3. Wykrywanie alkoholi

Pochodne węglowodorów alifatycznych zawierające grupę -OH połączoną z atomem węgla o hybrydyzacji sp^3 , nazywa się alkoholami. Alkohole są substancjami ciekłymi lub stałymi o temperaturach wrzenia znacznie wyższych niż temperatury wrzenia węglowodorów, halogenków alkilowych i eterów o tej samej liczbie atomów węgla. Wzrost ten spowodowany jest obecnością wiązań wodorowych. Temperatura wrzenia alkoholi rośnie ze wzrostem długości łańcucha a maleje ze wzrostem jego rozgałęzienia. Pierwszą informację o możliwości występowania alkoholu w badanej próbce można uzyskać (dla związków ciekłych) obserwując jej zachowanie po dodaniu sodu w procesie stapiania z sodem (wydzielają się pęcherzyki powstającego wodoru), jest to jednak reakcja niespecyficzna gdyż dają ją również takie związki jak kwasy i fenole.

W analizie wykorzystuje się różnice w reaktywności alkoholi o różnej rzędowości w reakcjach substytucji nukleofilowej (S_N1 i S_N2). Zdolność reagowania z odczynnikami nukleofilowymi, a więc i zasadowość, rośnie wraz z rzędowością, natomiast kwasowość maleje. Charakterystyczne, zależne od rzędowości zachowanie alkoholi obserwuje się również w reakcjach utlenienia.

5.3.1. Próba ogólna na obecność alkoholi

Mieszanina metawanadanu(V) amonu (NH_4VO_3) i 8-hydroksychinoliny z alkoholami tworzy połączenia kompleksowe o czerwonym zabarwieniu. Pozwala wykrywać alkohole nawet w małych stężeniach, obok innych klas połączeń.

Wykonanie:

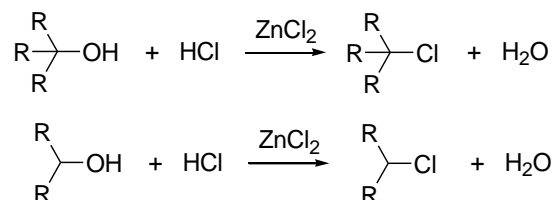
Do probówki zawierającej około 20-39 mg badanej substancji dodaje się 0,2 ml roztworu I, a następnie 1-2 kropli roztworu II, całość wstrząsa się i pozostawia na 2 min. Czerwone lub brunatnoczerwone zabarwienie roztworu wskazuje na obecność alkoholu. (Nadmiar odczynników w obecności alkoholu powoduje powstanie prawie czarnego zabarwienia). W razie wątpliwości można wykonać próbę kontrolną ze znanym alkoholem. Alkohol izopropylowy oraz izoamylowy dają słabą reakcję. Alkohol allilowy, benzylový, glicerol oraz alkohole z grupami aminowymi, fenolowymi i karboksylowymi dają próbę negatywną.

Roztwór I: 0,03% wodny roztwór NH_4VO_3

Roztwór II: 2,5% roztwór 8-hydroksychinoliny w 6% kwasie octowym

5.3.2. Próba Lucasa – określanie rzędowości alkoholi

Próba Lucasa jest reakcją alkoholi z kwasem solnym w obecności chlorku cynku. Wykorzystuje różnice w szybkości reakcji substytucji nukleofilowej alkoholi I-, II- i III-rzędowych, oraz brak rozpuszczalności w wodzie powstających chlorków alkilowych. Próba ma zastosowanie do niższych alkoholi (do C_6). Ulegają one reakcji z wytworzeniem nierozpuszczalnych w środowisku chlorków alkilowych:



- alkohole III° (oraz alkohol benzylový, allilowy i cynamonowy) reagują najszybciej, wywołując natychmiastowe zmętnienie roztworu,
- dla alkoholi II° zmętnienie pojawia się po kilku minutach,
- alkohole I° w temperaturze pokojowej nie reagują z roztworem Lucasa w sposób zauważalny.

Wykonanie:

Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej. Do około 0,2 ml badanej substancji dodaje się 2 ml odczynnika Lucasa. Probówkę zakorkowuje się i mocno wstrząsa. Odstawia i obserwuje się, czy i po jakim czasie powstanie w próbówce mlecznobiała emulsja pochodząca od wydzielającego się chlorowcoalkanu.

Odczynnik Lucasa: 15,5g bezwodnego chlorku cynku w 10 ml stężonego kwasu solnego.

5.3.3. Reakcja z odczynnikami Bordwella i Wellmana (CrO_3) – określanie rzędowości alkoholi

Wykonanie:

Rozpuścić 10 kropli badanego alkoholu w 1 ml acetonu i dodać 1 kroplę odczynnika Bordwella i Wellmana. Mieszaninę wytrząsać przez 10 sekund, a następnie zaobserwować zmianę barwy. Alkohole I- i II-rzędowe dają zabarwienie błękitnozielone natomiast alkohole III-rzędowe nie powodują zmiany zabarwienia roztworu.

Odczynnik Bordwella i Wellmana: 1 g CrO_3 rozpuścić w 1 ml stężonego kwasu siarkowego(VI) i 3 ml wody

5.3.4. Próba z kwasem nitrochromowym (alkohole I- i II-rzędowe)

Mieszanina HNO_3 i $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ powoduje utlenienie większości alkoholi I- i II-rzędowych, czemu towarzyszy pojawienie się ciemnoniebieskiego lub niebieskozielonego zabarwienia. Alkohole III-rzędowe reakcji tej nie ulegają. Próba ta jest dodatnia również dla cukrów.

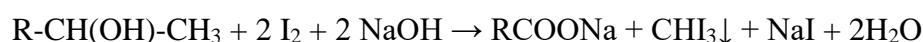
Reakcję tę wykonuje się tylko w celu rozróżnienia rzędowości alkoholi, a nie ich wykrywania.

Wykonanie: reakcję należy wykonać bardzo ostrożnie i pod dygestorium

W probówce umieszcza się 5 ml 7,5 M HNO_3 oraz 5 kropli 5% wodnego roztworu $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Następnie dodaje się 1 ml ok. 10% **wodnego roztworu** badanego związku (związki nierozpuszczalne w wodzie dodaje się bezpośrednio do mieszaniny kwasu i dwuchromianu w ilości 0,2 ml lub 0,2 g) i starannie wytrząsa. Probówkę pozostawia się pod dygestorium na kilka minut. Pojawienie się niebieskiego zabarwienia (w ciągu 5 min) wskazuje na obecność alkoholu I- lub II-rzędowego.

5.3.5. Próba jodoformowa (alkohole II-rzędowe)

Alkohole zawierające grupę hydroksylową przy drugim atomie węgla ulegają reakcji jodoformowej (podobnie jak metyloketony). Alkohole III-rzędowe nie dają tej reakcji.



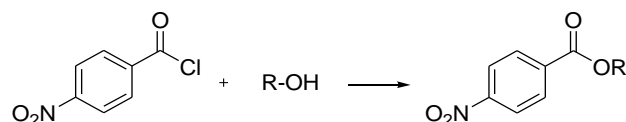
Wykonanie:

Do analizowanej próbki ok. 5 kropli alkoholu dodać ok. 2 ml wody i 1-2 ml 5% NaOH , a następnie kroplami dodawać roztwór jodu w jodku potasu do chwili utrzymania się ciemnej barwy jodu. Jeśli po kilku minutach nie pojawi się osad wstawić probówkę do gorącej wody na kilka minut. Oziębic, obserwować zmiany. Powinien wytrącić się żółty osad jodoformu.

5.3.6. Stałe pochodne dla alkoholi

5.3.6.1. *p*-Nitrobenzoesan (lub 3,5-dinitrobenzoesan)

Alkohole reagują z chlorkiem 3,5-dinitrobenzoilu z utworzeniem odpowiedniego stałego estru wg reakcji:



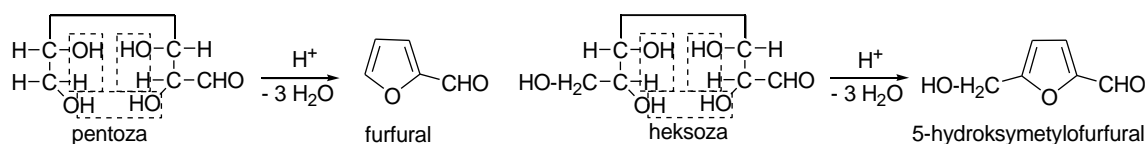
Wykonanie:

0,5 g chlorku 3,5-dinitrobenzoilu (lub *p*-nitrobenzoilu) miesza się z 2 ml badanego alkoholu i ogrzewa w suchej probówce do łagodnego wrzenia przez 5 min. Czas ogrzewania przedłuża się do 10-30 min dla alkoholi II- i III-rzędowych. Następnie wlewa się mieszaninę reakcyjną do 10 ml bardzo zimnej wody, dodatkowo chłodzi w lodzie i jak najszybciej odsącza. Otrzymany osad przemywa się 10 ml 2% roztworu NaHCO_3 , a następnie zimną wodą i krystalizuje z 70%

etanolu. Ponieważ otrzymany osad jest łatwo hydrolizującym estrem krystalizację należy przeprowadzić bardzo szybko ograniczając czas ogrzewania estru w etanolu do minimum.

5.4. Wykrywanie węglowodanów

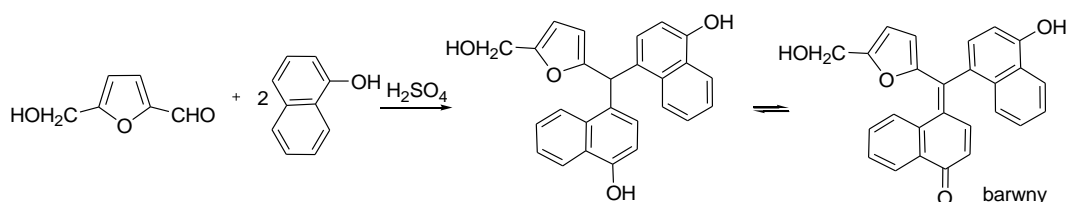
Cukry proste (monosacharydy) klasyfikuje się wg grup funkcyjnych (aldozy, ketozy) i ilości atomów węgla w cząsteczce (triozy, tetrazy, pentozy, heksozy, itd.). Związki te dobrze rozpuszczają się w wodzie, a nie rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych. Omówiona w tym rozdziale analiza nie obejmuje polisacharydów. Cząsteczki cukrów występujące w środowisku obojętnym w formie pierścieniowej, w środowisku zasadowym przekształcają się w formy łańcuchowe. W obecności słabych zasad (0,05 M) formy łańcuchowe ulegają enolizacji. Zostają zniesione różnice konfiguracji między C-1 i C-2. Glukoza przekształca się w mannozę i fruktozę i te trzy cukry epimeryczne są w stanie równowagi. Ogrzewanie cukrów z silnymi kwasami (stężony H_2SO_4 lub HCl) powoduje dehydratację, a nawet rozpad łańcucha węglowego. Z pentoz w środowisku silnie kwaśnym powstaje furfural, a z heksoz 5-hydroksymetylofurfural.



Wszystkie cukry reagują z α -naftolem. Cukry redukujące (proste) zawierają zawsze wolne grupy aldehydowe lub ketonowe. Cukry takie podczas ogrzewania w środowisku zasadowym tworzą silnie redukujące produkty. W większości prób redukcyjnych wykorzystuje się redukcję jonów miedzi(II) do jonów miedzi(I).

5.4.1. Próba Molischa z α -naftolem – wykrywanie węglowodanów

Dodatnią próbę Molischa wykazują wszystkie cukry ale także aldehydy, aceton i kwasy organiczne. W obecności stężonego kwasu siarkowego dochodzi do odwodnienia cukrów i powstaje furfural lub 5-hydroksymetylofurfural, które z α -naftolem tworzą barwne kompleksy. Ujemny wynik próby Molischa wyklucza obecność cukru.



Wykonanie:

W probówce umieścić ok. 20 mg badanej substancji, dodać 0,5 ml wody i 3 krople odczynnika Molischa. Do tak sporządzonego roztworu dodaje się ostrożnie 1 ml stężonego kwasu siarkowego, tak aby kwas spływał po ścianie ukośnie ustawionej probówki nie ulegając zmieszaniu z roztworem wodnym. Jeżeli badany związek był cukrem na granicy utworzonych warstw powstaje czerwono-fioletowy krążek, które z czasem staje się ciemnopurpurowy. Po 2 min. wstrząsnąć roztwór w

próbówce i dodać bardzo ostrożnie 5 ml wody co w wypadku obecności węglowodanu prowadzi do powstania ciemnofioletowego osadu.

Odczynnik Molischa: 10%-wy roztwór α -naftolu w MeOH

5.4.2. Reakcja z odczynnikiem Barfoeda – rozróżnianie mono- i oligosacharydów

Próba ta pozwala na odróżnienie monosacharydów od disacharydów na podstawie reakcji redukcji kationów Cu^{+2} do Cu^+ w środowisku lekko kwaśnym. W tych warunkach reakcja redukcji przebiega wolniej niż w środowisku zasadowym. Monosacharydy łatwo wykazują właściwości redukujące natomiast disacharydy dopiero po dłuższym ogrzewaniu, gdy zostanie rozerwane wiązanie glikozydowe. Cukry nieredukujące nie ulegają utlenieniu gdyż mają zablokowaną grupę aldehydową zdolną do redukcji odczynnika. W disacharydach grupy -OH przy półacetalowym atomie węgla obu monosacharydów biorą udział w wiązaniu glikozydowym (np. sacharoza).

Wykonanie:

Do 1 ml odczynnika Barfoeda dodać ok. 20 mg badanego cukru i po wymieszaniu wstawić do łaźni wodnej na 3 min. Jeśli badany cukier jest monosacharydem, w próbówce prawie od razu pojawia się ceglasty osad tlenku miedziawego (Cu_2O). Reakcji nie należy przedłużać, gdyż dla disacharydu po kilkunastominutowym ogrzewaniu również powstaje czerwone zabarwienie (po wstępnej hydrolizie do monosacharydów).

Odczynnik Barfoeda: 6,5 g octanu miedzi(II) rozpuścić w 100 ml wody, przesączyć i dodać 1,8 ml lodowatego kwasu octowego.

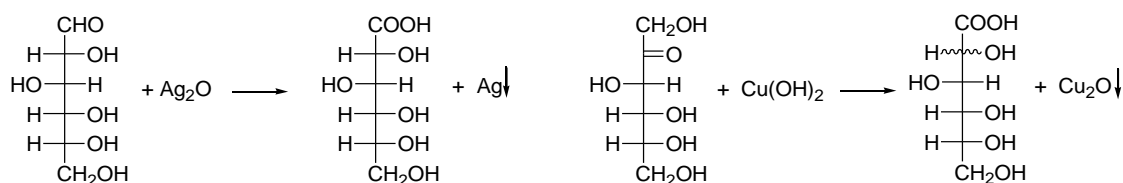
5.4.3. Reakcja z molibdenianem(VI) amonu – odróżnienie monosacharydów od oligosacharydów

Reakcja ta jest charakterystyczna dla monosacharydów, które w warunkach próby (środowisko obojętne), w odróżnieniu od oligosacharydów, redukują molibdenian(VI) amonu.

Wykonanie:

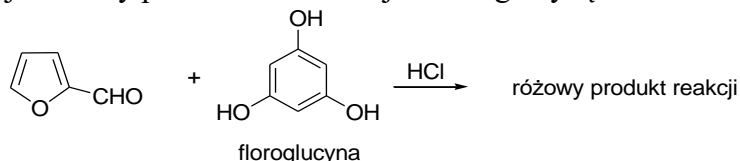
W próbówce w 1 ml wody rozpuszcza się 0,1 g badanego węglowodanu i dodaje 1 ml 8% roztworu molibdenianu(VI) amonu, dokładnie miesza i ogrzewa we wrzącej łaźni wodnej przez 3 min. Wyraźnie niebieskie lub zielone zabarwienie roztworu wskazuje na obecność monosacharydu. Reakcję tę daje również glicerol, kwas szczawiowy i winowy oraz maltoza.

Do wykrywania cukrów redukujących stosowane są też te same reakcje, którymi wykrywa się aldehydy, tj.: próby Tollensa, Fehlinga, Benedicta (patrz rozdział 5.2.3.).



5.4.4. Reakcja z floroglucyną – odróżnienie pentoz od heksoz

Reakcja ta jest charakterystyczna dla pentoz tworzących przy ogrzewaniu z HCl aldehyd 2-furylowy, który daje barwny produkt kondensacji z floroglucyną.

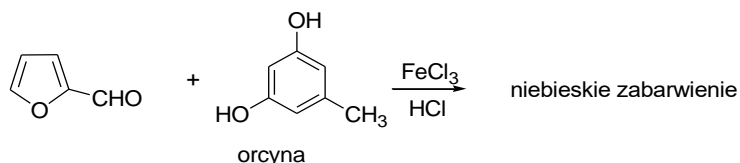


Wykonanie:

10 mg badanego węglowodanu rozpuszcza się w 5 ml 6 M HCl, dodaje 10 mg floroglucyny i ogrzewa do wrzenia przez minutę. Pojawienie się wyraźnego czerwonego zabarwienia wskazuje na obecność pentozy. Heksozy reagują z utworzeniem zabarwienia żółtego, pomarańczowego lub brązowego.

5.4.5. Reakcja wobec FeCl₃ – próba Biała (pentozy)

Zasada próby oparta jest również na zachowaniu się cukru wobec stęż. kwasów (odwodnienie do furfuralu), a modyfikacja polega na wprowadzeniu do reakcji FeCl₃. Próba ta jest podstawą ilościowego, kolorymetrycznego oznaczania pentoz (metoda Mejbaum-Katzenelenbogen) np. w kwasach nukleinowych. Pentozy w reakcji z orcyną, wobec FeCl₃ dają produkty o zielonkawo-niebieskim zabarwieniu. Heksozy w tej reakcji barwią roztwór na zielono, czerwono lub brązowo.



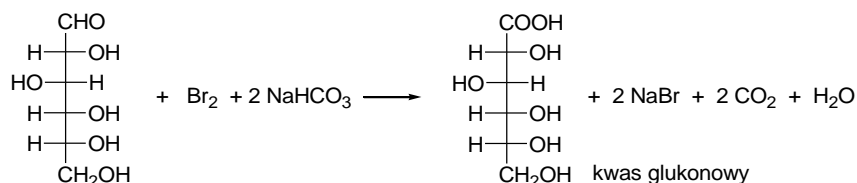
Wykonanie:

Do około 1 ml odczynnika Biała dodać roztwór ok. 20 mg analizowanego cukru w 0,5 ml wody i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej. Po 45 sekundach roztwór zabarwia się na niebieskavo.

Odczynnik Biała: roztwór orcyny w stęż. kwasie solnym z dodatkiem FeCl₃

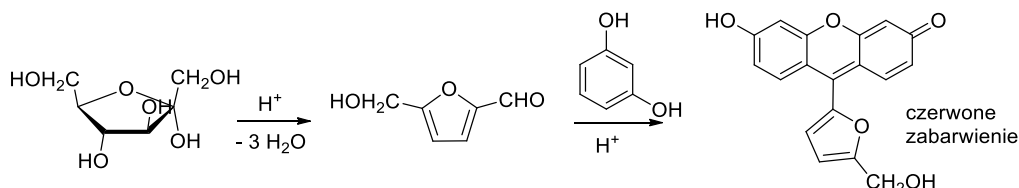
5.4.6. Wykrywanie aldoz wodą bromową

Aldozy **odbarwiają wodę bromową** w obecności wodorowęglanu sodu (następuje utlenienie grupy aldehydowej do grupy karboksylowej, w wyniku, czego powstaje kwas aldonowy). Ketozy nie powodują odbarwienia.



5.4.7. Wykrywanie ketoz – próba Seliwanowa z rezorcyną

Dodatni odczyn Seliwanowa wykazują ketozy. Próba ta odróżnia ketozy od aldoz, gdyż ketozy w stosowanych warunkach reakcji ulegają nawet 20 razy szybciej przemianie w aldehyd 5-hydroksymetylo-2-furylowy, którego obecność stwierdza się obserwując jego barwne kompleksy z rezorcyną. Ketozy w obecności stężonego kwasu solnego dają reakcję barwną z rezorcyną. Próbę uważa się za dodatnią jedynie wtedy, gdy zabarwienie występuje przed upływem 45 sekund. Przy dłuższym ogrzewaniu, odczyn ten wypada również dodatnio z sacharozą i inuliną, które pod wpływem zawartego w odczynniku kwasu solnego ulegają hydrolizie do fruktozy.



Wykonanie:

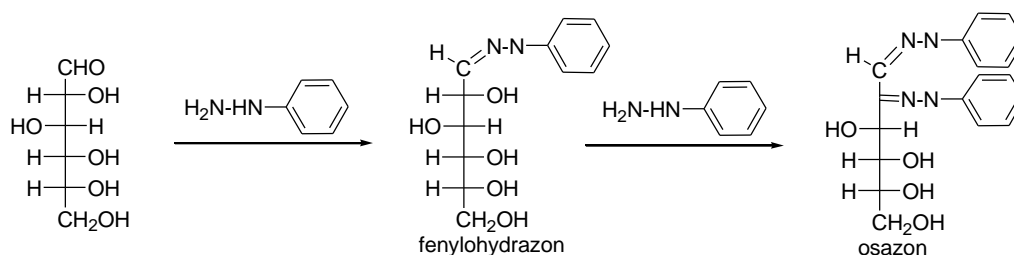
Do probówki zawierającej 0,1 g badanego cukru rozpuszczonego w 1 ml wody dodać 1 ml odczynnika Seliwanowa i ogrzewać na wrzącej łaźni wodnej dokładnie 45 sekund, po czym oziębic. W obecności ketoz próba barwi się na czerwono, zaś przy dużych ich stężeniach powstaje osad. Aldozy dają pozytywną reakcję po znacznie dłuższym ogrzewaniu lub długim odstaniu.

Odczynnik Seliwanowa: 50 mg rezorcyny w 100 ml 12% HCl

5.4.8. Stałe pochodne węglowodanów

5.4.8.1. Osazony

Tworzenie osazonów jest jedną z najbardziej charakterystycznych reakcji węglowodanów. Temperatura topnienia, forma krystaliczna oraz czas, po którym tworzą się osazony, są cennymi wskazówkami analitycznymi. W reakcji tworzenia osazonów biorą udział trzy cząsteczki fenylhydrazyny: dwie ulegają reakcji addycji a trzecia pełniąc rolę utleniacza jest redukowana do aniliny i amoniaku. Monosacharydy w reakcji z jedną cząsteczką fenylhydrazyny dają produkt kondensacji w którym w obecności nadmiaru fenylhydrazyny następuje utlenienie grupy hydroksylowej sąsiadującej z grupą aldehydową monosacharydu a następnie zachodzi następna reakcja addycji fenylhydrazyny do nowo utworzonej grupy karbonylowej.



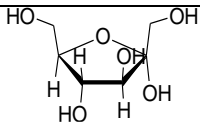
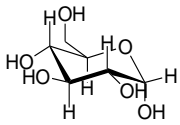
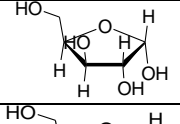
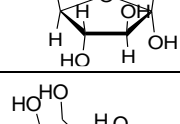
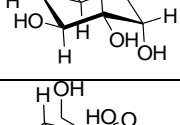
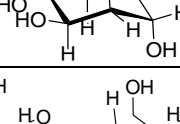
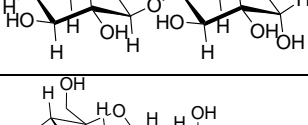
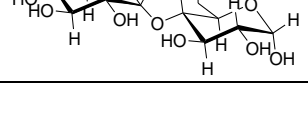
Jak widać z reakcji, cukry różniące się tylko konfiguracją przy drugim atomie węgla dają te same osazony, co można zauważyć analizując własności fizyczne takich cukrów jak glukoza,

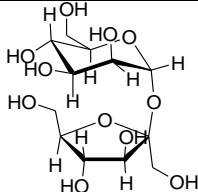
mannoza i fruktoza, których osazony mają te same temperatury topnienia, jednak inne czasy ich tworzenia.

Wykonanie:

W probówce rozpuszcza się 0,2 g chlorowodoru fenylhydrazyny i 0,3 g krystalicznego octanu sodu w 2 ml wody destylowanej. Do tak przygotowanego klarownego roztworu dodaje się 0,1 g badanego cukru, probówkę zatyka się zwitkiem waty i **natychmiast** wstawia do zlewki z **wrzącą** wodą. Podczas ogrzewania należy pilnie zwracać uwagę, po jakim czasie (od rozpoczęcia ogrzewania) pojawia się osad, gdyż czas ten jest zróżnicowany dla poszczególnych węglowodanów (Tabela 2). Po pojawieniu się osadu ogrzewa się probówkę jeszcze kilka minut, a następnie chłodzi w wodzie z lodem, a wydzielony osad odsącza, suszy i oznacza jego temperaturę topnienia.

Tabela 2. Właściwości cukrów i ich pochodnych – osazonów

Cukier	Wzór	Temp. rozkładu [°C]	Czas tworzenia osazonu w gorącym roztworze [min]	Temp. topnienia osazonu [°C]
Fruktoza		104	2	205
Glukoza - uwodniona - bezwodna		90 146	4-5	205
Ksyloza		145	7	164
Arabinoza		161	9	166
Galaktoza - uwodniona - bezwodna		120 170	15-19	201
Mannoza		132	0,5	205
Laktoza - uwodniona - bezwodna		203 223	<i>i</i>	200
Maltoza - uwodniona - bezwodna		100 165	<i>i</i>	206

Sacharoza		185	30 ⁱⁱ	205
-----------	---	-----	------------------	-----

ⁱ osazoni wydzielają się dopiero po ochłodzeniu ze względu na dobrą rozpuszczalność w wodzie

ⁱⁱ w tym czasie następuje hydroliza sacharozy i powstanie osazonów produktów hydrolizy (glukozy i fruktozy)

5.5. Wykrywanie związków o charakterze zasadowym – aminy

Rozróżniamy aminy pierwszorzędowe RNH_2 , drugorzędowe R_2NH i trzeciorzędowe R_3N . Najważniejsze właściwości amin pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowych są zdeterminowane przez reaktywność atomu azotu, który dzięki obecności wolnej pary elektronowej posiada silnie zaznaczone właściwości zasadowe i nukleofilowe.

Próby stwierdzenia obecności aminy w badanej próbce należy rozpocząć od stwierdzenia obecności azotu w analizie elementarnej. Aminy należą do grup rozpuszczalności E1 i Z. Aminy o krótkich łańcuchach rozpuszczają się w wodzie lepiej niż alkohole o takich samych łańcuchach węglowodorowych, co jest wynikiem powstania szczególnie mocnych wiązań wodorowych między azotem grupy aminowej a wodorem cząsteczki wody. Zależnie od rzędowości i rodzaju podstawników wykazują silniejszy lub słabszy charakter zasadowy (próba z czerwienią Kongo) oraz reagują różnie z określonymi odczynnikami (kwasem azotowym(III), chlorkiem benzenosulfonylowym, chlorkiem fluoresceiny). Obecność większości amin można rozpoznać po charakterystycznym bardzo nieprzyjemnym zapachu.

5.5.1. Próba z papierkiem Kongo – próba na zasadowość

Jest to próba ogólna na związki z grupą aminową.

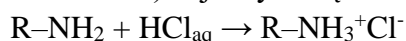
Wykonanie:

Kroplę badanej substancji ciekłej lub kilka kryształków substancji stałej umieszcza się na papierku wskaźnikowym z czerwienią Kongo zabarwionym uprzednio na niebiesko za pomocą jednej kropli 0,01 M HCl. Czerwona plama wskazuje na obecność aminy. Aminy aromatyczne II-rzędowe reagują słabo, a III-rzędowe nie wykazują w tej próbie odczynu zasadowego. Negatywny wynik tej reakcji wykazują również aminy z podstawnikami silnie elektroujemnymi.

Czerwień Kongo: barwnik azowy stosowany m.in. jako chemiczny wskaźnik pH. Zmiana barwy z niebieskiej (odczyn kwasowy) na czerwoną (odczyn zasadowy) następuje w zakresie pH 3,0-5,0.

5.5.2. Zobojętnianie wobec wskaźnika – próba na zasadowość

Aminy jako zasady reagują z kwasami dając sole. Zobojętnianie kwasem solnym w obecności oranżu metylowego (lub innego wskaźnika) daje wyraźną barwną reakcję.



Wykonanie:

Na szkiełku zegarkowym umieszcza się jedną kroplę 0,01 M roztworu HCl, jedną kroplę etanolowego roztworu oranżu metylowego i 4 krople wody. Następnie wprowadza się 4 krople lub niewielką ilość dobrze sproszkowanej badanej substancji. Związki słabo rozpuszczalne w wodzie należy rozpuścić lub zawiesić w 3 kroplach etanolu. W roztworze kwasu oranż ma barwę czerwoną, po dodaniu aminy zmienia barwę na żółtą.

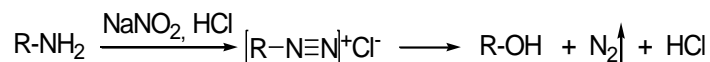
5.5.3. Reakcja z kwasem azotowym(III) – rozróżnienie rzędowości amin

Reakcja ta pozwala na rozróżnienie rzędowości amin i określenie czy badany związek jest aminą alifatyczną czy aromatyczną.

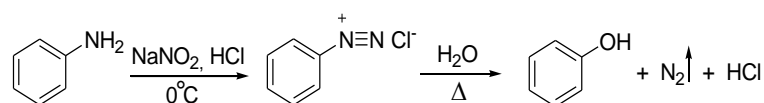
Wykonanie:

W probówce miesza się 0,2 g (lub 0,2 ml) aminy z 5 ml 10% roztworu HCl, a następnie chłodzi się w mieszaninie oziębiającej (lód z dodatkiem NaCl) do 0°C. Do tak przygotowanego roztworu dodaje się kroplami 0,7 ml 10% roztworu NaNO₂ ochłodzonego do 0°C. Przez cały czas dodawania temperatura reakcji nie może przekraczać 5°C. Po zakończeniu dodawania należy dokładnie zaobserwować zmiany jakie zaszły w probówce. Na ich podstawie można w większości wypadków określić rzędowość aminy i stwierdzić, czy jest to amina alifatyczna czy aromatyczna. Poniżej przedstawiono możliwe do zaobserwowania efekty reakcji różnych amin z kwasem azotowym(III).

* Jeżeli w temp. poniżej 5°C z przygotowanej (w opisany wyżej sposób) mieszaniny wydziela się azot w postaci bezbarwnego gazu badana próbka jest I-rzędową aminą alifatyczną.

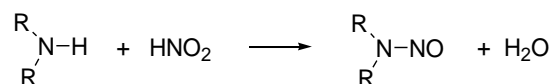


* Jeżeli azot nie wydziela się na zimno należy próbkę ogrzać w ciepłej wodzie – wydzielanie azotu w podwyższonej temperaturze może świadczyć o obecności I-rzędowej aminy aromatycznej. W próbie tej wykorzystuje się większą trwałość związków diazoniowych aromatycznych niż alifatycznych.



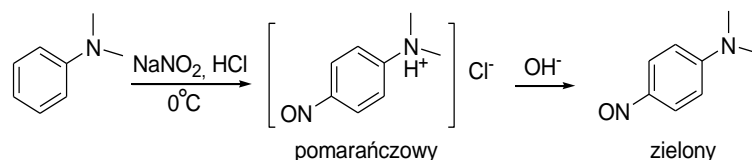
Potwierdzenie obecności aminy aromatycznej I-rzędowej otrzymuje się przeprowadzając **reakcję tworzenia barwnika azowego**

* Jeżeli na zimno i na ciepło nie wydziela się azot natomiast pojawia się żółty, oleisty produkt reakcji mamy do czynienia z aminą II-rzędową (alifatyczną lub aromatyczną), która tworzy z HNO₂ N-nitrozopochodne.



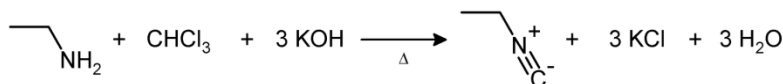
* Brak widocznych efektów reakcji świadczy o obecności III-rzędowej aminy alifatycznej, ogrzanie mieszaniny reakcyjnej powoduje wydzielanie się brunatnych tlenków azotu będących produktami rozkładu HNO_2 . Należy pamiętać, że tlenki azotu mogą pojawić się w obecności innych amin, jeżeli w przeprowadzonej reakcji został użyty nadmiar NaNO_2 .

* Pojawienie się pomarańczowego zabarwienia roztworu (lub osadu chlorowodoru) pochodzi od C-nitrozoamin charakterystycznych produktów reakcji HNO_2 z aromatycznymi aminami III-rzędowymi. Wolne zasady, otrzymane przez zalkalizowanie tych chlorowodorów, dają intensywnie zielone zabarwienie.



5.5.4. Reakcja izocyjankowa (aminy I-rzędowe alifatyczne i aromatyczne)

I-rzędowe aminy alifatyczne i aromatyczne w środowisku zasadowym reagują z chloroformem tworząc izocyjanki. Powstający w reakcji izocyjanek ma własności toksyczne, dlatego reakcję prowadzi się tylko w uzasadnionych przypadkach po porozumieniu z asystentem!!!

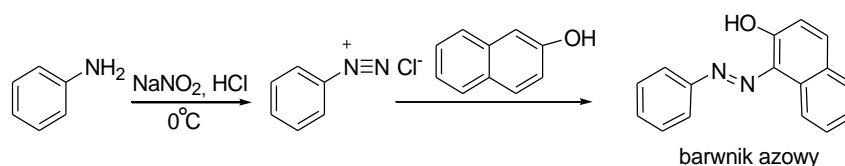


Wykonanie – reakcję należy wykonać pod dygestorium

Do roztworu 1-2 kropli (0,05-0,1 g) aminy w 3-5 kroplach CHCl_3 dodaje się 1-2 krople 5% roztworu KOH i ogrzewa ostrożnie do wrzenia. Wydziela się charakterystyczna, bardzo niemiła woń izocyjanku potwierdzająca rzędowość badanej aminy. Nie należy przekraczać podanych ilości aminy ze względu na toksyczne własności izocyjanków i ich nieprzyjemny zapach. Po pozytywnej reakcji izocyjanek należy natychmiast rozłożyć. W tym celu do próbki dodaje się ostrożnie 1 ml stężonego HCl , ogrzewa mieszaninę do wrzenia i dopiero wtedy wylewa zawartość próbki.

5.5.5. Reakcja tworzenia barwników azowych (aminy I-rzędowe aromatyczne)

Aminy aromatyczne I-rzędowe w reakcji z HNO_2 tworzą nietrwałe powyżej 5°C sole diazoniowe, które w niskiej temperaturze ulegają reakcji sprzęgania z fenolami, tworząc trwałe barwniki azowe. Reakcja ta jest charakterystyczna tylko dla amin aromatycznych I-rzędowych i pozwala odróżnić je od innych typów amin. Przebieg tej reakcji opisują poniższe równania:



Wykonanie:

W probówce 0,2 g lub 0,2 ml analizowanej aminy rozpuszcza się w 5 ml 10% roztworu HCl. Roztwór chłodzi się (lód z NaCl) poniżej 5°C i dodaje powoli (kroplami) 2 ml ochłodzonego (do 0°C) 10% roztworu NaNO₂, aż do dodatniej próby z papierkiem jodoskrobiowym. Barwa niebieska wskazuje na obecność wolnego kwasu azotowego(III). Temperatura reakcji nie może przekraczać 5°C. Tak przygotowany roztwór wkrapla się do również ochłodzonego do 0°C roztworu β-naftolu. Tworzy się pomarańczowoczerwony osad barwnika azowego.

Roztwór β-naftolu: 0,2 g β-naftolu w około 1 ml 5% roztworu NaOH

5.5.6. Reakcja z nitroprusydkiem sodu

Reakcja służy do rozróżnienia amin alifatycznych I- i II-rzędowych.

Wykonanie:

W dwóch probówkach umieszcza się po około 10 mg badanej substancji i 5 ml wody a następnie do jednej dodaje się 1 ml acetonu, a do drugiej 1 ml aldehydu octowego i do tak przygotowanych roztworów dodaje się po 2 krople 1% wodnego roztworu pentacyjanonitrozyżelazianu(III) sodu. W ciągu 2 min pojawia się charakterystyczne zabarwienie:

- dla amin alifatycznych I-rzędowych fioletowe wobec acetonu, a czerwone wobec aldehydu octowego,
- dla amin alifatycznych II-rzędowych wobec acetonu reakcja nie zachodzi, a po zalkalizowaniu roztworu zawierającego aldehyd octowy za pomocą 2% NaHCO₃ pojawia się zabarwienie niebieskie lub fioletowe.

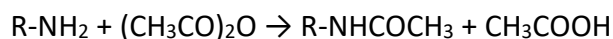
5.5.7. Reakcja Okhumi (III-rzędowe aminy alifatyczne)

Reakcją charakterystyczną dla trzeciorzędowych amin alifatycznych jest reakcja Okhumi. Związki te dają czerwone zabarwienie z odczynnikiem Okhumi otrzymanym przez rozpuszczenie na gorąco 1 g kwasu cytrynowego w 100 ml bezwodnika octowego. Chemizm reakcji nie jest znany.

5.5.8. Stałe pochodne amin

5.5.8.1. Pochodne acetylowe

Aminy pierwszo- i drugorzędowe, łatwo reagują z bezwodnikiem octowym.

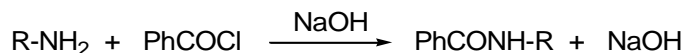


Wykonanie:

W kolbie stożkowej (50 ml) zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieścić ok. 0,5 g analizowanej aminy, 4 ml bezwodnika octowego oraz 4 krople stęż. H₂SO₄ i ogrzewać do wrzenia w ciągu 15 min. Po oziębieniu mieszaninę produktów wlewa się do około 20 ml zimnej wody,

umieszcza się w łaźni lodowej i dokładnie zobojętnia stałym Na_2CO_3 . Wydzielony osad acetylowej pochodnej odsącza się na lejku Büchnera. Odsączony osad przemywa się dokładnie wodą, a następnie krystalizuje z rozcieńczonego (70%) etanolu.

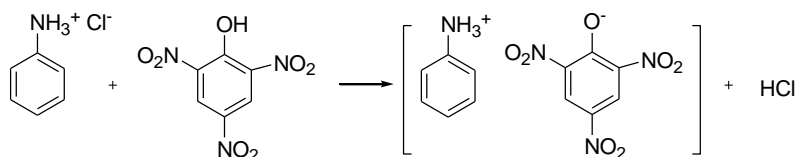
5.5.8.2. Pochodne benzoilowe



Wykonanie:

W zamkniętej kolbie okrągłodennej umieszcza się 0,5 g (lub 0,5 ml) aminy, 5 ml 10% NaOH, a następnie chłodząc kolbę w zimnej wodzie, wkrapla się ostrożnie 0,5 ml chlorku benzoilu. Kolbę wytrząsa się do zaniku zapachu chlorku benzoilu przez około 20 min. Należy często kontrolować papierkiem wskaźnikowym odczyn roztworu, który powinien być stale zasadowy. Jeżeli nie stwierdza się przebiegu reakcji, należy kolbę zaopatrzyć w chłodnicę zwrotną z rurką z chlorkiem wapnia i ogrzać na łaźni wodnej do jej zapoczątkowania. Następnie mieszaninę oziębia się na łaźni lodowej i wstrząsa aż do wydzielenia osadu. Osad odsącza się na lejku Büchnera, przemywa wodą i krystalizuje z etanolu.

5.5.8.3. Pochodne pikrynowe – sole z kwasem pikrynowym



Wykonanie:

W probówce rozpuszcza się 0,5 g (lub 0,5 ml) aminy w 0,5 ml wody z dodatkiem dwóch kropli 15% HCl, a następnie miesza z 2 ml nasyconego wodnego roztworu kwasu pikrynowego. W utworzeniu osadu pomaga ogrzewanie roztworu do wrzenia przez kilka minut i odstawienie do powolnego ostygnięcia. Innym sposobem otrzymania pikrynianu jest rozpuszczenie 0,5 g (lub 0,5 ml) aminy w 5 ml etanolu i dodanie 5 ml nasyconego, etanolowego roztworu kwasu pikrynowego a następnie ogrzewanie mieszaniny do wrzenia przez 20 min. Jeżeli pochodna wymaga krystalizacji to jako rozpuszczalnika używa się etanolu.

5.6. Wykrywanie związków nitrowych

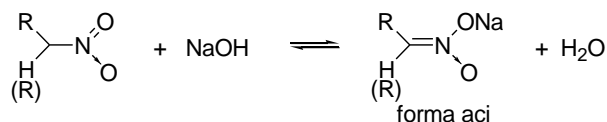
Aromatyczne związki nitrowe są ciałami stałymi o żółtym zabarwieniu, nie rozpuszczają się w wodzie i często wykazują lotność z parą wodną. Alifatyczne związki nitrowe są przeważnie cieciami. Niezależnie od rzędowości związki nitrowe ulegają w roztworze obojętnym redukcji do pochodnych hydroksyloaminy, a w roztworze kwaśnym redukcji do amin i to zwykle stanowi podstawę ich identyfikacji. Po redukcji w roztworze kwaśnym identyfikuje się związki nitrowe za pomocą reakcji typowych dla amin.

5.6.1. Reakcja z wodorotlenkiem sodu

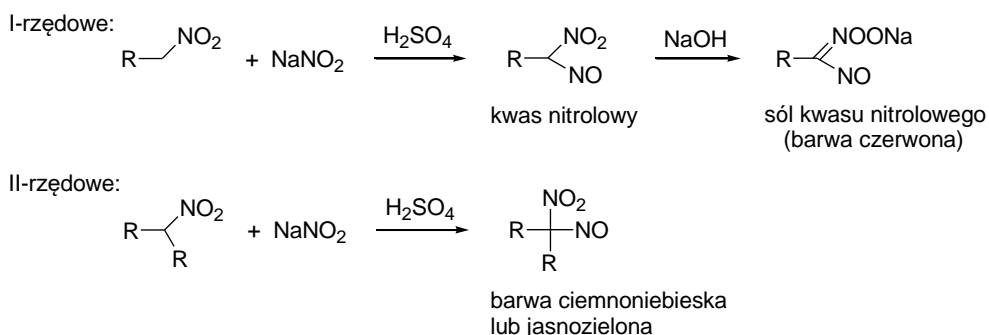
Próba ta umożliwia rozróżnienie rzędowości związków nitrowych.

Wykonanie:

Do ok. 0,2 g analizowanego związku dodaje się 0,5 ml 50% roztworu NaOH i wstrząsa kilka minut. Rozpuszczeniu ulegają alifatyczne nitrozwiązki I- i II-rzędowe, III-rzędowe i aromatyczne pozostają nierozpuszczone. Rozpuszczalność polega na utworzeniu soli sodowej formy *aci* zgodnie z równaniem:

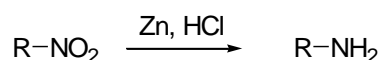


W celu rozróżnienia I- i II-rzędowych nitrozwiązków do otrzymanego uprzednio roztworu dodaje się najpierw 1 ml nasyconego roztworu NaNO₂, a następnie kroplami 10% H₂SO₄ (roztwór nadal powinien pozostać zasadowy), obserwując zabarwienie i jego ewentualne zmiany. Nitrozwiązki I-rzędowe dają intensywne czerwone zabarwienie, zanikające po silniejszym zakwaszeniu roztworu, natomiast II-rzędowe dają zabarwienie ciemnoniebieskie lub jasnozielone.



5.6.2. Redukcja cynkiem do amin

Reakcje tę przeprowadza się mając absolutną pewność, że badana próbka nie jest aminą! Związki nitrowe w środowisku kwaśnym ulegają redukcji do amin pierwszorzędowych zgodnie z równaniem:



Wykonanie – reakcję należy wykonać pod dygestorium

W małej erlenmajerce ustawionej na mieszadle magnetycznym do około 0,5 g badanego związku dodaje się 10 ml stężonego HCl rozcieńczonego wodą w stosunku 1:1, a następnie, małymi porcjami pył cynkowy, aż do ustania samorzutnej reakcji. Redukcję związków nitrowych o temperaturze topnienia wyższej od 100°C przyspiesza dodatek 1 ml etanolu. Roztwór miesza się jeszcze przez 15 min, a następnie pozostawia na 10 min bez mieszania i po tym czasie dekantuje się roztwór znad cynku. W otrzymanym produkcie należy potwierdzić obecność grupy aminowej znanymi metodami (patrz rozdział 5.5.1.). Reakcje pozwalające stwierdzić obecność grupy aminowej wykonuje się bezpośrednio w otrzymanym po redukcji roztworze lub wydziela się z niego oleistą aminę przez zalkalizowanie 30% NaOH. Najwygodniej oddzielenie oleistej aminy od roztworu przeprowadzić w rozdzielniku.

5.7. Wykrywanie związków o charakterze kwaśnym – fenole

Fenole są krystalicznymi substancjami stałymi z wyjątkiem *o*-bromofenolu, *o*-chlorofenolu, *m*-krezolu i *m*-metoksyfenolu. Rozpuszczalność w wodzie fenoli rośnie ze wzrostem liczby grup wodorotlenowych w cząsteczce. Fenole dają w obrębie grupy OH reakcje podobne do reakcji alkoholi, jednak w odróżnieniu od nich dysocjują w wodzie i wykazują kwaśny charakter. Jako związki aromatyczne fenole ulegają łatwo (aktywujący wpływ grupy OH) typowym reakcjom substytucji elektrofilowej, z których bromowanie i sprzęganie ze związkami diazoniowymi jest wykorzystywane w analizie. Przydatne do identyfikacji fenoli są również barwne kompleksy z FeCl₃ oraz produkty reakcji z mieszaniną kwasu azotowego(III) i stężonego siarkowego(VI). Cechą fenoli jednowodorotlenowych jest charakterystyczny zapach.

5.7.1. Badanie odczynu – próba ogólna

Ze względu na dużo większą w porównaniu z alkoholami kwasowość fenoli ich wodne roztwory często wykazują odczyn kwaśny.

Jako słabe kwasy fenole rozpuszczają się w 5% roztworze NaOH, ale są nierozpuszczalne w 5% NaHCO₃ (w przeciwieństwie do kwasów). Wyjątek stanowią fenole zawierające w pierścieniu grupy silnie elektroujemne (kwas pikrynowy, 2,4-dinitrofenol).

Wykonanie:

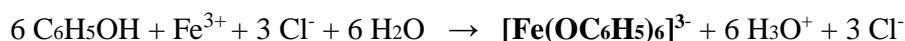
Niewielką ilość badanej próbki (ok. 50 mg) należy rozpuścić w wodzie a w wypadku słabej rozpuszczalności w wodnym roztworze etanolu i zbadać odczyn za pomocą papierka uniwersalnego. Rozpuszczalność w NaOH oraz NaHCO₃ powinna być zbadana już wcześniej, podczas przypisywania związku do określonej grupy rozpuszczalności.

5.7.2. Próba z FeCl₃

Fenole z solami żelaza(III) dają barwne kompleksy (fioletowe, granatowe, purpurowe, zielone – barwa zależy od podstawników w pierścieniu aromatycznym).

Kilka kryształków badanego fenolu rozpuszcza się w 2 ml wody destylowanej. Do otrzymanego roztworu dodaje się kilka kropli 2% roztworu FeCl₃. Obserwować zmiany zabarwienia w momencie dodawania odczynnika.

Niestety, większość nitrofenoli z FeCl₃ nie daje pozytywnej reakcji. Związki zdolne do enolizacji, w których udział formy enolowej jest stosunkowo duży (przykładowo acetyloacetone, acetylooctan etylu), też dają barwne (najczęściej czerwone) produkty reakcji z FeCl₃.



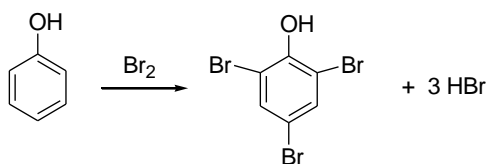
Wykonanie:

Około 0,05 g, lub 3 krople fenolu rozpuszcza się w 3 ml wody lub 40% etanolu. Następnie dodaje się po jednej kropli 1% wodny roztwór FeCl₃ obserwując pojawienie się zabarwienia (czasem tylko przejściowego) po dodaniu każdej kolejnej kropli (maksymalnie 5 kropli). Fenole dają zabarwienia zielone, niebieskie, fioletowe lub purpurowe, zabarwienie żółte i

pomarańczowe jest negatywnym wynikiem próby. W razie wątpliwości dla porównania wskazane jest wykonanie ślepej próby ze stosowanymi odczynnikami bez dodatku badanej substancji.

5.7.3. Próba z bromem

Woda bromowa (roztwór Br_2 w wodzie) ma barwę brązową lub brązowo-brunatną. Obecność aktywującej pierścień grupy hydroksylowej sprawia, że fenole reagują z bromem w temperaturze pokojowej bez użycia katalizatorów. Jeżeli do bromowania używa się wody bromowej, wytrąca się trudno rozpuszczalny w wodzie, najczęściej biały lub lekko żółty produkt bromowania. Produkty reakcji bromowania są również używane do identyfikacji fenoli jako ich stałe pochodne. Monohydroksylowe fenole tworzą polibromopochodne:



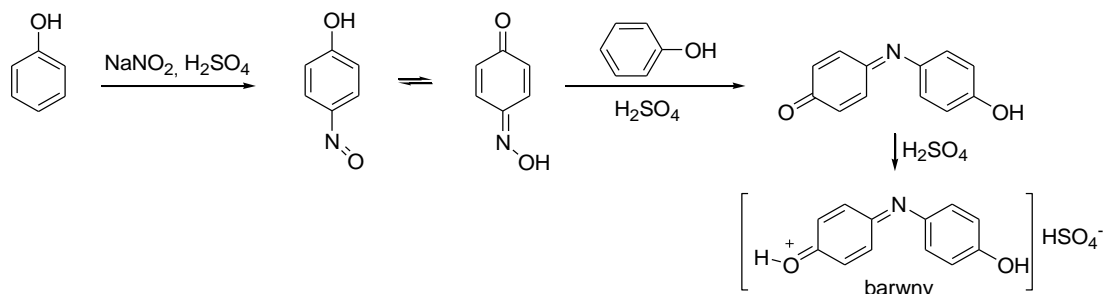
Reakcja ta jest wykorzystywana również do ilościowego oznaczania fenolu w wodzie.

Wykonanie:

Do próbki ok. 0,2 g badanego związku (wielkości połowy ziarnka grochu) rozpuszczonej w dodać 5 ml wody (lub etanolu) dodawać kroplami wodę bromową, aż do utrzymania się jasnożółtej barwy. Na obecność fenolu wskazuje początkowe odbarwienie wody bromowej i następnie wydzielanie osadu produktu bromowania. Dodanie większej ilości odczynnika pozwala na otrzymanie osadu tribromopochodnej fenolu.

5.7.4. Próba indofenolowa (fenole nieposiadające podstawników jednocześnie w pozycji *orto* i *para*)

Fenole w mieszaninie kwasów HNO_2 i stęż. H_2SO_4 tworzą barwne produkty C-nitrozowania w położeniu *para*. Reakcję tę dają też związki aromatyczne z grupami dialkiloaminowymi. Negatywny wynik tej reakcji dają nitrofenole i fenole z grupami $-\text{CHO}$, $-\text{COOH}$ i $-\text{COCH}_3$. Przebieg reakcji pokazano na przykładzie fenolu.



Wykonanie – reakcję należy wykonać pod dygestorium

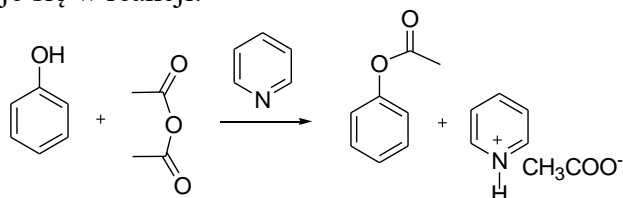
Około 0,02 g (lub 2 krople) fenolu umieścić w suchej probówce. Dodać kryształek NaNO_2 i zadać kilkoma kroplami stężonego kwasu siarkowego – zawartości próbki nie należy mieszać. W wypadku obecności fenolu po kilku minutach pojawia się zabarwienie ciemnozielone lub

ciemnoniebieskie. Dodanie kilku kropli wody powinno zmienić barwę na czerwono-brązową. Zalkalizowanie rozcieńczonym roztworem NaOH przywraca niebiesko-zielone zabarwienie.

5.7.5. Stale pochodne fenoli

5.7.5.1. Octany

Octany fenoli otrzymuje się w reakcji:

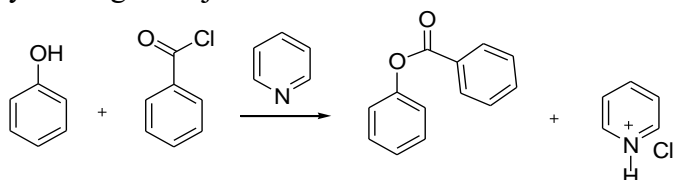


Wykonanie – reakcję należy wykonać pod dygestorium

W suchej kolbie okrągłodennej o pojemności 50 ml, umieszczonej pod chłodnicą zwrotną umieścić ok. 0,5 g badanego fenolu oraz 1,5 ml bezwodnej pirydyny. Ostrożnie dodać 3 ml bezwodnika octowego (najlepiej przez chłodnicę). Po ustaniu samorzutnej reakcji mieszaninę ogrzewa się 20 min pod chłodnicą zwrotną. Najszybciej reagują fenole polihydroksylowe. Po ochłodzeniu mieszaninę reakcyjną wlewa się do ok. 30 ml wody z lodem (hydroliza nadmiaru bezwodnika) i dodaje kroplami roztwór 2 M HCl do zaniku zapachu pirydyny. Osad odsącza się, przemywając na sączku wodą aż do zaniku kwaśnego pH i krystalizuje z etanolu. Po wysuszeniu produktu mierzy się temperaturę topnienia i porównuje z wartościami z literatury.

5.7.5.2. 3,5-Dinitrobenzoesany

Chlorek 3,5-dinitrobenzoilu w reakcji z fenolami w roztworze zawierającym pirydynę tworzy 3,5-dinitrobenzoesany według reakcji:



Wykonanie – reakcję należy wykonać pod dygestorium

W suchej kolbie okrągłodennej o pojemności 50 ml, umieszczonej pod chłodnicą zwrotną umieścić ok. 0,5 g badanego fenolu oraz 2 ml bezwodnej pirydyny, następnie dodać 1,3 g chlorku 3,5-dinitrobenzoilu i ogrzewać przez 30 min. Po ochłodzeniu mieszaninę reakcyjną wlewa się do ok. 40 ml 2 M HCl (do zaniku zapachu pirydyny). Następnie osad odsącza się i przemywa najpierw 10 ml 1 M Na₂CO₃, a następnie wodą do odczynu obojętnego. Osad krystalizuje z czystego lub rozcieńczonego etanolu.

5.7.5.3. Pochodne bromowe

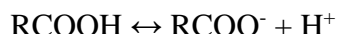
Wykonanie – reakcję należy wykonać pod dygestorium

W małej erlenmajerce do 0,5 g analizowanego fenolu rozpuszczonego lub zawieszonego w 10 ml wody dodaje się powoli, ciągle wstrząsając po kilka kropli wody bromowej, aż do uzyskania

trwałego, żółtego zabarwienia roztworu. Następnie dodaje się około 30 ml wody i wstrząsa mocno, aby rozbić większe grudki wydzielającego się osadu. Osad ten odsącza się, przemywa rozcieńczonym roztworem NaHSO₃ a potem wodą i krystalizuje z czystego lub rozcieńczonego etanolu.

5.8. Wykrywanie związków o charakterze kwaśnym – kwasy karboksylowe

Rozpuszczalność analizowanego związku w zasadach, zwłaszcza słabych (5%-wy roztwór NaHCO₃) świadczy o obecności kwasu. Kwasy rozpuszczalne w wodzie wykazują kwaśny odczyn roztworu dzięki dysocjacji zgodnej z równaniem:



W analizie kwasów najważniejszą rolę spełniają reakcje zachodzące w obrębie grupy karboksylowej. Wykorzystywane są te, które wiążą się bezpośrednio z charakterem kwasowym tych związków (próba ze wskaźnikiem uniwersalnym, próba jodan-jodek, próba z NaHCO₃). Charakterystyczną reakcją jest też estryfikacja. Inne reakcje analityczne związane są z indywidualnymi właściwościami różnych rodzajów kwasów.

5.8.1. Badanie odczynu

5.8.1.1. Próba ze wskaźnikiem uniwersalnym

Wykonanie:

Papierek uniwersalnym zanurza się na sekundę w wodnym roztworze badanego związku, odczeka chwilę i porównuje zabarwienie z wzorcową skalą barw odpowiadających określonej zakresowi pH. Do związków nierozpuszczalnych w wodzie należy najpierw dodać kilka kropli alkoholu lub acetonu a następnie dopiero wody. Równoległe można przygotować próbę ślepa z wodą i użytym rozpuszczalnikiem oraz kroplą ciekłego wskaźnika.

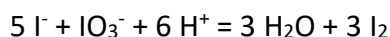
5.8.1.2. Próba z fenoloftaleiną

Wykonanie:

Na szkiełku zegarkowym umieszcza się jedną kroplę 0,01 M roztworu NaOH, jedną kroplę etanolowego roztworu fenoloftaleiny i 4 krople wody. Następnie wprowadza się 4 krople lub niewielką ilość dobrze sproszkowanej badanej substancji. Związki słabo rozpuszczalne w wodzie należy rozpuścić lub zawiesić w 3 kroplach etanolu. Odbarwienie fenoloftaleiny potwierdza charakter kwasowy związku.

5.8.1.3. Próba jodan-jodek na obecność słabych kwasów

Próba pozwala wykryć obecność słabych kwasów, gdy reakcja ze wskaźnikiem nie jest jednoznaczna. W warunkach reakcji obecność kwasu powoduje powstawanie wolnego jodu wg równania:



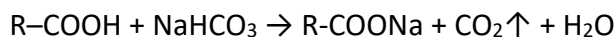
Wolny jod powoduje niebieskie zabarwienie skrobi.

Wykonanie:

Około 5 mg badanej substancji w postaci nasyconego roztworu w 2-3 kroplach etanolu zadaje się w probówce 2 kroplami 2% roztworu KI i 2 kroplami 4% roztworu KIO₃. Probówkę zamyka się zwitkiem waty i ogrzewa przez minutę we wrzącej łaźni wodnej. Po oziębieniu dodaje się 4 krople 0,1% roztworu skrobi. W razie obecności kwasów powstaje fioletowe lub fioletowoniebieskie zabarwienie.

5.8.2. Reakcja z NaHCO₃

W reakcji tej można odróżnić kwasy od większości fenoli.



Wykonanie:

Około 1 ml 5% roztworu NaHCO₃ umieszcza się w probówce i dodaje kroplę (lub 0,01 g) substancji badanej. Wydzielanie się CO₂, w postaci pęcherzyków w roztworze lub na ściankach probówki, wskazuje na obecność kwasu.

5.8.3. Reakcja z FeCl₃

Kwasy z rozcieńczonym roztworem chlorku żelaza(III) dają wyraźnie zabarwione roztwory lub osady (czerwonawe, brunatne, żółte, niebieskie). Kwas salicylowy da czerwonofioletowe zabarwienie, charakterystyczne dla fenoli.

Wykonanie:

Niewielką ilość badanego kwasu rozpuszcza się w rozcieńczonym roztworze amoniaku. Nadmiar amoniaku usuwa się przez ogrzanie roztworu do wrzenia. Następnie roztwór chłodzi się, dodaje kilka kropli 3% obojętnego roztworu FeCl₃ i obserwuje powstające zabarwienie. Za pozytywny efekt reakcji uznaje się powstanie brudnopomarańczowego, brunatnego, żółtego lub niebieskiego zabarwienia roztworu lub wypadającego osadu. W razie wątpliwości należy wykonać ślepą próbę i porównać zabarwienia w obu probówkach.

5.8.4. Reakcja z rezorcyną

Reakcja ta jest charakterystyczna dla kwasów 1,2-dikarboksylowych oraz ich pochodnych (estrów, bezwodników, imidów). Związki te, w obecności H₂SO₄, tworzą z rezorcyną barwniki typu fluoresceiny, które w środowisku alkalicznym wykazują żółtoczerwoną fluorescencję w świetle dziennym, a zieloną lub niebieską w nadfioletowym.

Wykonanie:

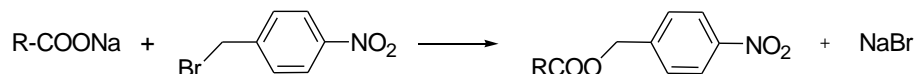
Około 10 mg badanej substancji miesza się z niewielką ilością rezorcyny, dodaje kilka kropli stęż. H₂SO₄, po czym mieszaninę ogrzewa się przez 10 min we wrzącej łaźni wodnej (utrzymanie stałej temperatury jest konieczne dla właściwego przebiegu reakcji). Uzyskaną mieszaninę rozpuszcza się ostrożnie w wodzie, a następnie wkrapla się 20% roztwór NaOH do zasadowego pH. Pojawienie się fluorescencji, szczególnie intensywnej w świetle nadfioletowym, wskazuje na obecność kwasu 1,2-dikarboksylowego. Równoległe do próby

badanej przeprowadza się ślepą próbę z tymi samymi odczynnikami ale bez badanej substancji, gdyż produkty rozpadu samej rezorcyny dają zieloną fluorescencję.

5.8.5. Stałe pochodne kwasów

5.8.5.1. Estry *p*-nitrobenzylowe

Sole kwasów karboksylowych reagują z chlorkiem lub bromkiem *p*-nitrobenzylu, dając odpowiednie estry *p*-nitrobenzylowe wg reakcji:



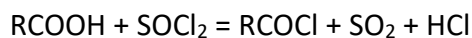
Wykonanie:

Najpierw sporządza się słabo kwaśny roztwór soli sodowej badanego kwasu. W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 ml umieszcza się 0,5 g badanego kwasu oraz 5 ml wody. Następnie dodaje się kroplami 5% roztwór NaOH, aż do pH 6 (kontrolować wskaźnikiem uniwersalnym). Roztwór nie może być alkaliczny, bowiem alkalia hydrolizują bromek *p*-nitrobenzylowy. Do roztworu w kolbce dodaje się roztwór 1,3 g bromku *p*-nitrobenzylowego w 10 ml etanolu. Kolbę zaopatruje się w chłodnicę zwrotną, ogrzewa do wrzenia i jeśli roztwór pozostaje mętny, dodaje się kroplami etanol, aż do uzyskania klarownej cieczy. Mieszaninę ogrzewa się nadal przez 1-3 godz., zależnie od zasadowości kwasu (ok. 1 godz. na każdą grupę karboksylową). Wydzielony po ochłodzeniu ester (czasem do wydzielenia konieczny jest dodatek kilku kropli wody) odsącza się i przemywa ostrożnie ochłodzonym 70% etanolem, suszy i krystalizuje z 70% etanolu.

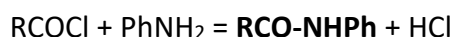
Przy wszystkich operacjach zalecana jest ostrożność, gdyż halogenki p-nitrobenzylowe są związkami silnie drażniącymi błony śluzowe i drażniąco działają na skórę.

5.8.5.2. Amidy z aniliną lub *p*-toluidyną

Anilidy i *p*-toluidydy kwasów karboksylowych otrzymuje się przeprowadzając kwas najpierw w odpowiedni chlorek kwasowy za pomocą chlorku tionylu:



Otrzymany w tej reakcji chlorek kwasowy pod wpływem aniliny lub *p*-toluidyny przechodzi w odpowiedni amid kwasowy:



Wykonanie – reakcję należy wykonać pod dygestorium

W kolbie o pojemności 25 ml zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną (zabezpieczoną przed dostępem wilgoci rurką z CaCl₂) ogrzewa się 1 g kwasu z 5 ml świeżo destylowanego chlorku tionylu przez 30 min. Po tym czasie wymienia się chłodnicę zwrotną na chłodnicę destylacyjną i oddestylowuje się nadmiar SOCl₂ (temp. wrzenia 78°C). Jeżeli temperatura chlorku kwasowego jest zbliżona do temperatury wrzenia SOCl₂, chlorek tionylu można rozłożyć przez dodanie kwasu mrówkowego:



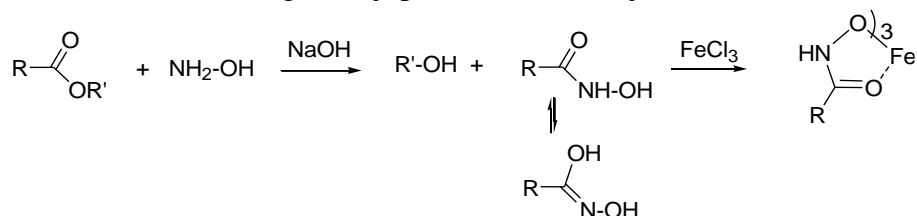
5.9. Wykrywanie estrów

Estry charakteryzują się przyjemnym, często owocowym zapachem. Estry alifatyczne przeważnie są ciekłe. Czyste estry są substancjami obojętnymi – nie zmieniają zabarwienia papierka wskaźnikowego.

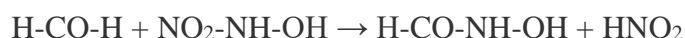
Do identyfikacji estrów używa się reakcji z hydroksyloaminą i FeCl_3 . Próbę wykonuje się po negatywnych testach na aldehydy i ketony.

5.9.1. Próba z hydroksyloaminą

Podobnie jak bezwodniki i chlorki kwasowe, estry reagują z hydroksyloaminą, tworząc kwasy hydroksamowe, które z FeCl_3 dają sole kompleksowe o charakterystycznym czerwonym lub fioletowym zabarwieniu. Przebieg reakcji przedstawia reakcja:



Dla porównania kwasy hydroksamowe powstają również w reakcji aldehydów z nitrohydroksyloaminą. Jest to reakcja redox!



Reakcja ta może służyć do wykrywania nawet małych ilości aldehydów.

Wykonanie:

Do 0,5 ml badanej substancji dodać 0,5 ml nasyconego etanolowego roztworu chlorowodoru hydroksyloaminy oraz 4 ml 2 M etanolowego roztworu NaOH. Ogrzać do rozpoczęcia reakcji (pieni się). Następnie otrzymaną mieszaninę zakwasić 2 M HCl i dodać kilka kropli 1% roztworu FeCl_3 . Obserwować pojawienie się charakterystycznego zabarwienia.

Uwaga: w środowisku alkalicznym kwasy hydroksamowe powstają tylko w przypadku estrów. W przypadku chlorków i bezwodników reakcje prowadzimy w środowisku kwasowym.

5.9.2 Pochodne estrów

Pochodne estrów mogą zostać uzyskane po uprzedniej zasadowej hydrolizie: kwas karboksylowy i ester kwasu 3,5-dinitrobenzoesowego alkoholu. Hydrazyd kwasu karboksylowego uzyskuje się po hydrazynolizie estrów.

5.10. Wykrywanie amidów pierwszorzędowych i nityli

Nitryle są cieczeniami lub ciałami stałymi o charakterystycznym zapachu. Nitryle alifatyczne rozpuszczają się w wodzie, natomiast aromatyczne nie. Nitryle wydzielają amoniak po ogrzaniu z alkali. Amidy są przeważnie substancjami stałymi, rozpuszczalnymi w alkoholu oraz

eterze. Niższe amidy rozpuszczają się w wodzie. Grupa NH₂ w amidach nie ma charakteru zasadowego.

5.10.1. Hydroliza

Najbardziej charakterystyczna dla amidów oraz nityli alifatycznych i aromatycznych jest reakcja hydrolizy w środowisku kwaśnym lub zasadowym. Zwykle nityle ulegają hydrolizie trudniej niż amidy. Najczęściej hydrolizę nityli wykonuje się 50-75% roztworem H₂SO₄, podczas gdy do hydrolizy amidów używa się 10% kwasu.

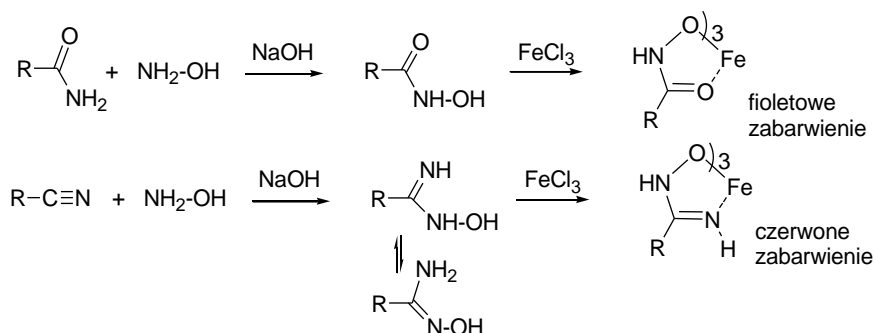


Wykonanie:

Do ok. 0,5 g analizowanego związku dodać 3 ml 10% NaOH i silnie wytrząsać przez kilka minut. Po zapachu można wyczuć wydzielanie się odpowiedniej aminy lub amoniaku. Zwilżony wodą uniwersalny papierek wskaźnikowy umieszczony na wylocie próbki barwi się na niebiesko. Nityle wymagają do hydrolizy bardziej stężonego ługu lub ogrzania mieszaniny reakcyjnej.

5.10.2. Próba z hydroksyloaminą

Amidy (proste lub podstawione) a także nityle reagują z hydroksyloaminą, dając odpowiednio kwasy hydroksamowe lub imidy kwasów hydroksamowych. W reakcji z FeCl₃ te pierwsze dają fioletowo zabarwione kompleksy, natomiast te drugie barwią się na czerwono. Dla obu grup związków reakcja przebiega dość wolno i wymaga ogrzewania w wysokowrzącym rozpuszczalniku.



Wykonanie:

Do 0,2 g badanej substancji dodać 0,5 ml nasyconego etanolowego roztworu chlorowodoru hydroksyloaminy oraz 2 ml 5 M etanolowego roztworu NaOH i ok. 3 ml glicerolu jako rozpuszczalnika. Ogrzać do wrzenia przez kilka minut, a następnie ochłodzić. Otrzymaną mieszaninę zakwasić 2 M HCl i dodać kilka kropli 1% roztworu FeCl₃. Obserwować pojawienie się charakterystycznego zabarwienia. Czerwonobrazowe zabarwienie świadczy o obecności nitylu. Fioletowe zabarwienie świadczy o obecności amidu alifatycznego.

5.10.3. Pochodne krystaliczne amidów

Kwas karboksylowy i pochodne amin uzyskanych po zasadowej (wykonanie powyżej) lub kwaśnej hydrolizie amidu.

Wykonanie:

Do ok. 0,5 g amidu dodaje się 3 ml 10 % H_2SO_4 i ogrzewa do wrzenia pod chłodnicą zwrotną. Ochłodzoną mieszaninę reakcyjną rozcieńcza się 5 ml wody, przenosi do rozdzielacza i ekstrahuje 3 × 5ml dichlorometanu. Połączone fazy organiczne suszy się nad bezwodnym Na_2SO_4 . Po odsączeniu środka suszącego i odparowaniu rozpuszczalnika na wyparce otrzymujemy surowy kwas karboksylowy.

5.10.4. Pochodne krystaliczne nityli

Po hydrolizie nitylu uzyskuje się Amid lub kwas karboksylowy.

Wykonanie:

Hydroliza do amidu – W kolbce umieścić ok. 0,5 g nitylu oraz 2 ml stężonego H_2SO_4 i ogrzewać w $80^\circ C$ ok. 5 minut. Po tym czasie wylać całość do ok. 20 ml wody. Wydzielony osad odsączyć i ew. krystalizować z wody.

Hydroliza do kwasu – wykonujemy analogicznie do hydrolizy amidów.

5.11. Wykrywanie eterów

Etery znane są ze swej bierności chemicznej. Suche (bezwodne) nie reagują z metalicznym sodem, co odróżnia je od alkoholi. W odróżnieniu od estrów nie reagują z rozcieńczonymi roztworami kwasów i wodorotlenków. Niska reaktywność powoduje, że trudno je odróżnić od węglowodorów. Rozpuszczają się w zimnym stężonym H_2SO_4 . W identyfikacji pomagają wtedy wykonanie próby na zawartość tlenu – próby jodowej lub próby Ferrox (z heksatiocyjanożelazinem żelazowym). Próba rozpuszczania w stężonym HCl zwykle pomaga w określeniu budowy eterów. Etery mieszane są zazwyczaj bardziej reaktywne (bo rozpuszczalne).

5.11.1. Próba ze stężonym kwasem siarkowym

Jeśli badany związek nie daje reakcji charakterystycznych na wykrywanie głównych grup funkcyjnych, może być eterem.

Wykonanie:

W małej próbówce umieścić ok. 0,5 g badanego związku, ochłodzić w lodzie i dodać 1 ml stężonego H_2SO_4 . Obserwować ew. zmiany barwy. Jeśli próbka rozpuściła się, a następnie po przelaniu do próbówki z zimną wodą znów oddzieli się pierwotna substancja (druga warstwa) wskazuje to na obecność eteru.

5.11.2. Próba jodowa – wykrywanie tlenu

Próba ta daje pewne wyniki tylko pod nieobecność innych heteroatomów.

Wykonanie:

Do ok. 0,5 ml roztworu jodu w disiarczku węgla (o barwie jasnopurpurowej) dodaje się 0,2 ml badanej substancji (lub jej roztwór w CHCl_3). W obecności eterów następuje zmiana barwy na brązową. Węglowodory aromatyczne nie zmieniają pierwotnej barwy odczynnika. Węglowodory alifatyczne tworzą drugą warstwę (brązową) obok purpurowego roztworu jodu.

5.11.3. Próba Ferrox – odróżnienie od związków beztlenowych

Przebiega dodatnio dla eterów, ale też alkoholi, estrów, aldehydów, ketonów i amidów. Pozwala więc odróżnić węglowodory od związków zawierających tlen. Heksatiocyjanożelazyn żelazowy jest solą nierozpuszczalną w węglowodorach i chlorowcopochodnych, lecz rozpuszczalną w związkach zawierających tlen. Daje przy tym intensywne czerwone zabarwienie.

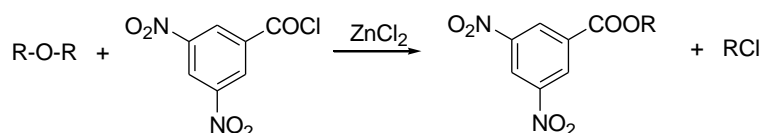
Wykonanie:

Ok. 0,1 g badanej substancji ciekłej umieszcza się w małej probówce (substancję stałą rozpuścić w beztlenowym rozpuszczalniku, np. CHCl_3 lub benzenie). Do probówki wrzucić papierek odczynnikowy (bibuła nasączona solą Ferrox). Pojawienie się intensywnej ciemnoczerwonej barwy wskazuje na obecność związków zawierających tlen.

Papierek Ferrox – 0,3 g siarczanu żelazowoamonowego rozpuszcza się w 5 ml wody i dodaje 0,5 g rodanku potasowego. Po wymieszaniu w uzyskanym roztworze zanurza się na 5 min pasek bibuły. Suszy się go, tnie na małe kawałeczki i przechowuje do czasu użycia w ciemnej butelce.

5.11.4. Pochodne krystaliczne eterów alkilowych

Jedną z nielicznych reakcji eterów (pozwalającą na otrzymywanie ich stałych pochodnych) jest reakcja z chlorkiem kwasu 3,5-dinitrobenzoesowego, wobec ZnCl_2 . Symetryczne etery alifatyczne mogą być przekształcone w stałe estry. Metoda ta nie nadaje się do eterów mieszanych.



Wykonanie:

W kolbce zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieścić ok. 1 g eteru z 0,15 g sykiego bezwodnego ZnCl_2 , a następnie dodać 0,5 g chlorku kwasu 3,5-dinitrobenzoesowego i ogrzewać do wrzenia przez 1 godzinę. Po ochłodzeniu mieszaninę reakcyjną przenieść do większego naczynia i dodać ok. 10 ml 5% roztworu Na_2CO_3 (przepłukać też kolbkę). Ponownie ogrzać do temp. 90-100°C przez 2 minuty. Po ochłodzeniu odsączyć wydzielony osad.

5.12. Wykrywanie węglowodorów nienasyconych

Węglowodory nasycone nie rozpuszczają się na zimno w stężonym kwasie siarkowym. Węglowodory nienasycone rozpuszczają się powoli: roztwór ogrzewa się, ciemnieje, następuje zwęglenie, wydziela się SO_2 .

5.12.1. Rozpuszczanie jodu

Jod rozpuszczony w węglowodorach daje zabarwienie różowofioletowe.

5.12.2. Próba Baeyera z manganianem(VII) potasu

Związki nienasycone reagują z KMnO_4 w środowisku słabo alkalicznym lub obojętnym utleniając się do glikoli, przy czym mangan z siódmego przechodzi na czwarty stopień utlenienia zgodnie z równaniem:



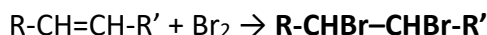
Wykonanie – reakcję należy wykonać pod dygestorium

Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej. Około 0,1 g badanej substancji rozpuszcza się w wodzie lub acetonie i zadaje 0,5 ml 1 M roztworu Na_2CO_3 . Następnie dodaje się kilka kropli rozcieńczonego (1-2%) roztworu KMnO_4 . Szybkie odbarwienie i wydzielanie się brunatnego osadu MnO_2 może świadczyć o obecności wiązań nienasyconych.

Uwaga! pozytywny wynik w tej próbie mogą dać wszystkie związki ulegające utlenieniu między innymi alkohole, fenole, aldehydy, cukry, aminy aromatyczne, kwas mrówkowy.

5.12.3. Przyłączenie bromu

Brom ulega addycji do wiązań nienasyconych, dając odpowiednie dibromopochodne.



Pozytywny wynik tej reakcji dają też pochodne aromatyczne z podstawnikami aktywującymi np. fenol, anilina (nieaktywowane areny zwykle nie dają reakcji).

Wykonanie:

Około 0,1 g badanej substancji rozpuszcza się w 2 ml rozpuszczalnika organicznego (CHCl_3 , CCl_4 , lodowaty CH_3COOH) i wstrząsając, dodaje kroplami roztwór bromu w takim samym rozpuszczalniku (o charakterystycznym brązowym zabarwieniu). Obecność wiązań nienasyconych poznaje się po odbarwieniu roztworu bromowego.

5.13. Wykrywanie aminokwasów

Aminokwasem w ścisłym znaczeniu tego słowa jest każdy związek zawierający w cząsteczce grupę aminową i dowolną grupę kwasową ($-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$), ale potocznie nazwa ta odnosi się do kwasów aminokarboksylowych z grupą NH_2 w położeniu α względem grupy COOH . Aminokwasy typu $\text{H}_2\text{N-CH(R)-COOH}$ są dobrze rozpuszczalne w wodzie, gorzej w alkoholu i praktycznie nierozpuszczalne w odczynnikach niepolarnych. Roztwory wodne aminokwasów mają przeważnie odczyn obojętny. Wszystkie aminokwasy ulegają rozkładowi w temp. 120-300°C.

Nomenklatura systematyczna nie jest stosowana do aminokwasów białkowych. Wszystkie aminokwasy występujące w białkach mają nazwy zwyczajowe, które są powszechnie stosowane. Aminokwasy są typowymi związkami amfoterycznymi, ponieważ z powodu obecności grup aminowych i karboksylowych są jednocześnie kwasami i zasadami. W stanie stałym aminokwasy istnieją wyłącznie w postaci soli wewnętrznych, powstających w wyniku przeniesienia protonu od kwaśnej grupy COOH do zasadowej grupy NH₂. Cząsteczki tego rodzaju soli wewnętrznych są nazywane jonami dwubiegunowymi lub obojnaczymi.

Aminokwasy białkowe należą do szeregu L i na węglu α posiadają konfigurację absolutną S (za wyjątkiem: cysteiny (R) i glicyny, która nie jest optycznie czynna).

5.13.1. Reakcja z NaHCO₃

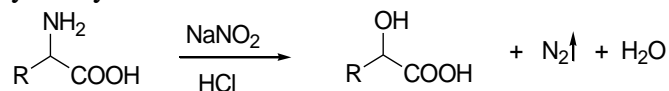
Ze względu na amfoteryczny charakter aminokwasów ich grupa karboksylowa reaguje z NaHCO₃ wolniej niż dla zwykłych kwasów karboksylowych.

Wykonanie:

Do ok. 0,05 g próbki dodaje się 2 ml 5% roztworu NaHCO₃ i mieszaninę wstrząsa się energicznie. Bąbelki dwutlenku węgla zaczynają wydzielać się dopiero po upływie 2-3 minut (w odróżnieniu od kwasów oraz fenoli).

5.13.2. Reakcja z azotanem(III) sodu

Aminokwasy z grupą NH₂ w reakcji z azotanem(III) sodu reagują podobnie do amin I-rzędowych. W reakcji tej, wobec mocnego kwasu mineralnego wydziela się azot i powstają odpowiednie hydroksykwasy.



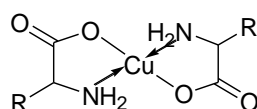
Wykonanie:

Próbkę aminokwasu (0,05 g) rozpuszcza się w 2 ml 10% roztworu HCl, chłodzi do temp. ok. 0°C (w zlewce z lodem) i powoli, kroplami dodaje się 5% roztwór wodny azotanu(III) sodu aż do dodatniej próby z papierkiem jodoskrobiowym. Barwa niebieska wskazuje na obecność wolnego kwasu azotowego. Po lekkim odgrzaniu obserwuje się pęcherzyki wydzielającego się azotu.

5.13.3. Kompleksowe sole aminokwasów z miedzią

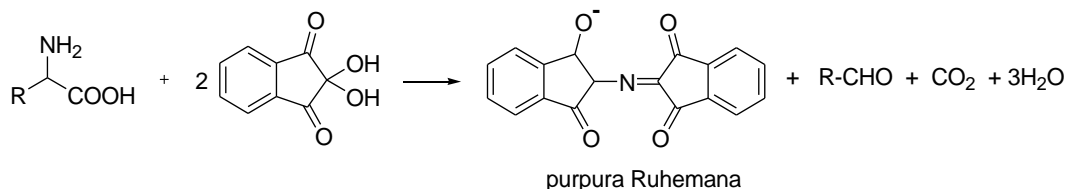
Wykonanie:

Do wodnego roztworu aminokwasu dodaje się kroplami 10% roztwór siarczanu miedzi(II). Mieszanina zabarwia się na kolor ciemnoniebieski z powodu powstania związku o następującej budowie:



5.13.4. Reakcja aminokwasów z ninhydryną

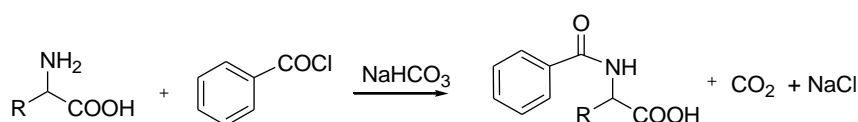
Ninhydryna (wodzian triketoinданu) reaguje na zimno z I-rzędowymi aminami alifatycznymi z wytworzeniem fioletowego barwnika tzw. *purpury Ruhemanna*. Jest to bardzo czuła reakcja, stosowana do wykrywania minimalnych ilości amin i aminokwasów. Związki z I-rzędową grupą aminową dają z ninhydryną błękitne lub purpurowe zabarwienie roztworu, Aminokwasy z II-rzędową grupą aminową dają żółte zabarwienie.



Wykonanie:

Próbkę ok. 0,05 g rozpuszcza się w 1 ml wody destylowanej i dodaje 3 krople 0,3% roztworu wodnego ninhydryny. Jeśli jest to aminokwas, charakterystyczne zabarwienie powstaje przeważnie natychmiast, czasem jednak niezbędne jest ogrzanie mieszaniny do wrzenia. Zabarwienie może być niebieskie, fioletowe lub czerwono-fioletowe.

5.13.5. Pochodne krystaliczne aminokwasów: *N*-benzoilopochodne



Wykonanie – reakcję należy prowadzić pod wyciągiem; chlorek benzoilu działa drażniaco

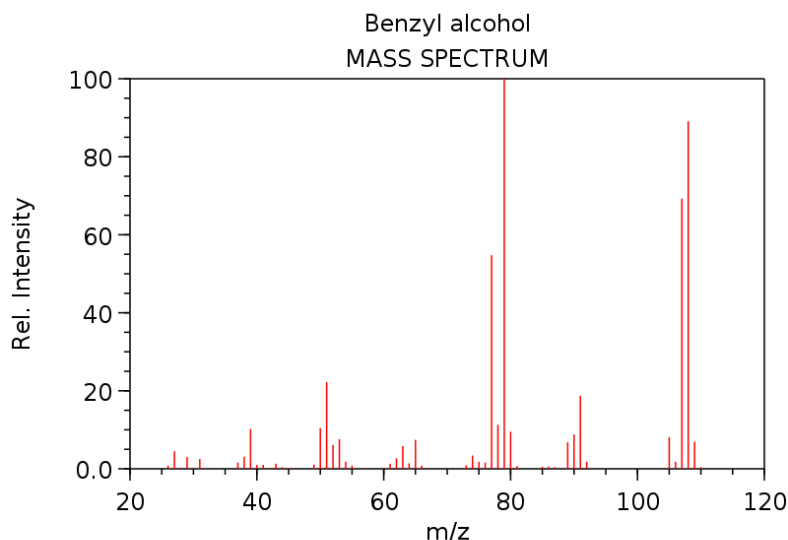
Ok. 0,5 g aminokwasu rozpuszcza się w 10 ml 10% roztworu NaHCO₃ i wkrapla ok. 1 ml chlorku benzoilu. Probówkę (lub kolbkę) zamyka się korkiem i wstrząsa mocno, otwierając co jakiś czas, by usunąć nadciśnienie, aż do zaniku zapachu chlorku. Należy często kontrolować papierkiem wskaźnikowym odczyn roztworu, który powinien być stale zasadowy. Jeżeli nie stwierdza się przebiegu reakcji, należy kolbę zaopatrzyć w chłodnicę zwrotną z rurką z chlorkiem wapnia i ogrzać na łaźni wodnej do jej zapoczątkowania. Następnie mieszaninę reakcyjną zakwasza się 5% HCl, oziębia i odsącza wydzielony osad. W celu ew. usunięcia kwasu benzoowego, osad ten ekstrahuje się eterem i krystalizuje z wody. Po wysuszeniu oznaczyć temperaturę topnienia i porównać z wartościami literaturowymi.

6. Metody spektroskopowe

6.1. Spektrometria mas

Spektrometria mas (MS) umożliwia analizę rozpadu badanej cząsteczki na mniejsze (naładowane) fragmenty, zachodzącego pod wpływem czynników jonizujących. Nie jest techniką *stricte* spektroskopową, ponieważ nie bada oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z materią. W celu jonizacji próbki wykorzystuje się różnorodne techniki: strumień elektronów (EI) lub jonów (CI), desorpcja polem (FD), desorpcja laserowa

(LD), rozpylanie w polu elektrycznym (ES). Otrzymane widmo jest zależnością względnej intensywności strumieni jonów (oś rzędnych) i ich masy (dokładnie, stosunku masy do ładunku, m/z , oś odciętych). Intensywność względna odnosi się do jonu o największym natężeniu (100%). Wartości m/z podawane są bezwymiarowo, m wyraża masę w jednostkach masy atomowej, natomiast z wielokrotność ładunku elementarnego (najczęściej 1) – Rysunek 1. Spektroskopia mas pozwala na uzyskanie podstawowych informacji strukturalnych odnośnie badanego związku, w szczególności wyznaczenie jego masy cząsteczkowej (M) oraz zidentyfikowanie fragmentów struktury.

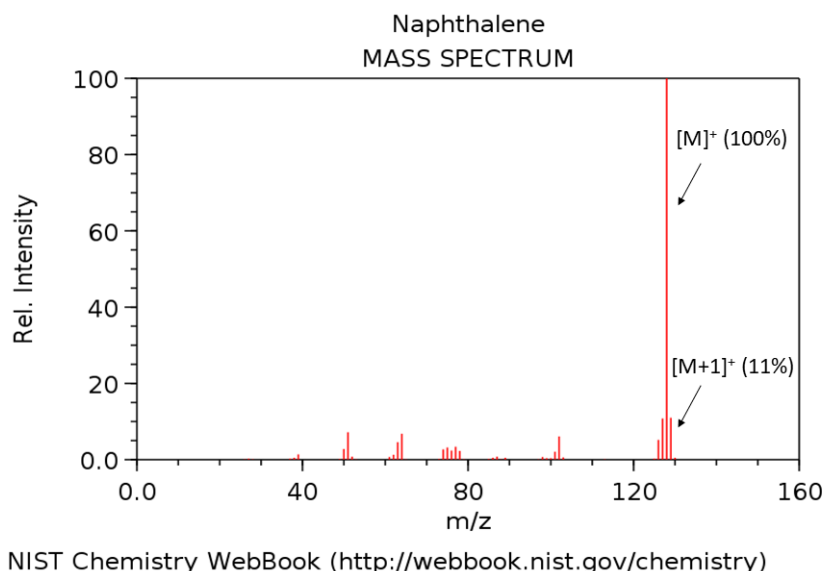


NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

Rysunek 1. Widmo masowe alkoholu benzyłowego (baza danych NIST Chemistry WebBook, data dostępu 06.02.2018).

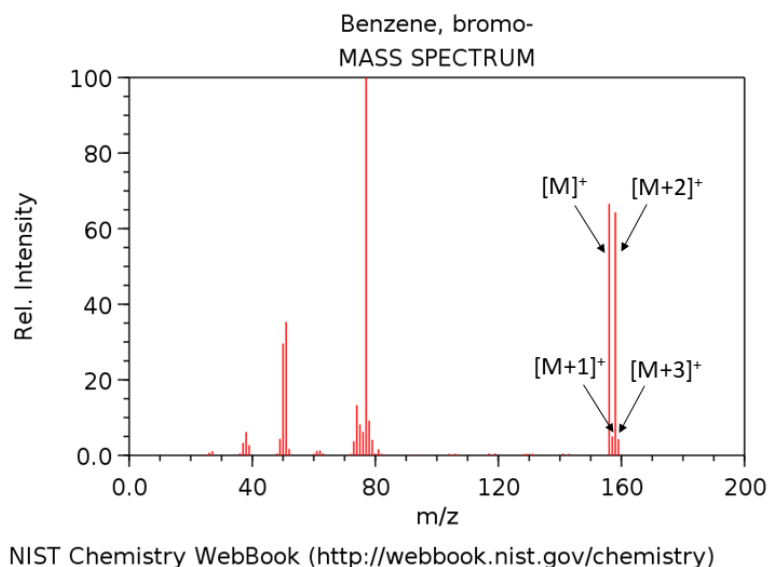
Pik molekularny $[M]^+$: m/z 108, piki fragmentacyjne: m/z 107, 91, 79 (100%), 77, 51.

Spektrometry masowe operują z rozdzielczością przynajmniej jednej jednostki, co pozwala na przeprowadzenie analizy składu izotopowego cząsteczki. W związkach organicznych pikowi molekularnemu $[M]^+$, rejestrowanemu dla przeważającego izotopu węgla ^{12}C , towarzyszy zawsze pik izotopowy $[M+1]^+$ pochodzący od izotopu ^{13}C . Procentowy udział cięższego izotopu węgla to około 1,11%. Intensywność piku $[M+1]^+$ w stosunku do $[M]^+$ wynika zatem z liczby atomów węgla w cząsteczce (pomnożonej przez wartość 1,11%). Przykładowo, związek o 20-tu atomach węgla będzie wykazywał pik izotopowy o intensywności około 22% piku molekularnego. Odwrotne działanie pozwala obliczyć maksymalną liczbę atomów węgla w nieznannej cząsteczce. Przykładowo, względna intensywność $[M+1]^+$ (m/z 129) do $[M]^+$ (m/z 128) dla widma masowego na Rysunku 2 wynosi około 11%, co oznacza 10 atomów węgla w cząsteczce ($11\%/1,11\% \approx 10$).



Rysunek 2. Widmo masowe naftalenu (baza danych NIST Chemistry WebBook, data dostępu 06.02.2018) obrazujące stosunek intensywności piku izotopowego do molekularnego dla 10 atomów węgla w cząsteczce.

Obserwowane są także inne izotopy, np. bromu, który występuje jako ^{79}Br i ^{81}Br o zbliżonej zawartości (100 : 98). Pasma molekularne bromobenzenu (Rysunek 3) zawiera zatem aż cztery piki: $[\text{M}]^+$: m/z 156 (dla ^{12}C i ^{79}Br), $[\text{M}+1]^+$: m/z 157 (dla ^{13}C i ^{79}Br), $[\text{M}+2]^+$: m/z 158 (dla ^{12}C i ^{81}Br) oraz $[\text{M}]^+$: m/z 159 (dla ^{13}C i ^{81}Br). Przybliżony stosunek intensywności pików względem siebie to odpowiednio 100 : 7 : 98 : 7.



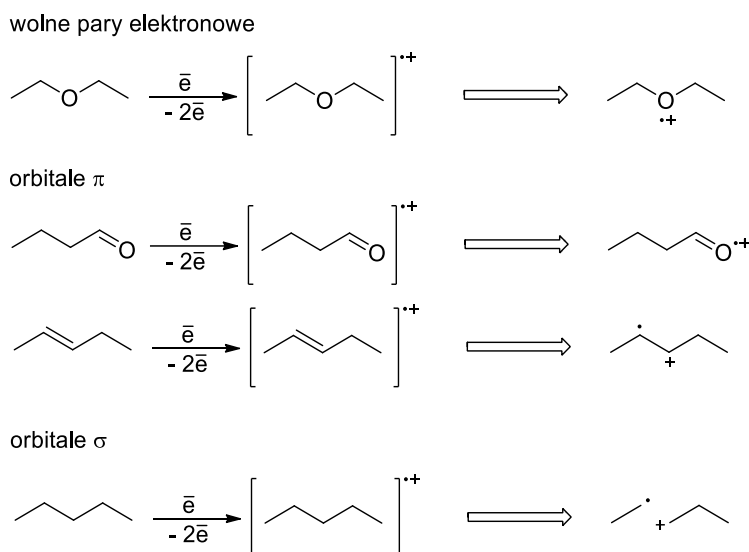
Rysunek 3. Widmo masowe bromobenzenu (baza danych NIST Chemistry WebBook, data dostępu 06.02.2018) obrazujące piki izotopowe wynikające z obecności atomów węgla i bromu w cząsteczce.

Spektrometry masowe o wysokiej rozdzielczości (HRMS, *high resolution MS*) analizują masę jonów z dokładnością nawet do czterech miejsc po przecinku. Taki pomiar pozwala na jednoznaczne przypisanie wzoru sumarycznego związku. Przykładowo, cząsteczka o masie 44 (w standardowej rozdzielczości) może mieć kilka możliwych wzorów sumarycznych. Oznaczenie masy z wysoką rozdzielczością pozwala na rozróżnienie pomiędzy nimi: C_3H_8 (44,06260), $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ (44,02620), CO_2 (43,98983) lub CN_2H_4 (44,03740).

Związki organiczne złożone z atomów węgla, wodoru i tlenu mają zawsze parzystą masę cząsteczkową, natomiast związku zawierające nieparzystą liczbę atomów azotu mają zawsze **nieparzystą** masę cząsteczkową.

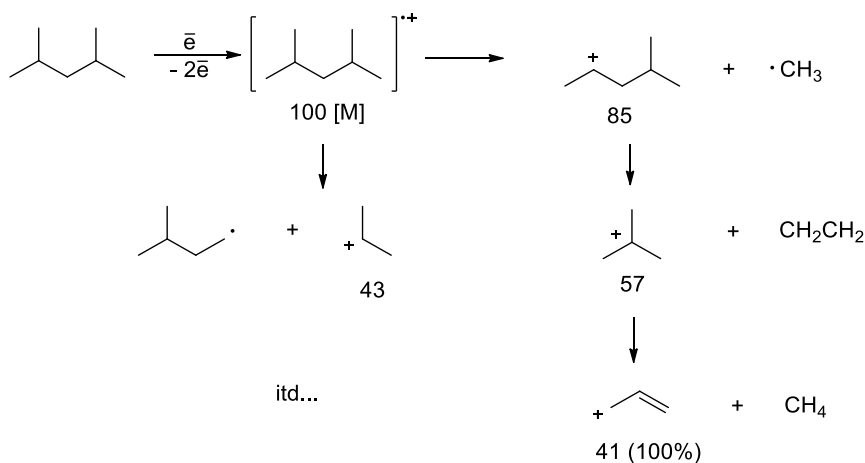
Uwaga: Nie dla wszystkich związków obserwuje się piki molekularne!

Utworzenie jonu molekularnego przez „wybicie” pierwszego elektronu następuje w określonym miejscu cząsteczki, według kolejności reaktywności: orbitale niewiążące (wolne pary elektronowe heteroatomów), orbitale typu π > orbitale typu σ – Rysunek 4.



Rysunek 4. Utworzenie preferowanego kationorodnika w zależności od struktury cząsteczki.

Fragmentacja cząsteczki polega na sukcesywnym rozpadzie wiązań o najniższej energii. Wiązania wysokoenergetyczne (np. wielokrotne) rzadko ulegają bezpośredniemu rozerwaniu. Intensywność strumieni powstających jonów fragmentarycznych zależy od trwałości powstających kationów (im wyższa rzędowość czy możliwość sprzężenia, tym intensywniejszy sygnał) oraz od szybkości kolejnych etapów fragmentacji. W ich trakcie eliminacji mogą ulegać cząsteczki obojętne (H_2O , CO , NH_3 , H_2 , alkeny, alkiny), które nie rejestrowane. Fragmentację przykładowego alkanu przedstawiono na Rysunku 5.

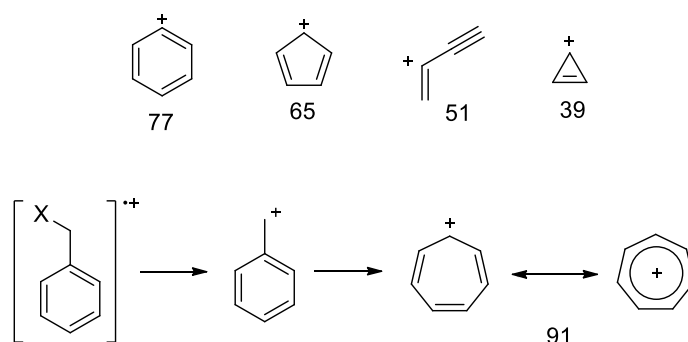


Rysunek 5. Przykładowe ścieżki fragmentacji cząsteczki 2,4-dimetylopentanu pod wpływem jonizacji strumieniem elektronów.

Powstający w pierwszym etapie kationorodnik ulega rozpadom na rodniki i karbokationy. Karbokationy ulegają kolejnym eliminacjom z wydzieleniem obojętnych cząsteczek (wodoru, metanu, etylenu itd.).

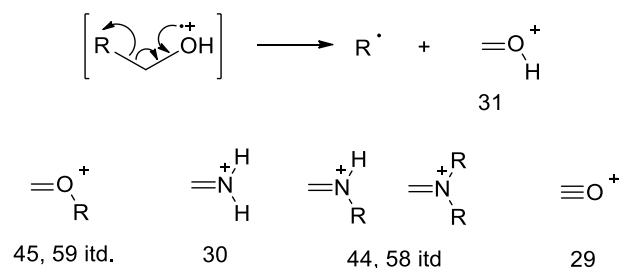
W widmach masowych alkanów charakterystyczna jest obecność sygnałów karbokationów różniących się masą 14 (CH_3^+ m/z 15, C_2H_5^+ m/z 29, C_3H_7^+ m/z 43, C_4H_9^+ m/z 57, $\text{C}_9\text{H}_{11}^+$ m/z 71 itd.), a także różnych ich odpowiedników nienasyconych (np. C_2H_3^+ m/z 27, C_3H_3^+ m/z 39, C_3H_5^+ m/z 41 itd.).

Skutkiem fragmentacji związków aromatycznych jest natomiast powstawanie szeregu nienasyconych i cyklicznych karbokationów, których masy i struktury przedstawiono na Rysunku 6. Jeśli związek posiada dodatkowo przynajmniej jeden atom węgla podstawiający aren, to najbardziej intensywnym pikiem w widmie masowym najczęściej jest powstający w wyniku fragmentacji karbokation benzylowy, przegrupowujący do aromatycznego kationu tropyliowego – Rysunek 6.



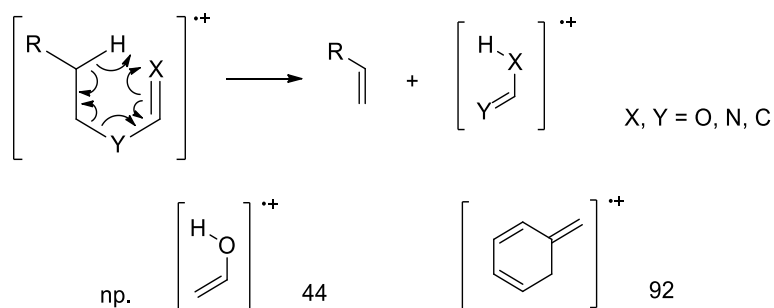
Rysunek 6. Jony fragmentaryczne powstające w wyniku rozpadu związków aromatycznych – powyżej; struktura karbokationu tropyliowego, będącego produktem rozpadu podstawionych pochodnych – poniżej.

Podstawowym rozpadem związków organicznych zawierających atomy tlenu czy azotu (alkoholi, eterów, amin, aldehydów) jest **rozszczerzenie α** kationorodnika. Powoduje ono rozpad wiązania węgiel-węgiel w najbliższym sąsiedztwie heteroatomu. W jego wyniku powstaje rodnik oraz kation stabilizowany obecnością heteroatomu – Rysunek 7.



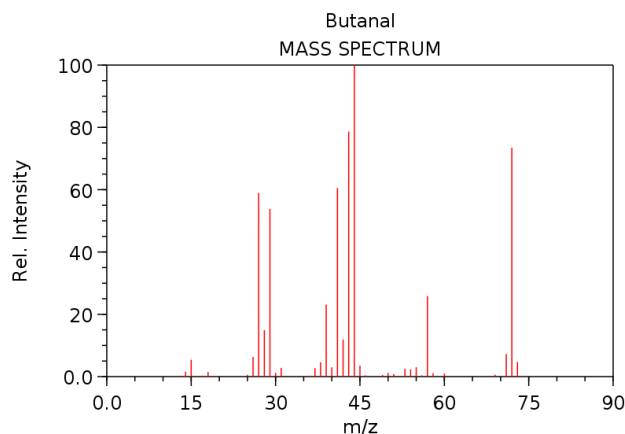
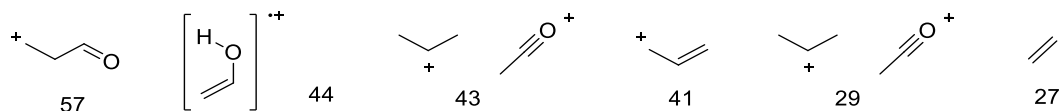
Rysunek 7. Mechanizm i przykłady produktów rozszczepienia α w związkach organicznych zawierających heteroatom.

Związki rozbudowane strukturalnie i posiadające atom wodoru przy czwartym atomie węgla mogą ulegać przegrupowaniu McLafferty'ego. Polega ono na przeniesieniu wspomnianego atomu wodoru do kationorodnika w obrębie cyklicznego, sześcioczłonowego stanu przejściowego. Powoduje to eliminację fragmentu nienasyconego – Rysunek 8.



Rysunek 8. Przebieg przegrupowania McLafferty'ego oraz przykładowe struktury produktów.

Formalny opis widma masowego polega na podaniu oznaczonych mas i struktur dla najbardziej intensywnych i charakterystycznych sygnałów (z ewentualnymi ścieżkami fragmentacji). Należy zaznaczyć jon molekularny oraz pik podstawowy (100%). Przykład opisu widma podanego na Rysunku 9: MS (EI) m/z 72 (M), 57, 44 (100%), 43, 41, 29, 27.

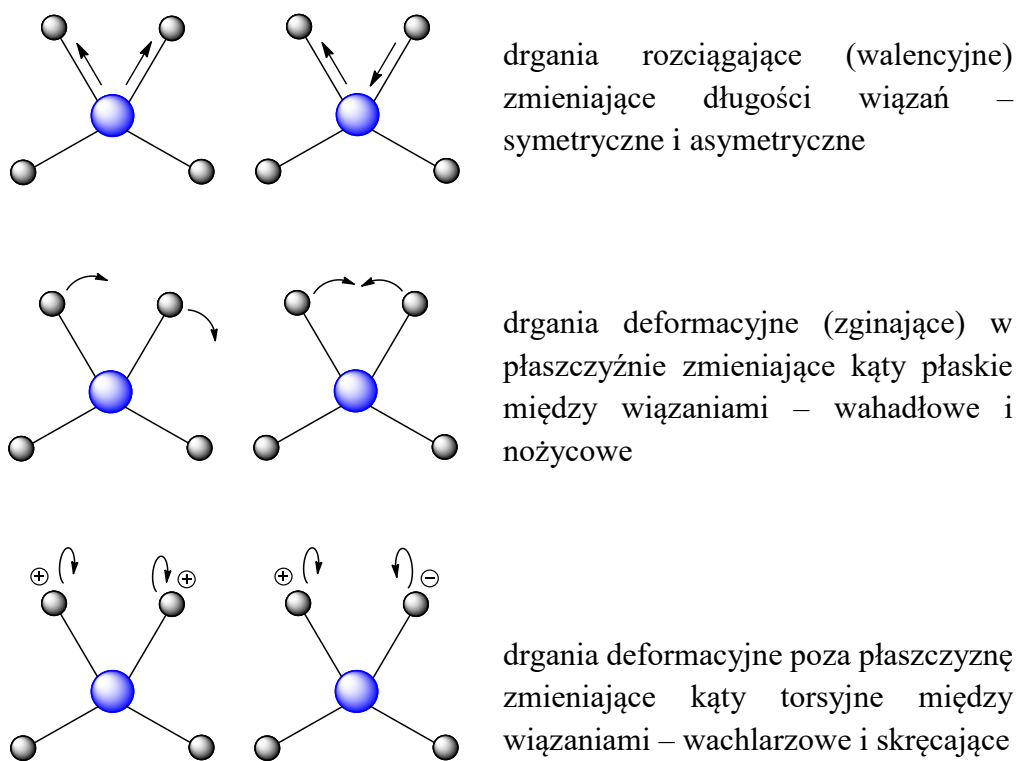


Rysunek 9. Widmo masowe butanal (baza danych NIST Chemistry WebBook, data dostępu 09.02.2018).

NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

6.2. Spektroskopia IR

Absorpcyjna spektroskopia IR służy do analizy widm oscylacyjnych cząsteczek w zakresie podczerwieni promieniowania elektromagnetycznego ($4000-400\text{ cm}^{-1}$). Wzbudzenie związane jest ze zmianą długości wiązań (drżania rozciągające, ν) i ze zmianą kątów pomiędzy wiązaniami w płaszczyźnie lub poza płaszczyznę (drżania deformacyjne, δ). Każdy z rodzajów drgań może być symetryczny lub niesymetryczny (Rysunek 10).



Rysunek 10. Drżania normalne w układzie atomów AB_2 .

Widmo IR wyrażone jest jako zależność transmitancji (przepuszczalności) próbki w zależności od liczby falowej. Im niższa transmitancja, tym absorpcja jest intensywniejsza.

Obszar widma IR można podzielić na cztery charakterystyczne zakresy:

- I. zakres $4000-2500\text{ cm}^{-1}$ (absorpcja drgań rozciągających wiązań O-H, N-H oraz CH);
- II. zakres $2500-2000\text{ cm}^{-1}$ (absorpcja drgań rozciągających wiązań potrójnych $C\equiv C$ oraz $C\equiv N$);
- III. zakres $2000-1500\text{ cm}^{-1}$ (absorpcja drgań rozciągających wiązań podwójnych $C=O$, $C=N$ oraz $C=C$);
- IV. poniżej 1500 cm^{-1} – zakres daktyloskopowy, region *fingerprint* (absorpcja drgań rozciągających wiązań pojedynczych C-O, C-N oraz C-C, a także drgań deformacyjnych; porównanie tego zakresu stanowi potwierdzenie tożsamości widma ze związkiem wzorowym). Podstawowe pasma absorpcji w podziale na zakresy przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Podstawowe indykatywne pasma absorpcji widma IR uszeregowane według malejącej liczby falowej.

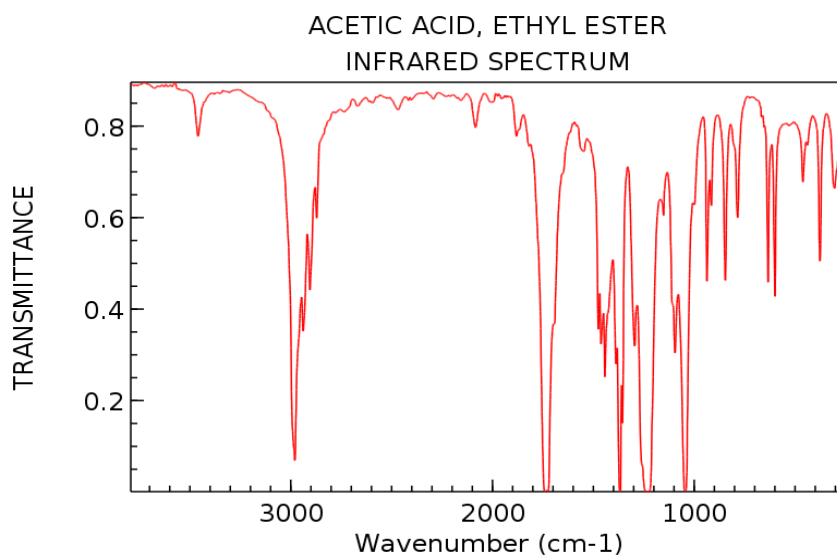
Liczba falowa (cm ⁻¹)	Drganie	Grupa związków
Zakres 4000-2500 cm ⁻¹		
3500-3200 (s, b)*	$\nu_{\text{O-H}}$	alkohole, fenole
3500-3200 (m)	$\nu_{\text{N-H}}$	aminy, amidy
3300-2500 (s, b)	$\nu_{\text{O-H}}$	kwasy karboksylowe
3320-3310 (m)	$\nu_{\text{C-H}}$	alkiny terminalne
3100-3000 (m)	$\nu_{\text{C-H}}$	alkeny, areny
3000-2850 (s)	$\nu_{\text{C-H}}$	alkany
2850-2700 (m)	$\nu_{\text{C-H}}$	aldehydy
Zakres 2500-2000 cm ⁻¹		
2260-2220 (m, sh)	$\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$	alkiny
2260-2100 (v)	$\nu_{\text{C}\equiv\text{C}}$	nitryle
Zakres 2000-1500 cm ⁻¹		
1760-1700 (s)	$\nu_{\text{C}=\text{O}}$	kwasy karboksylowe
1750-1730 (s)	$\nu_{\text{C}=\text{O}}$	estry
1740-1700 (s)	$\nu_{\text{C}=\text{O}}$	aldehydy
1720-1680 (s)	$\nu_{\text{C}=\text{O}}$	ketony
1700-1630 (s)	$\nu_{\text{C}=\text{O}}$	amidy
1680-1620 (v)	$\nu_{\text{C}=\text{C}}$	alkany
1620-1565 (m)	$\nu_{\text{C}=\text{C}}$	areny
1650-1550 (m)	$\delta_{\text{N-H}}$	aminy, amidy
Zakres poniżej 1500 cm ⁻¹		
1470-1450 (v)	$\delta_{\text{C-H}}$	alkany
1350-1000 (m)	$\nu_{\text{C-N}}$	aminy
1320-980 (s)	$\nu_{\text{C-O}}$	alkohole, fenole, kwasy karboksylowe, estry, etery

*Intensywność i kształt pasm: s – silne, m – średnie, w – słabe, v – zmienne, b – szerokie, sh – ostre

Spektroskopia IR pozwala na identyfikację grup funkcyjnych, a także na określenie struktury ogólnej związku (nasycony, nienasycony, aromatyczny). Przykładowo analiza widma przedstawionego na Rysunku 11 pozwala wysnuć następujące wnioski:

1. Związek nie wykazuje pasm absorpcji powyżej 3000 cm⁻¹ → nie zawiera O-H, N-H (nie jest alkoholem, kwasem karboksylowym, aminą I- czy II-rzędową itd.), a także nie zawiera C-H atomów węgla sp² oraz sp (nie jest nienasycony czy aromatyczny).
2. Obecne są pasma absorpcji w zakresie 2980-2850 cm⁻¹ → $\nu_{\text{C-H}}$ dla związku alifatycznego.
3. Związek nie wykazuje dwóch charakterystycznych pasm absorpcji w zakresie 2850-2700 cm⁻¹ → nie zawiera C(O)-H (nie jest aldehydem).
4. Związek nie wykazuje pasm absorpcji w zakresie 2300-2100 cm⁻¹ → nie zawiera wiązań potrójnych (nie jest alkinem czy nitrylem).
5. Obecne jest silne pasmo absorpcji 1720 cm⁻¹ → $\nu_{\text{C}=\text{O}}$.
6. Związek nie wykazuje pasm absorpcji w zakresie 1680-1550 cm⁻¹ → nie zawiera wiązań C=C (nie jest nienasycony czy aromatyczny).
7. Obecne są dwa silne pasma absorpcji 1220 cm⁻¹ oraz 1050 cm⁻¹ → $\nu_{\text{C-O}}$.

Wniosek: najbardziej prawdopodobny związek o takiej charakterystyce to **ester alifatyczny**.

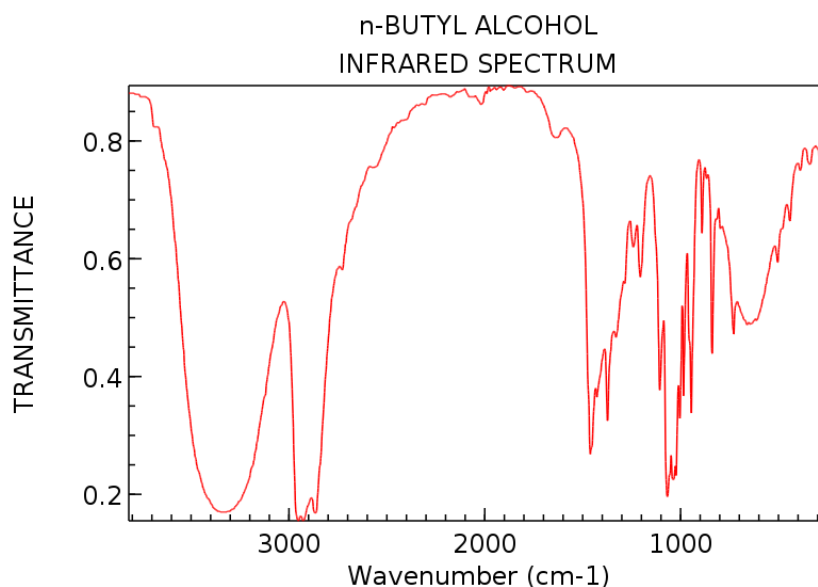


NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

Rysunek 11. Widm IR octanu etylu (baza danych NIST Chemistry WebBook, data dostępu 02.02.2018).

Formalny opis widma polega na podaniu charakterystycznych pasm absorpcji: liczby falowej, intensywności oraz (ewentualnie) kształtu, np. dla widma na Rysunku 12:

IR (cm^{-1}): 3340 (s, b, $\nu_{\text{O-H}}$), 2960, 2930, 2870, (s, $\nu_{\text{C-H}}$), 1460 (m, $\delta_{\text{C-H}}$), 1070 (s, $\nu_{\text{C-O}}$).



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

Rysunek 12. Widmo IR 1-butanolu (baza danych NIST Chemistry WebBook, data dostępu 02.02.2018).

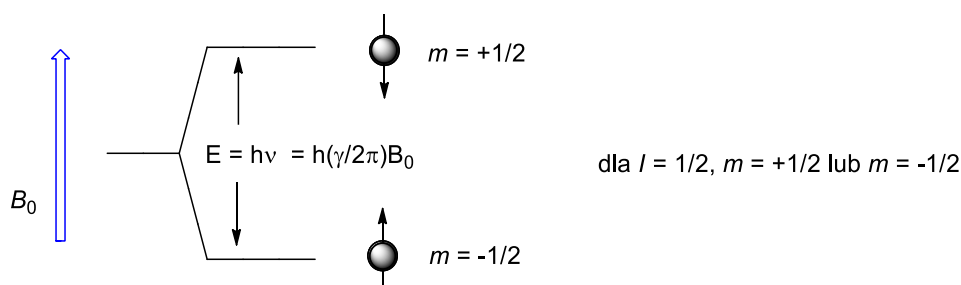
Tabela 4. Podsumowanie – podstawowe pasma absorpcji widma IR charakterystyczne dla poszczególnych grup związków (sprężenie obniża częstotliwość drgań), najważniejsze pasma zaznaczono pogrubioną czcionką.

Grupa związków	Zakres, liczba falowa (cm ⁻¹)	Charakterystyka	Intensywność
Węglowodory			
Alkany	3000-2850 1470-1450 1390-1350	C-H (sp ³), rozciągające C-H , zginające C-H, zginające	silne silne, średnie średnie
Alkeny	3100-3010 1680-1620	C-H (sp ²), rozciągające C=C , rozciągające	średnie zmiennie (zwykle średnie)
Alkiny (terminalne)	3320-3310 2260-2100	C-H (sp), rozciągające C≡C , rozciągające	średnie zmiennie
Związki aromatyczne	3075-3030 1620-1430 (1620-1565 i 1500-1400)	C-H (sp ²), rozciągające C=C , szkieletowe	zmiennie średnie słabe
Halogenopochodne			
Chlorki	830-560	C-Cl , rozciągające	silne, średnie
Bromki	700-500	C-Br , rozciągające	silne, średnie
Jodki	600-460	C-I , rozciągające	silne, średnie
Związki zawierające atom/atomy O			
Alkohole i fenole	3700-3500 3600-3200 1260-980	O-H (wolne), rozciągające O-H (wiązanie wodorowe), rozciągające C-O , rozciągające	zmiennie, ostre silne, szerokie silne
Etery	1150-1050	C-O , rozciągające	silne
Aldehydy	2850-2700 1740-1700	C(O)-H , rozciągające, symetryczne i asymetryczne C=O , rozciągające	dwa średnie pasma silne
Ketony	1720-1680	C=O , rozciągające	silne
Kwasy	3300-2500 1760-1700 1320-1200	O-H , rozciągające C=O , rozciągające C-O , rozciągające	bardzo szerokie, rozmyte silne silne, średnie
Estry	1750-1730 1300-1000	C=O , rozciągające C-O , rozciągające	silne silne, dwa pasma
Związki zawierające atom N (a także N i O)			
Aminy	3500-3300 1650-1550 1350-1000	N-H (wolne), rozciągające NH₂ i N-H zginające C-N , rozciągające	średnie, jedno pasmo dla aminy I-rz., dwa pasma dla II-rz. – często słabe średnie, słabe średnie

Amidy	3400-3200	N-H rozciągające	średnie, jedno pasmo dla amidu I-rz., dwa pasma dla II-rz.
	1700-1630	C=O , rozciągające	silne
Nitryle	2260-2220	C≡N , rozciągające	średnie, ostre
Nitrozwiązki	1560-1510 , 1380-1320	NO₂ , rozciągające, symetryczne i asymetryczne	silne

6.3. Spektroskopia ¹H NMR

Jądra atomowe obdarzone są ładunkiem elektrycznym a wirując wokół własnej osi wytwarzają pole magnetyczne zorientowane wzdłuż osi obrotu. Moment pędu wirującego ładunku można zdefiniować za pomocą kwantowej liczby spinowej (spinu) I , która przyjmuje wartości równe całkowitym wielokrotnościom liczby $\frac{1}{2}$ (oraz 0). W najprostszym przypadku ($I = \frac{1}{2}$ dla nieparzystej liczby nukleonów w jądrze, np. ¹H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁷O, ¹⁹F, ³¹P) jądra są dipolami magnetycznymi a w zewnętrznym polu magnetycznym mogą przyjmować dwie orientacje: zgodną i przeciwną do kierunku tego pola. Orientacje te odpowiadają dwóm poziomom energetycznym, a różnica energii między nimi zależy od rodzaju jądra oraz natężenia przyłożonego pola magnetycznego. Naświetlenie próbki promieniowaniem o odpowiedniej długości fali (zakres promieniowania radiowego) powoduje jego absorpcję o energii odpowiadającej różnicy tych dwóch stanów (kwantowy warunek rezonansu: $\Delta E = h\nu = h(\gamma/2\pi)B_0$, gdzie γ – współczynnik żyromagnetyczny jądra, stała charakterystyczna dla danego jądra, B_0 – natężenie zewnętrznego pola magnetycznego) – Rysunek 13.



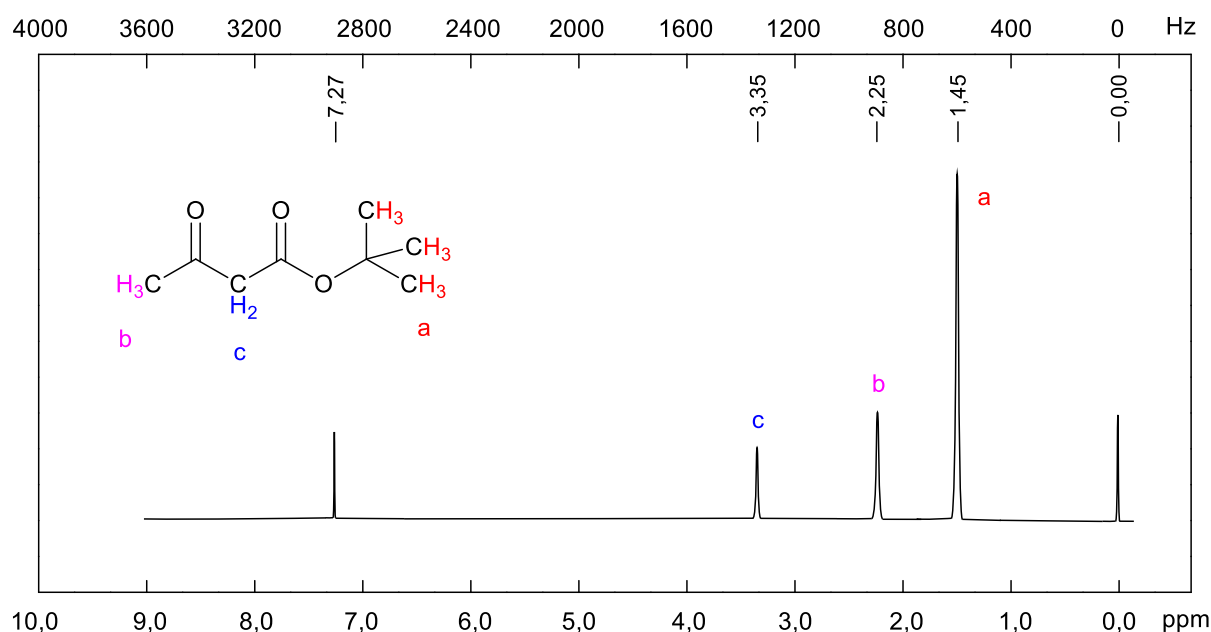
Rysunek 13. Orientacja jąder w zewnętrznym polu magnetycznym oraz różnica energii pomiędzy dwoma stanami, stanowiące podstawę absorpcji promieniowania w technice NMR.

Spektroskopia protonowego magnetycznego rezonansu jądrowego (¹H NMR) opiera się na obserwacji przejść między magnetycznymi poziomami energetycznymi izotopu wodoru ¹H. Dla każdej grupy protonów przejście (rezonans) odpowiada charakterystycznej różnicy energii, dzięki temu widma ¹H NMR dostarczają podstawowych informacji dotyczących struktury badanej cząsteczki (Rysunek 14). W szczególności dotyczy to liczby grup protonów związku, ich proporcji ilościowej oraz sposobu połączenia.

Analizując widmo ^1H NMR interpretuje się następujące jego parametry:

I. Liczba sygnałów, która odpowiada liczbie nierównocennych grup protonów w cząsteczce.

Przykładowo, widmo acetylooctanu *tert*-butylu zawiera trzy sygnały, które odpowiadają trzem nierównocennym względem siebie (biorąc pod uwagę otoczenie chemiczne) grupom protonów: dziewięciu protonom grupy *tert*-butylowej (sygnał a), trzem protonom grupy metylowej (sygnał b) oraz dwóm protonom grupy metylenowej (sygnał c) – Rysunek 14.



Rysunek 14. Widmo ^1H NMR acetylooctanu *tert*-butylu wykonane w deuterowanym chloroformie, w obecności tetrametylosilanu (wzorec wewnętrzny) na aparacie o częstotliwości 400 MHz, wraz z podstawowymi objaśnieniami.

Uwaga: widmo może zawierać sygnały nie związane z protonami analizowanego związku:

1. widmo kalibrowane jest względem tetrametylosilanu (TMS) jako wzorca – **dotadowy sygnał 0,00 ppm**;
2. deuterowany rozpuszczalnik, tutaj CDCl_3 , w którym przygotowano próbkę, wykazuje własny sygnał, tzw. resztkowy, pochodzący od protonu CHCl_3 – **dotadowy sygnał 7,27 ppm**
(bardziej intensywny sygnał od protonowanego rozpuszczalnika obserwuje się natomiast w przypadkach, gdy następuje wymiana kwaśnych protonów cząsteczki z deuterowanym rozpuszczalnikiem, np. $\text{D}_2\text{O} \rightarrow \text{HDO}$ – sygnał 4,70 ppm; z tego też powodu kwaśne protony grup funkcyjnych cząsteczki: $-\text{COOH}$ $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$ nie są rejestrowane w takich rozpuszczalnikach);
3. pomiar jest wrażliwy na zanieczyszczenia niskocząsteczkowe, mogą to być rozpuszczalniki niedokładnie usunięte po krystalizacji czy chromatografii związku, np. woda – sygnał 1,50 ppm, aceton – sygnał 2,17 ppm czy eter dietylowy – sygnały 1,20 (t) oraz 3.48 (q) ppm (wszystkie podane dla pomiaru w CDCl_3) itd.

II. Przesunięcie chemiczne, które zależy od otoczenia chemicznego jądra.

Przesunięcie chemiczne (położenie sygnału na skali) jest miarą różnicy częstotliwości rezonansowej danej grupy protonów względem związku wzorcowego (TMS). Różnica ta wynosi od kilkudziesięciu do kilku tysięcy Hz. Ze względów praktycznych przesunięcie chemiczne (δ) wyraża się w jednostkach względnych – ppm (częściach milionowych, *part per milion*):

$$\delta = (v_x - v_{\text{TMS}}) / v_{\text{podstawowa}} \times 10^6 \text{ [ppm]}$$

gdzie $v_{\text{podstawowa}}$ – częstotliwość pomiarowa (wewnętrzna), która wynosi zwykle od kilkudziesięciu do tysiąca MHz, jest stała i charakterystyczna dla aparatu; dla uniknięcia operowania częściami milionowymi iloraz mnoży się przez 10^6 .

Przykładowo, przesunięcie chemiczne sygnału grupy *tert*-butylowej (a) z Rysunku 14 wynosi 1,45 ppm, co jest wynikiem: $(580 \text{ Hz} - 0 \text{ Hz}) / 400 \text{ MHz} \times 10^6$.

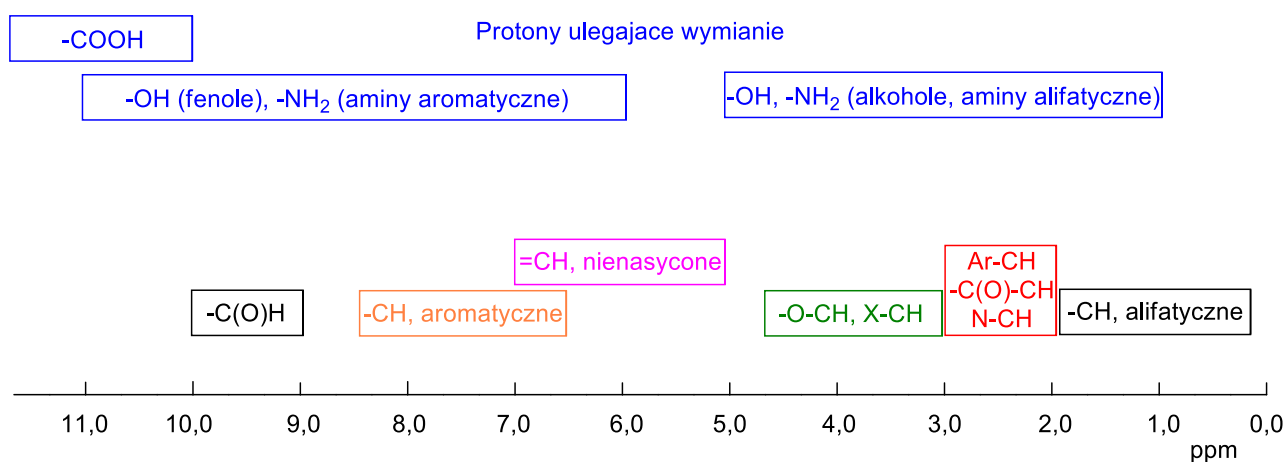
Wartości przesunięć chemicznych są zwykle liczbami z zakresu 0-10 ppm, w opisie formalnym podaje się je z dokładnością dwóch cyfr po przecinku. Wielkości δ nie zależą od częstotliwości aparatu, natomiast wpływa na nie struktura związku – otoczenie rozpatrywanej grupy protonów w cząsteczce, tj. charakter i elektroujemność grup sąsiadujących. Sąsiedztwo fragmentów elektroujemnych i nienasyconych wykazuje wpływ odsłaniający (powodujący większe przesunięcie, wyższe wartości δ) – Tabela 5 oraz Rysunek 15.

Tabela 5. Orientacyjne przesunięcia wybranych grup protonów w zależności od otoczenia chemicznego.

Charakter protonów	δ [ppm] (zakres)	Struktura	δ [ppm] (typowe)
protony alifatyczne (bez sąsiedniej grupy elektroujemnej)	0,5-1,8	-CH ₃	0,9
		-CH ₂ -	1,3
		-CH<	1,4
		winył-CH ₃	1,6-1,7
protony alifatyczne (w sąsiedztwie jednej grupy elektroujemnej)	2,0-4,5	RO-C(O)-CH ₃	2,0
		R-C(O)-CH ₃	2,1-2,2
		R ₂ N-CH ₃	2,1-2,2
		aryl-CH ₃	2,3
		Br-CH ₃	2,7
		Cl-CH ₃	3,0
		HO-CH ₃	3,1
		RO-CH ₃	3,3
protony winylowe	5,5-6,5	R-C(O)-O-CH ₃	3,7
		O ₂ N-CH ₃	4,1
protony aromatyczne	6,5-8,5	=C-H	-
protony aldehydowe	9,0-10,0	Ph-H	7,2
		-C(O)-H	-

Analizując przesunięcia chemiczne na przykładzie widma acetylooctanu *tert*-butylu (Rysunek 14, opis w górnej części widma, *peak picking*) pod względem otoczenia chemiczne można stwierdzić, że protony grupy *tert*-butylowej wykazują typowe przesunięcie dla protonów alifatycznych (**sygnał a**) δ 1,45 ppm, protony grupy metylowej są odsłaniane przez grupę karbonylową (**sygnał b**) δ 2,25 ppm, natomiast na położenie sygnału protonów grupy metylenowej sumaryczny wpływ odsłaniający mają dwie grupy: karbonylowa i karboksylowa (**sygnał c**) δ 3,35 ppm.

Uwaga: protony związane z heteroatomami, o ile nie są wymienione z deuterowanym rozpuszczalnikiem (patrz komentarz I.2), mają zmienne położenie: -OH, -NH₂ alkoholi i amin alifatycznych: δ 1-5 ppm, -OH, -NH₂ fenoli i amin aromatycznych: δ 6-11 ppm, a -COOH kwasów karboksylowych: nawet δ 10-14 ppm – Rysunek 15. Sygnały często są poszerzone, szczególnie dla kwasów karboksylowych.

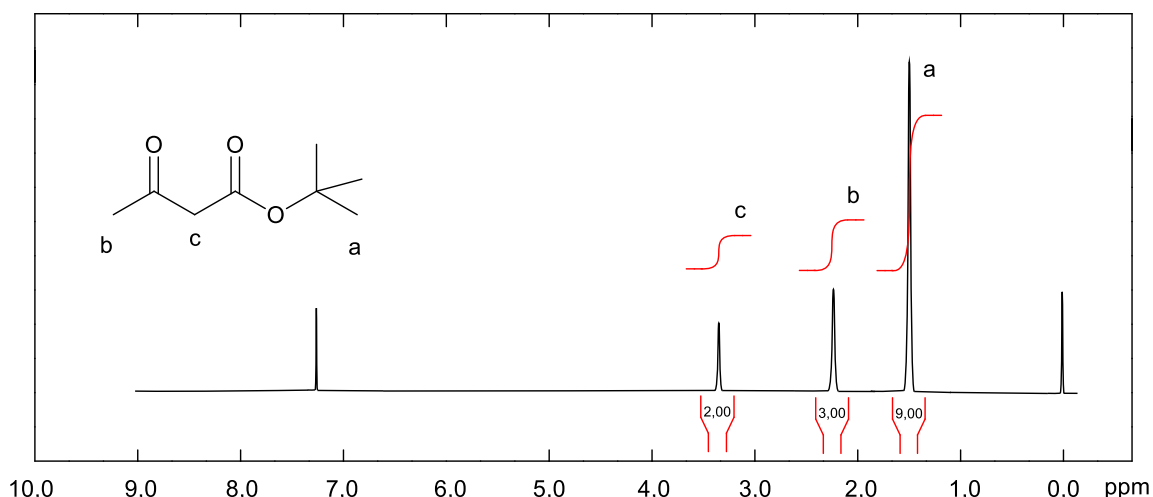


Rysunek 15. Podsumowanie: orientacyjne, przybliżone zakresy przesunięć chemicznych dla poszczególnych typów protonów, w zależności od otoczenia chemicznego.

III. Intensywność sygnałów, która jest proporcjonalna do **liczby protonów** związanych z tym sygnałem.

W spektroskopii ¹H NMR intensywności sygnałów (pola powierzchni pod sygnałami wyrażone jako cała, integracja) oddają stosunek pomiędzy liczbami protonów tworzącymi poszczególne sygnały. Integrację zaznacza się jako krzywe całkowania, których skok jest proporcjonalny do intensywności sygnału, a częściej obecnie umieszcza się w formie liczbowej (liczby sprowadzone do najmniejszych całkowitych) w klamrach pod sygnałami – Rysunek 16.

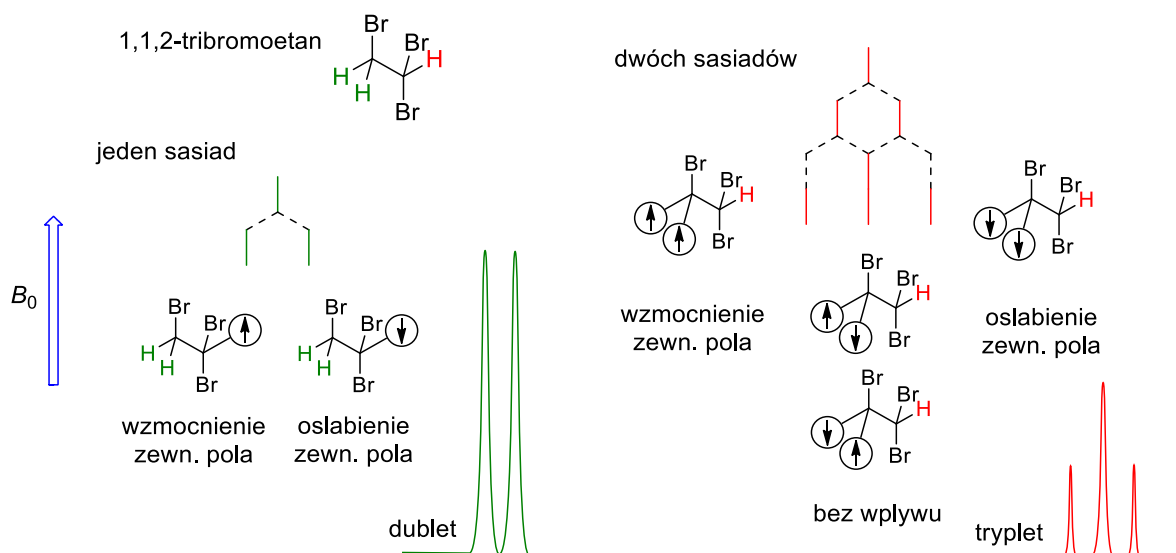
Przykładowo, intensywność sygnałów acetylooctanu *tert*-butylu ma się względem siebie jak 9 : 3 : 2 (sygnał a : sygnał b : sygnał c). Oznacza to 14 protonów w cząsteczce (lub w ogólności – ich wielokrotność).



Rysunek 16. Widmo ^1H NMR acetylooctanu *tert*-butylu z zanesioną integracją sygnałów.

IV. Multipletowość sygnałów w spektroskopii ^1H NMR, która spowodowana jest sprzężeniem spinowo-spinowym.

Sygnały protonowego rezonansu magnetycznego rzadko mają postać pojedynczych pików – **singletów**, częściej są to zestawy wielu sygnałów o charakterystycznej subtelnej strukturze – **multiplety**. Tworzenie multipletu spowodowane jest sprzężeniem spinowo-spinowym z sąsiadującymi, nierównocennymi protonami. Obserwowane sprzężenia przenoszone są najczęściej przez trzy wiązania (sprzężenia wicynalne), a dla układów płaskich obserwowane są także sprzężenia dalszego zasięgu – głównie przez cztery wiązania. Postawanie multipletów spowodowane jest lokalnym wpływem sąsiadujących protonów (będących dipolami magnetycznymi). Zależnie od stanu spinowego, wpływ ten wiąże się z obniżeniem lub podwyższeniem wartości zewnętrznego pola magnetycznego oddziałującego na dane jądro. Powoduje to rozszczepienie sygnałów rezonansowych – Rysunek 17.



Rysunek 17. Powstawanie dubletu i trypletu dla sygnałów rezonansowych 1,1,2-tribromoetanu spowodowane różnymi stanami spinowymi sąsiadujących protonów.

W widmie ^1H NMR multipletowość jest o jeden większa od liczby sąsiadujących protonów (jeden sąsiad – dublet, dwóch równocennych sąsiadów – tryplet, trzech równocennych sąsiadów – kwartet, itd.). Zależność ogólna: $M = 2nI + 1$ (n – liczba równocennych sąsiadujących jader wykazujących sprzężenie z rozpatrywaną grupą).

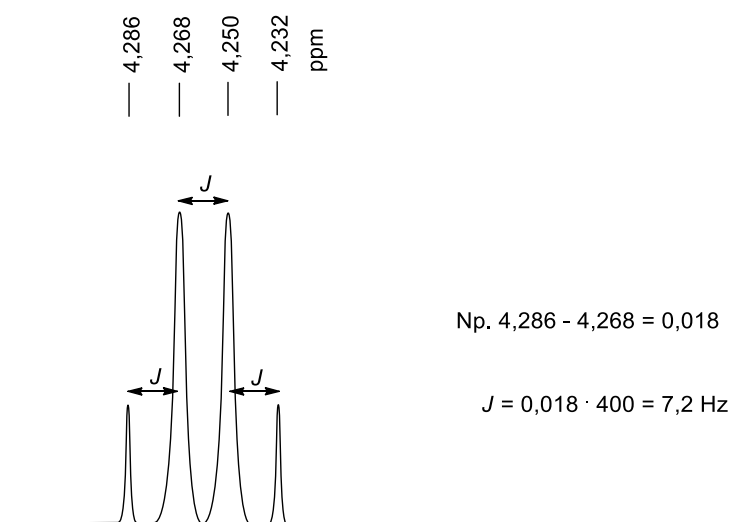
Multiplety mają ściśle zdefiniowaną, charakterystyczną strukturę (zgodną z trójkątem Pascala):

- dublet to dwa sygnały o równej intensywności,
- tryplet to trzy sygnały o intensywności 1 : 2 : 1,
- kwartet to cztery sygnały o intensywności 1 : 3 : 3 : 1 itd.:

liczba sąsiadów	multipletowość sygnału	integracja
0	1 (singlet, s)	1
1	2 (dublet, d)	1 1
2	3 (tryplet, t)	1 2 1
3	4 (kwartet, q)	1 3 3 1
4	5 (kwintet, quin)	1 4 6 4 1
5	6 (sekstet, sex)	1 5 10 10 5 1
6	7 (septet, sep)	1 6 15 20 15 6 1

...

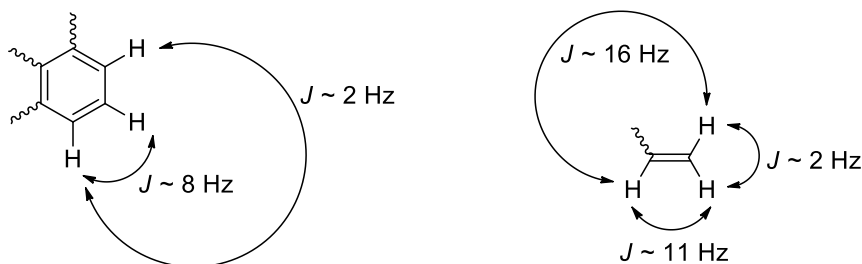
Różnica między dowolnymi sąsiadującymi sygnałami rezonansowymi zdefiniowanego multipletu jest jednakowa i określona jest jako stała sprzężenia J (oznaczana także jako stała sprzężenia proton-proton $J_{\text{H-H}}$). Wyraża się ją w Hz. Jeśli przesunięcia chemiczne podane są na widmie jedynie w ppm, to – dla jej obliczenia – różnicę przesunięć chemicznych [ppm] należy pomnożyć przez częstotliwość podstawową np. 400 MHz (Rysunek 18).



Rysunek 18. Obliczanie stałej sprzężenia spinowo-spinowego w kwartecie przy podanych przesunięciach chemicznych w ppm.

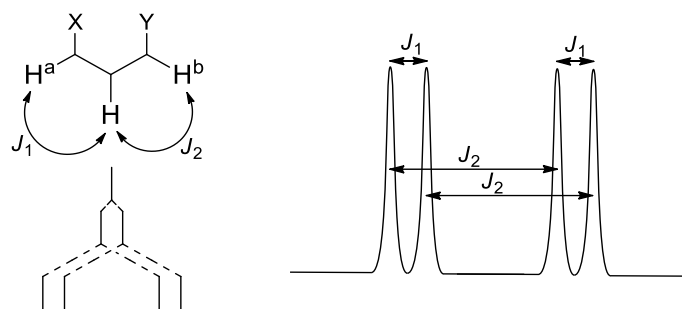
Uwaga: Stała sprzężenia pomiędzy dwoma grupami protonów sprzęgających ze sobą jest taka sama w obu multipletach (sprzężenie jest wzajemne).

Stała sprzężenia spinowo-spinowego przyjmuje wartości do nawet 20 Hz. Najczęściej jest to kilka Hz, np. w układach alifatycznych około 7 Hz. Inne wybrane przykłady podano na Rysunku 19.



Rysunek 19. Orientacyjne stałe sprzężenia spinowo-spinowego w układach płaskich.

Uwaga: Jeśli dany proton/grupa protonów sprzęga z nierównocennymi sąsiadami, udział każdego z nich rozpatruje się osobno. Przykładowo, proton na Rysunku 20 sprzęga z sąsiednim H^a ze stałą J_1 (dublet), a także z H^b z **różną stałą** J_2 (dublet). Sumarycznym efektem będzie sygnał złożony z czterech pików – dublet dubletów. Stałe sprzężenia można odczytać z różnicy przesunięć pików 1-2, 3-4 (J_1) oraz 1-3, 2-4 (J_2).



Rysunek 20. Sprężenie spinowo-spinowe z dwoma nierównocennymi względem siebie sąsiadującymi protonami H^a i H^b ($J_1 < J_2$).

Bardziej złożone układy są trudne do interpretacji ze względu na nakładanie się sygnałów, przypadkowe i spowodowane niewielką różnicą w wartościach stałych sprzężeń. Takie sygnały opisuje się jako multiplety (nie oblicza się J).

Interpretacja przykładowego widma 1H NMR przedstawionego na Rysunku 21:

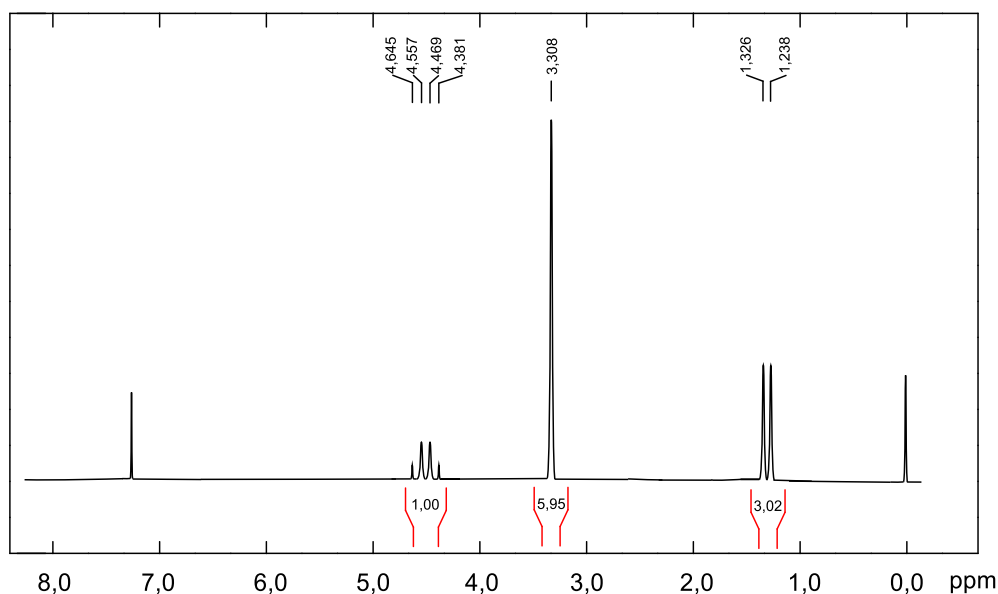
1. Widmo wykazuje trzy sygnały \rightarrow w cząsteczce występują trzy grupy protonów.
2. Sygnał (dublet) o przesunięciu chemicznym δ 1,28 ppm (środek) jest słabo odsłaniany (połączony z alifatycznym atomem węgla); singlet o przesunięciu chemicznym δ 3,31 ppm jest mocno odsłaniany (połączony np. bezpośrednio z atomem tlenu); kwartet o przesunięciu chemicznym δ 4,51 ppm jest bardzo mocno odsłaniany (najprawdopodobniej połączony z dwoma grupami elektroujemnymi). Brak jest protonów nienasyconych i aromatycznych.
3. Integracja 3H : 6H : 1H \rightarrow najbardziej prawdopodobna dla CH_3^a , $2 \times CH_3^b$ oraz CH. Związek posiada 10 protonów (lub ich wielokrotność).

4. Grupa metylowa CH_3^a (dublet) sąsiaduje z grupą zawierającą jeden proton (CH). Sprężenie jest wzajemne: grupa CH jest kwartetem (sąsiaduje z trzema równocennymi protonami grupy CH_3^a). Stała sprężenia w obu sygnałach jest jednakowa: 7,0 Hz ($0,088 \cdot 80$).

5. Związek posiada następujące fragmenty strukturalne (nieznany jest sposób ich połączenia/grupa(y) funkcyjne):



6. Najbardziej oczywistą możliwością spełniającą wszystkie warunki jest acetal dimetylowy acetaldehydu: $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$.



Rysunek 21. Widmo ^1H NMR nieznaney substancji wykonane w deuterowanym chloroformie, w obecności TMS na aparacie o częstotliwości podstawowej 80 MHz.

Opis formalny widma:

^1H NMR (CDCl_3 , 80 MHz) δ : 1,28 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H, CH_3), 3,31 (s, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 4,51 (q, $J = 7,0$ Hz, 1H, CH).

7. Spis literatury

1. Z. Jerzmanowska - *Analiza jakościowa związków organicznych* - PZWL, 1975.
2. A. Vogel - *Preparatyka organiczna* - WNT, 1984.
3. J. Woliński, J. Terpiński - *Organiczna analiza jakościowa* - PWN, 1973.
4. B. Bobrański - *Analiza ilościowa związków organicznych* - PWN, 1970.
5. R. Walczyna, J. Sokołowski, G. Kupryszewski - *Analiza związków organicznych* - Wyd. Uniwersytetu Gdańskiego, 1996.
6. K. Bańkowski, A. Krawczyk, R. Siciński, J. Stępiński, A. Temeriusz - *Ćwiczenia z organicznej analizy jakościowej i chemii bioorganicznej* - Wyd. UW, 1990.
7. B. Drożdż - *Analiza jakościowa związków organicznych* - Wyd. CM UJ, Kraków 2013.
8. L. Achremowicz, M. Soroka - *Laboratorium chemii organicznej* - Wyd. PWr, 1980.
9. R. M. Silverstein, F. X. Webster, D. J. Kiemle - *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych* - PWN, Warszawa 2007.
10. B. Drożdż - *Spektroskopia masowa - materiały do ćwiczeń* - Wyd. CM UJ, Kraków, 2016.
11. S. A. Richards, J. C. Hollerton - *Essential practical NMR for organic chemistry* - John Wiley & Sons, Chichester, 2011.