

Stapianie z sodem metalicznym (próbą na siarkę, azot, chlorowce)

Wykrywanie pierwiastków w związkach organicznych polega najczęściej na przeprowadzeniu ich w połączenia jonowe.

Do małej próbówki umieszczonej pionowo w łapie żelaznej wprowadza się kawałek metalicznego sodu, wielkości ziarna grochu (0,05g). Następnie wprowadza się odrobinę badanej substancji (0,02g lub 2 krople, jeżeli substancja jest ciekła). Ogrzewa małym płomieniem, aż do stopienia sodu, którego pary wypełniają dolną część próbówki, i ponownie ogrzewa. Na zakończenie mocno ogrzewa się dno próbówki do żaru. Po oziębieniu dodaje się około 1 ml etanolu w celu usunięcia nadmiaru sodu, ogrzewa ponownie i gorącą próbówkę wrzuca do parowniczkę z 10 ml wody destylowanej. Jeżeli próbówka nie pęknie, rozbija się ją szklaną pałeczką. Płyn z parowniczkę sączy się. Przesącz, który powinien być bezbarwny, służy do dalszych badań na azot, siarkę i chlorowce.

Jeżeli przesącz jest żółty lub brunatny, próbę należy powtórzyć, gdyż rozkład badanej substancji nie był całkowity.

Czynności związane z tą próbą do momentu sączenia roztworu należy wykonywać w okularach.

PRÓBA NA SIARKE

Do ok. 1 ml badanego przesączu o silnie alkalicznym odczynie dodaje się 4-5 kropli rozcieńczonego 0,1% roztworu nitroprusydku sodowego (który należy świeżo przygotować przez rozpuszczenie małego kryształka w 2 ml wody). Pojawienie się, ciemnopurpurowego zabarwienia (nie utrzymującego się długo) wskazuje na zawartość siarki w badanym związku. Zamiast nitroprusydku sodowego można użyć rozcieńczonego roztworu octanu ołowiowego po uprzednim zakwaszeniu badanego roztworu rozcieńczonym kwasem octowym. Czarny osad PbS wskazuje na zawartość siarki.

PRÓBY NA AZOT

Próba Lesaignea. Ok. 3 ml badanego przesączu o silnie alkalicznym odczynie ogrzewa się, do wrzenia z kryształkiem (0,1g) siarczanu żelazawego. Po ochłodzeniu dodaje się rozcieńczonego kwasu siarkowego do odczynu kwaśnego. Jeżeli substancja zawierała azot, występuje zielononiebieskie zabarwienie. Po dłuższym staniu wydziela się osad błękitu pruskiego $\text{Fe}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6)_3$.

PRÓBA NA CHLOROWCE

Jeżeli badana substancja nie zawierała azotu, ani siarki postępujemy następująco: 2ml badanego przesączu o silnie alkalicznym odczynie zakwasza się rozcieńczonym kwasem azotowym (wolnym od chlorowca) i dodaje się kilka kropli roztworu azotanu srebra. Powstanie białego lub żółtego osadu wskazuje na obecność chloru, bromu lub jodu. Natomiast jeżeli badana substancja zawierała azot lub siarkę to 2 ml badanego przesączu o alkalicznym odczynie zakwasza się rozcieńczonym kwasem siarkowym i ogrzewa do wrzenia przez kilka minut do odpędzenia siarkowodoru lub cyjanowodoru. Następnie roztwór zagęszcza się do około połowy objętości. Po uzupełnieniu wodą do pierwotnej objętości, wykonuje się próbę z azotanem srebra.

Ustalanie rodzaju chlorowca. Rozpuszczalność w amoniaku.

Otrzymany w próbie na chlorowce osad haloidku srebra, po zdekantowaniu płynu, ogrzewa się z uprzednio przygotowanym roztworem 4 cz. nasyconego roztworu węglanu amonowego zmieszanych z 1 cz. stęż. amoniaku.

Rozpuszczanie się osadu AgX w wymienionym roztworze, wskazuje na obecność chloru. Jeżeli osad jest jasnożółty i rozpuszcza się tylko częściowo, to badana substancja zawiera brom. Osad żółty i zupełnie nierozpuszczalny wskazuje na obecność jodu.

WYKRYWANIE TLENU

1. Związki organiczne zawierające tlen, dodane do roztworu jodu w benzenie lub chloroformie, powodują zmianę fioletowoczerwonego zabarwienia na brunatne.
2. Papierki „ferrox”.

Rozpuszczamy osobno 0,1 g chlorku żelazowego i 0,1 g rodanku potasowego w porcjach po 1 ml bezwodnego metanolu, zlewamy razem roztwory i po odsączeniu wydzielonego KCl nasycamy roztworem paski bibuły. Suszymy je na powietrzu i przechowujemy w słoikach szklanych.

Badaną substancję rozpuszczamy w możliwie małej ilości suchego benzenu lub chloroformu i do tego roztworu wkładamy wąski pasek papierka „ferrox”. W przypadku obecności tlenu, roztwór barwi się na czerwono.

U W A G A ! Reakcji tej nie dają niektóre chinony, eter dwufenylowy

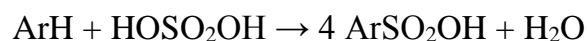
Węglowodory nasycone

1. Reakcja z dymiącym kwasem siarkowym (20% oleum)

Węglowodory nasycone: alifatyczne i alicyklowe - charakteryzują się odpornością na działanie większości odczynników chemicznych. Węglowodory aromatyczne wykazują znaczną aktywność w reakcjach podstawienia, związaną z obecnością układu aromatycznego, ulegają łatwo nitrowaniu, sulfonowaniu, halogenowaniu wobec katalizatorów.

Węglowodory aromatyczne, w odróżnieniu od alifatycznych i alicyklowych, tworzą zabarwione i charakterystyczne pikryniany.

Najlepszym odczynnikiem odróżniającym węglowodory alifatyczne i alicyklowe od aromatycznych jest 20% oleum (dymiący kwas siarkowy zawierający 20% trójtlenku siarki), z którym reagują tylko węglowodory aromatyczne.



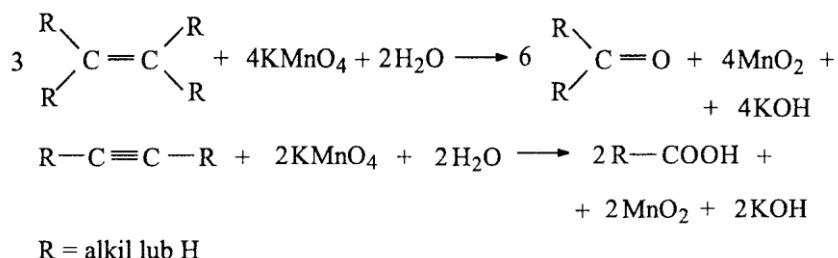
Wykonanie: 1 ml 20% oleum umieszcza się w suchej próbówce, dodaje 0,2 ml badanej substancji i mocno wstrząsa.

Węglowodory aromatyczne rozpuszczają się wydzielając ciepło, bez objawów zwęglania.

Węglowodory nienasycone

1. Reakcja z roztworem manganianu(VII) potasu

Związki zawierające wiązania wielokrotne między atomami węgla odbarwiają 0,1% roztwór manganianu(VII) potasu (*reakcja Baeyera*). W obojętnym i zasadowym roztworze manganian(VII) potasu utlenia substancje, redukując się sam do tlenku manganu(IV):



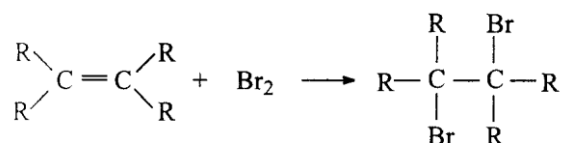
Wykonanie: do ok. 1 ml badanej próbki dodać kroplami 0,1% roztwór KMnO_4 w acetonie. Po dodaniu każdej porcji roztwór starannie wymieszać i odczekać do zniknięcia różowego zabarwienia pochodzącego od roztworu KMnO_4 . Odbarwienie się odczynnika (powyżej dwóch kropli) przy jednoczesnym wytrącaniu się tlenku manganu(IV) wskazuje na nienasycony charakter związku. Ilość odbarwionego roztworu oraz szybkość jego odbarwiania zależy od ilości wiązań wielokrotnych w cząsteczce badanego związku.

Należy jednocześnie wykonać próbę kontrolną, ponieważ zanieczyszczone rozpuszczalniki organiczne mogą reagować z manganianem(VII) potasu.

Jakościowa reakcja z manganianem(VII) potasu z reguły umożliwia jednoznaczne stwierdzenie obecności wiązań wielokrotnych między atomami węgla. Jednak należy pamiętać, że niektóre związki o nasyconym łańcuchu węglowym łatwo utleniają się (na przykład estry kwasu malonowego, aldehydy) odbarwiając roztwór manganianu(VII) potasu.

2. Reakcja przyłączenia (addycji) bromu

Drugą reakcją, pozwalającą na wykrycie wiązań wielokrotnych, jest przyłączenie bromu. Jeżeli roztwór bromu w lodowatym kwasie octowym lub tetrachlorku węgla odbarwia się pod wpływem badanej substancji, świadczy to o obecności wiązania wielokrotnego:



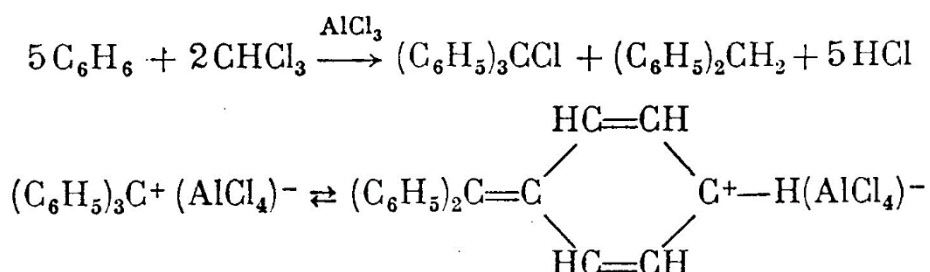
W y k o n a n i e : do ok. 0,5 ml badanej próbki w kwasie octowym lub innym rozpuszczalniku organicznym dodawać kroplami 1% roztwór bromu w kwasie octowym (pod wyciągiem!) starannie mieszając zawartość próbki. Pomarańczowe zabarwienie bromu szybko znika, aż do momentu wysycenia wszystkich wiązań wielokrotnych. Odbarwienie się odczynnika (powyżej dwóch kropli) wskazuje na nienasycony charakter związku. Należy uważać, czy podczas wkraplania odczynnika nie wydzieli się z mieszaniny reagującej bromowodór, który wykrywa się za pomocą bagietki zwilżonej wodą amoniakalną (pojawia się mgła bromku amonu) lub wilgotnego papierka lakmusowego (zabarwia się na czerwono). Odbarwienie się bromu przy jednoczesnym wydzieleniu się bromowodoru nie dowodzi obecności wiązania wielokrotnego, a wskazuje jedynie na zachodzącą reakcję podstawienia.

Roztwory bromu odbarwiają się także pod wpływem związków zawierających nasycony łańcuch węglowy a łatwo ulegających utlenieniu, dlatego też pozytywny wynik doświadczenia nie daje bezwzględnej pewności, że badana substancja jest związkiem nienasyconym.

Układ aromatyczny

1. Próba z chlorkiem glinowym i chloroformem lub czterochlorkiem węgla

Bezwodny chlorek glinowy reaguje ze związkami aromatycznymi w obecności chloroformu lub czterochlorku węgla, dając zabarwione związki kompleksowe. Przyczyną zabarwienia jest powstawanie w wyniku reakcji Friedla-Craftsa związków o charakterze soli karbonyowych:



Węglowodory benzenowe i chlorowcowe pochodne dają zabarwienie żółtopomarańczowe lub czerwone, węglowodory aromatyczne dwupierścieniowe dają zabarwienie niebieskie lub czerwone, związki aromatyczne o bardziej złożonej budowie (trój- i wielopierścieniowe) dają zabarwienie zielone.

Wykonanie: Do 2 ml bezwodnego chloroformu dodać 0,1 g (0,1 ml) badanej substancji. Następnie mieszać starannie, aby zwilżyć ścianki próbówki. Potem dodać 0,5-1 g bezwodnego chlorku glinowego, starając się, aby część proszku zatrzymała się na ściankach. Należy obserwować zabarwienie proszku na ściankach próbówki i w roztworze. Zabarwienia, jakie powstają - od pomarańczowego do żółtego - wskutek reakcji związków aromatycznych z chloroformem i chlorkiem glinowym, są bardzo charakterystyczne. Związki alifatyczne nie dają zabarwienia lub bardzo jasno żółte.

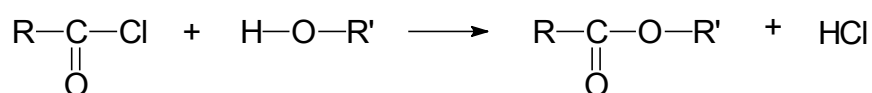
Uwaga. Powyższa próba ma duże zastosowanie w analizie, nie jest jednak całkowicie selektywna. W nieobecności związków aromatycznych może powstawać zabarwienie żółte, jeżeli badana substancja zawiera brom; natomiast czerwone lub fioletowe, jeżeli substancja zawiera jod.

Alkohole

Reakcja acetylowania alkoholi chlorkiem acetylu.

Chlorki kwasowe, w porównaniu z innymi pochodnymi kwasów, ulegają wyjątkowo łatwo reakcjom podstawienia. Reaktywność jest spowodowana obecnością w cząsteczce atomu chloru silnie przyciągającego elektrony. Bardzo mała zasadowość jonu chlorkowego sprawia, że jest on szczególnie łatwo odrywającą się grupą. Jon Cl^- wykazuje minimalną skłonność do atakowania grupy karbonylowej w kwasie. Reakcje chlorków kwasowych są zatem prawie zawsze nieodwracalne, co jest korzystne w preparatyce organicznej.

Chlorki kwasowe reagują z alkoholami w następujący sposób:



Reakcja ta, jako nieodwracalna, zachodzi z doskonałą wydajnością w przeciwieństwie do estryfikacji kwasów karboksylowych alkoholami.

W y k o n a n i e : do 1 ml *n*-propanolu w suchej próbówce dodawać kroplami 1 ml chlorku acetylu (pod wyciągiem!). Zaobserwować efekt cieplny i wydzielanie się chlorowodoru. Po kilku minutach zawartość probówki wlać do około 5 ml H_2O i zaobserwować wytwarzanie się nierozpuszczalnej warstewki cieczy. Nadmiar kwasu zobojętnić dodając stopniowo stałego Na_2CO_3 , wylać mieszaninę na szkiełko zegarkowe i zbadać woń produktu. Owocowy zapach jest charakterystyczny dla estrów.

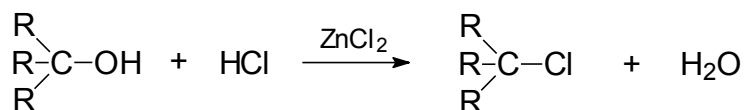
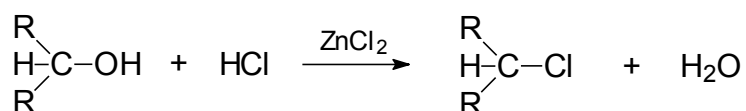
Rozróżnianie rzędowości alkoholi

Alkohole I, II i III rzędowe zachowują się różnie w reakcji z odczynnikiem Lucasa (roztwór 68 g bezwodnego chlorku cynkowego w 52,5 g stęż. kwasu solnego).

Alkohole I rząd., niższe od heksylowych (C₆), nie reagują z tym odczynnikiem dając roztwór klarowny, co najwyżej lekko ściemniały.

W obecności alkoholi II rząd. następuje zmętnienie roztworu, a po 1-1,5 godz. Rozdzielenie się warstw.

W obecności alkoholi III rząd. roztwór mętnieje i szybko wytwarzają się dwie warstwy. Przy czym należy podkreślić, że alkohole III rząd. reagują ze stęż. HCl nawet bez dodatku ZnCl₂.



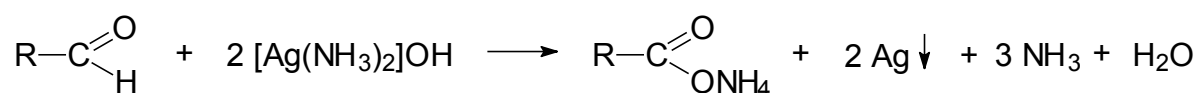
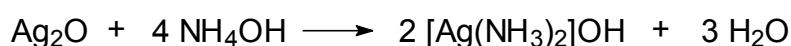
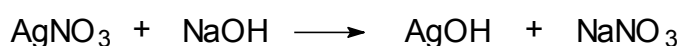
W y k o n a n i e : do 3 suchych probówek z korkiem szlifowym, zawierających kolejno po 0,5 ml: butanol - I rząd., butanol II - rząd. i butanol - III rząd. umieszczonych w łaźni wodnej o temp. 26°C, dodać po 5 ml odczynnika Lucasa. Probówki zakorkować, wstrząsać przez chwilę, po czym odstawić i zaobserwować po jakim czasie utworzy się zmętnienie i rozdzielenie warstw, wyciągnąć wnioski.

Aldehydy

Próba redukcyjna - Tollensa

Grupa aldehydowa, znacznie łatwiej niż ketonowa utlenia się do grupy karboksylowej. Utlenianie jest możliwe gdy w mieszaninie reagującej znajdują się akceptory elektronów. Najczęściej stosowanymi w analityce akceptorami elektronów przy utlenianiu aldehydów są jony metali ciężkich: C^{+2} (próby Fehlinga, Tommera, Hainesa, Benedicta), Bi^{+3} (próba Nylandera) i Ag^+ .

W próbie Tollensa utlenianie aldehydu odbywa się dzięki redukcji jonu srebrowego do srebra metalicznego.

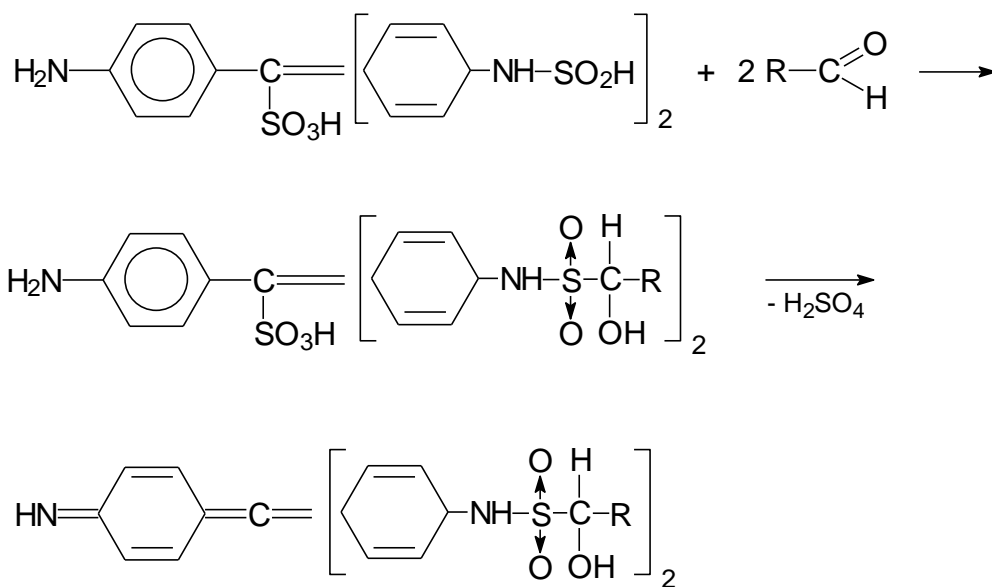


W y k o n a n i e : do bardzo czystej, odtłuszczonej próbówki wlać 2 ml 5% roztworu $AgNO_3$ i 1 kroplę 10% $NaOH$. Następnie dodawać kroplami 2% roztwór NH_4OH , jednocześnie wstrząsając, aż do zupełnego rozpuszczenia tlenku srebra. Dodać 1-2 ml roztworu próby i wstawić na minutę do wrzącej łaźni wodnej. Jeżeli próba zawierała aldehyd, na ściankach próbówki pojawia się lustro srebrowe.

Reakcje grupowe aldehydów

Reakcja Schiffa

Fuksyna jest czerwonym barwikiem, który pod działaniem dwutlenku siarki (kwasu siarkowego) przechodzi w bezbarwny kwas bis-N-aminosulfinowy, tzw. odczynnik Schiffa. Związek ten reaguje z 2 cząsteczkami aldehydu dając nietrwały produkt przyłączenia, który traci kwas siarkawy i powstaje fioletowopurpurowy barwnik chinoidowy zgodnie z reakcją:



W y k o n a n i e : do około 2 ml próby dodać kilka kropli odczynnika Schiffa i lekko wymieszać. Po upływie 3-4 minut roztwór zabarwia się na kolor purpurowo-fioletowy. W środowisku silnie kwaśnym reakcja zachodzi tylko z aldehydem mrówkowym.

Kwasy

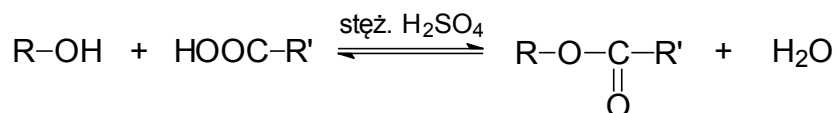
1. Badanie kwaśnego charakteru kwasów karboksylowych

- Niebieski papierek lakmusowy zwilża się kroplą wody destylowanej, nakrapla się badany roztwór lub przykładą kryształek substancji. Zabarwienie papierka na czerwono wskazuje na charakter kwaśny substancji.
- Dla odróżnienia kwasów organicznych od nieorganicznych stosujemy próbę z papierkiem Kongo, który zmienia się na niebiesko pod wpływem kwasów nieorganicznych, zaś kwasy organiczne nie zmieniają go wcale lub na kolor szarofioletowy, który po wyschnięciu papierka znika. Kwas szczawiowy zabarwia papierek Kongo podobnie jak kwasy nieorganiczne.
- Dla odróżnienia kwasów karboksylowych od fenoli wykonujemy reakcję z NaHCO_3 . Kwasy karboksylowe są mocniejszymi elektrolitami niż kwas węglowy, ten zaś mocniejszym kwasem niż fenole.

Wykonanie: 1 ml 5% roztworu NaHCO_3 umieścić na szkiełku zegarkowym, następnie dodać 1 kroplę lub około 0,01 g badanej substancji. Wydzielanie się pęcherzyków CO_2 może wskazywać na obecność kwasu karboksylowego, natomiast brak tego efektu może wskazywać, że badaną substancją jest fenol, ale na pewno potwierdza brak kwasu karboksylowego. Jak z tego widać, próba ta może być jedynie testem wykluczającym obecność kwasów karboksylowych (i innych mocniejszych).

2. Próba na wytwarzanie estrów

Próby estryfikacji wykorzystywane są zarówno dla potwierdzenia lub wykluczenia obecności kwasów lub alkoholi, bowiem powstały produkt odznacza się charakterystycznymi właściwościami, a szczególnie przyjemnym zapachem.



Wykonanie: 1 kroplę lodowatego kwasu octowego ogrzewać łagodnie w suchej probówce z 2 ml absolutnego etanolu i z 1 ml stęż. H_2SO_4 przez 2 min na łaźni wodnej, po czym ochłodzić i wlać ostrożnie do 10 ml 10% roztworu węglanu sodowego, umieszczonego w małej parownicze. Należy szybko zaobserwować zapach produktu. Estry kwasów karboksylowych o niewielkiej cząsteczce posiadają zapach owocowy. Estry kwasów o dużej cząsteczce są bezwonne.

Aminy

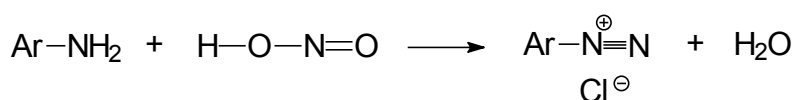
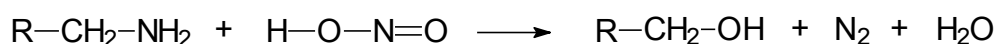
Badanie odczynu amin

Wykonanie: na papierek uniwersalny zwilżony wodą nanieść kroplę trójetyloaminy, na drugi papierek w ten sam sposób nanieść kroplę aniliny. Z różnicy zabarwienia wskaźnika wyciągnąć wniosek o charakterze badanych związków.

Badanie rzędowości amin

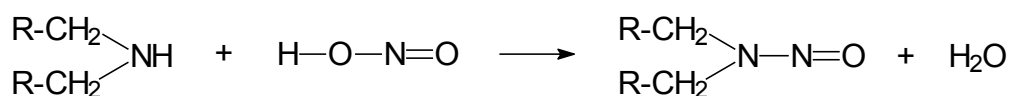
Aminy I, II i III rzędowe reagują z różnymi odczynnikami w sposób specyficzny, co pozwala często na wykazanie ich rzędowości. Odczynnikiem, który reaguje w sposób specyficzny jest kwas azotowy.

Aminy alifatyczne I rzędowe ulegają przekształceniu w alkohole, natomiast aromatyczne aminy I rzędowe w temp. około 0°C tworzą nietrwałe związki dwuazoniowe. Po lekkim ogrzaniu połączenia te tworzą fenole, wydzielając azot, natomiast podczas reakcji z fenolami, przeprowadzonej na zimno tworzą barwniki azowe:

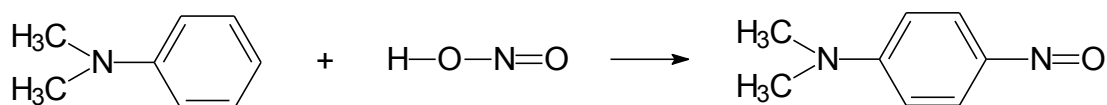


chlerek dwuazoniowy

Aminy II rzędowe (alifatyczne i aromatyczne) tworzą z HNO_2 żółto zabarwione, oleiste nitrozoaminy:

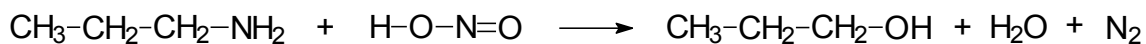


Aminy III rzędowe alifatyczne nie reagują z HNO_2 , natomiast aromatyczne tworzą pochodne *p*-nitrozowe.



Reakcja aminy I rzędowej z HNO₂

Amina alifatyczna I rzędowa pod wpływem kwasu azotawego ulega rozkładowi na alkohol, wodę i azot, którego wydzielanie się świadczy o obecności I rzędowej grupy aminowej w związku.



Wykonanie: 3 ml roztworu zawierającego 4% *n*-propyloaminy i 5% HCl ochłodzić w lodzie, po czym dodawać powoli, kroplami 1,5 ml 10% roztworu NaNO₂ (również chłodzonego). Mieszaninę następnie ogrzać ostrożnie na łaźni wodnej i zaobserwować wydzielanie się pęcherzyków azotu.

Reakcja aniliny z HNO₂

Wykonanie: 3 ml roztworu aniliny w kwasie solnym (10 ml aniliny w 100 ml stęż. HCl) rozcieńczyć 5 ml wody i ochłodzić do 0° C dodając do zlewki 5-10 g lodu (z wody destylowanej!). Następnie dodawać około 5 ml 20% roztworu NaNO₂, z mieszaniem, aż do uzyskania pozytywnej reakcji z papierkiem jodoskrobiowym. Barwa niebieska papierka wskazuje na obecność nadmiaru kwasu azotawego.

a) Reakcja zagotowania:

2-3 ml dwuazowanego roztworu odmierzyć do probówki i ogrzać na łaźni wodnej - wydzielają się pęcherzyki azotu.

b) Reakcja sprzęgania:

2-3 ml dwuazowanego roztworu dodać do oziębionej mieszaniny składającej się z 5 ml wody destylowanej i 2 ml 5% roztworu β -naftolu w 10% NaOH. Powstaje pomarańczowoczerwony barwnik azowy.

Aminokwasy

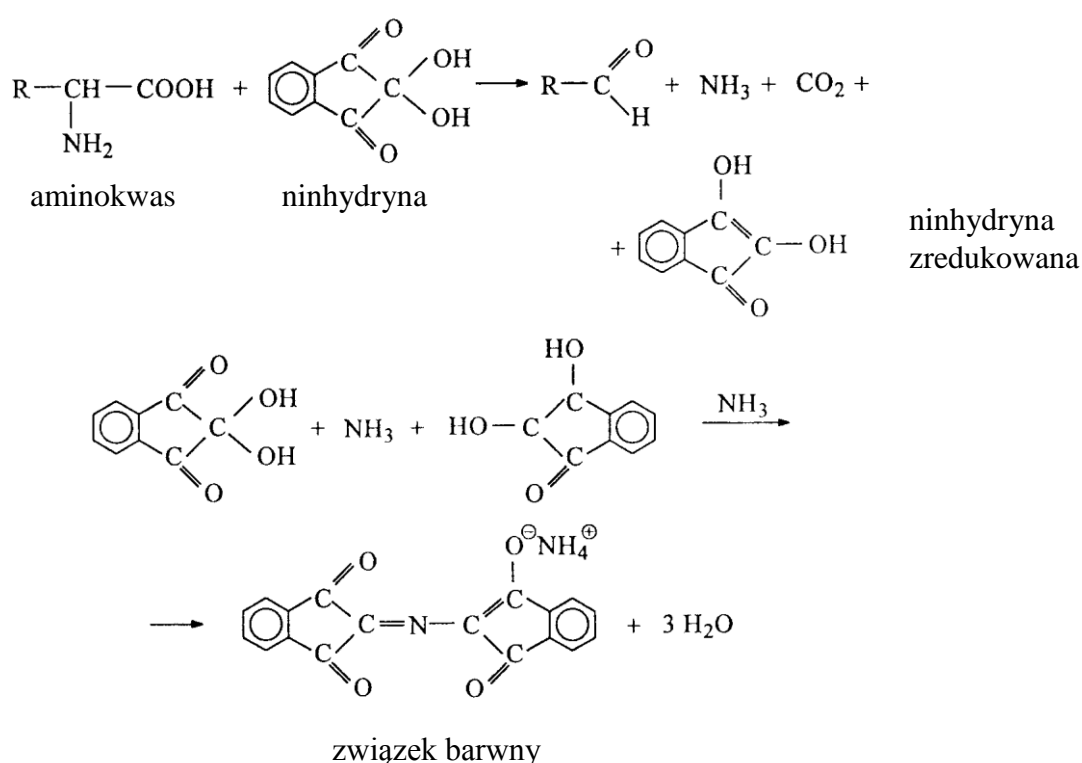
Reakcja ninhydrynowa

Ninhydryna daje reakcję barwną z α -aminokwasami, a także z białkami, z produktami ich rozpadu oraz z NH_3 .

Zależnie od pH, barwa może być niebieska, fioletowa lub fioletoworóżowa. Próba ta wypada ujemnie z proliną i hydroksyproliną.

Reakcja z ninhydryną jest reakcją grupową na aminokwasy, ma podstawowe znaczenie w chemii tych związków, służy do ich wykrywania i ilościowego oznaczania.

Przebieg reakcji jest następujący:



Wykonanie:

a) do 1 ml roztworu aminokwasu (lub białka) dodać 2-4 krople roztworu ninhydryny (0,2% wodny roztwór) i podgrzać do wrzenia. Powstaje niebieskie zabarwienie.

b) na skrawek bibuły chromatograficznej Whatman 1 (5 cm x 5 cm) nanieść czystą bagietką kroplę 1% roztworu glicyny lub kwasu glutaminowego oraz obok kroplę 2% roztworu proliny. Bibułę wysuszyć w strumieniu powietrza, a następnie spryskać 0,5% roztworem ninhydryny w acetonie. Po ogrzaniu pojawiają się barwne plamy.

Ketony

Reakcje grupowe ketonów

Wykrywanie metyloketonów - próba Legala

Polega ona na powstawaniu brunatnoczerwonego produktu reakcji metyloketonu z nitroprusydkiem sodowym.

Wykonanie: mały kryształek nitroprusydku sodowego rozpuścić w około 2 ml próby i pozostawić kilka minut. Następnie dodać 1 ml 2N NaOH. Roztwór przyjmuje barwę pomarańczową do brunatnoczerwonej. Po dodaniu 1-2 kropli lodowatego kwasu octowego barwa zmienia się na czerwoną lub niebieską.

Reakcja z *m*-dwunitrobenzenem

Związki zawierające ugrupowanie $\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$ lub $\text{R}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$ dają z *m*-dwunitrobenzenem zabarwienie fioletowo-czerwone.

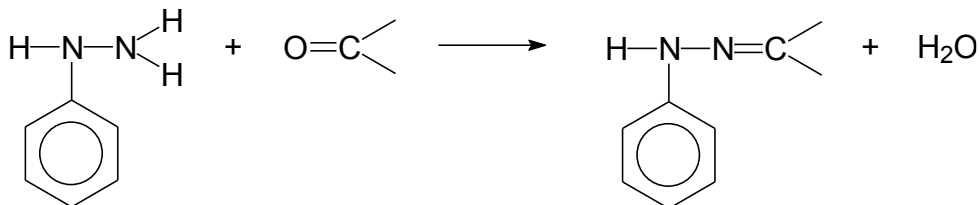
Wykonanie: do około 1 ml badanego roztworu dodać 2 ml propanolu i kilka kryształków *m*-dwunitrobenzenu a następnie kilka kropli 15% roztworu KOH i lekko ogrzać. O dodatnim wyniku reakcji świadczy pojawienie się barw od czerwonej do fioletowoczerwonej.

Wykazywanie grupy karbonylowej

Wspólne reakcje aldehydów i ketonów

Reakcja z fenylhydrazyną

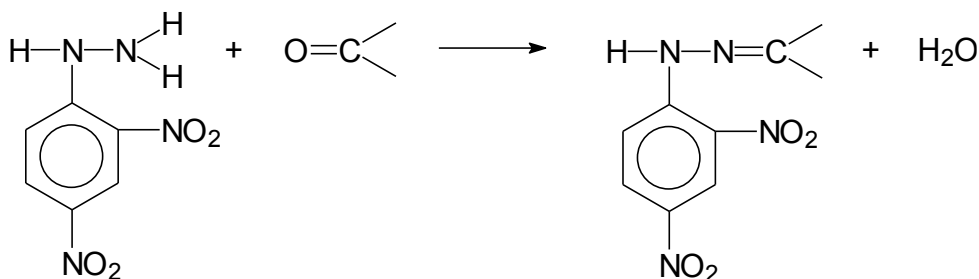
Aldehydy i ketony dzięki obecności w nich grupy karbonylowej >C=O reagują z fenylhydrazyną dając odpowiednie fenylhydrazony o charakterystycznych kształtach kryształów, zgodnie z reakcją:



Wykonanie: do około 2 ml fenylhydrazyny w kwasie octowym dodać 1 ml roztworu próby. Po starannym wymieszaniu, ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez kilka minut. Wyjąć z łaźni, rozcieńczyć 2 ml wody. W trakcie oziębiania pojawia się krystaliczny osad fenylhydrazonu aldehydu lub ketonu.

Reakcja z 2,4-dwunitrofenylhydrazyną

Dwunitrofenylkohydrazony aldehydów i ketonów są bardzo trudno rozpuszczalne i wytrącają się natychmiast w postaci krystalicznych osadów zgodnie z reakcją:

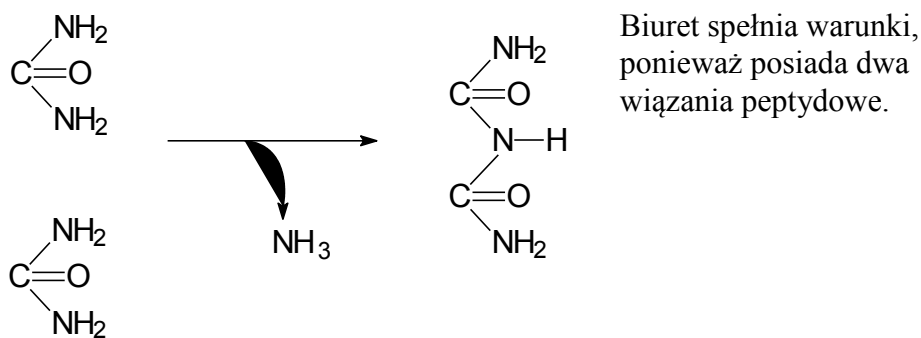


Wykonanie: do 1-2 kropli badanego roztworu dodać 1 ml odczynnika zawierającego 2,4-dwunitrohydrazynę i mocno wytrząsnąć. Wytrąca się krystaliczny osad.

Peptydy

Wykazanie wiązania peptydowego, próba biuretowa

Próba biuretowa polega na tworzeniu się w środowisku alkalicznym barwnego związku kompleksowego miedzi z peptydami zawierającymi w swojej cząsteczce co najmniej dwa wiązania peptydowe $\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{H} \\ \parallel \quad | \\ -\text{C}-\text{N}- \end{array}$. Barwa kompleksu zależy od długości łańcucha peptydowego. Białka dają zabarwienie fioletowe, żelatyna (białko niepełnowartościowe) - niebieskie, proteozy i peptony - różowe, peptydy - słabo różowe. Nie dają tej reakcji aminokwasy i dwupeptydy. Daje ją natomiast biuret (dwumocznik) i stąd pochodzi nazwa tej reakcji biuretowej. Powstaje on przez kondensację dwóch cząsteczek mocznika podczas ogrzewania.



Próba biuretowa jest odczynem grupowym na białka. Ujemny wynik próby biuretowej eliminuje obecność białka. Reakcję tę wykorzystuje się również do kolorymetrycznego, ilościowego oznaczania białka.

Wykrywanie wiązań peptydowych w peptydzie lub białku

Wykonanie: do probówki wlać 2 ml roztworu białka, a do drugiej probówki 2 ml hydrolizatu białkowego (zawierającego kilka-peptydy). Do obydwu probówek dodać po 1 ml roztw. NaOH i dodawać kroplami 10-krotnie rozcieńczony, prawie bezbarwny roztwór siarczanu miedziowego. Płyn przybiera zabarwienie różowo-fioletowe.

Próba ksantoproteinowa

Próba ta jest charakterystyczna dla aminokwasów aromatycznych (zawierających pierścień benzenowy). Pod wpływem stężonego HNO_3 zachodzi nitrowanie pierścienia benzenowego, w wyniku czego powstają pochodne nitrowe o barwie żółtej. Po zalkalizowaniu, związki nitrowe słabo dysocjują i barwa roztworu zmienia się na pomarańczową. Próbę ksantoproteinową, poza aminokwasami aromatycznymi, dają również inne związki aromatyczne, jak fenol, benzen itp.

Wykonanie: do 1 ml roztworu aminokwasu aromatycznego lub białka dodać 5 kropeł stęż. HNO_3 - wytrąca się osad (jeśli było białko), po podgrzaniu roztwór żółknie. Po oziębieniu pod kranem i zalkalizowaniu żółta barwa przechodzi w pomarańczową.

Próba cystynowa

Aminokwasy zawierające siarkę, reagują z ługiem sodowym wytwarzając siarczek sodowy Na_2S , który w reakcji z octanem ołowiu tworzy czarny osad PbS . Reakcja wypada dodatnio z aminokwasami: cysteiną, cystyną i metioniną. Intensywnie dodatni odczyn dają białka zawierające dużą ilość cystyny (np. keratyna).

Wykonanie: do 1 ml roztworu aminokwasu siarkowego (lub białka) dodać 1 ml 30% ługu sodowego, gotować w ciągu 5 minut, a następnie dodawać kroplami roztwór octanu ołowiu - występuje zabarwienie czarne lub szaro-brunatne.

Cukry

Liczne próby na cukry oparte są na redukcji dwuwartościowego jonu miedziowego do jednowartościowego jonu miedziawego, są to próby: Trommera, Fehlinga, Hainesa, Benedicta.

Próba Trommera

Należy pamiętać, że w próbie tej rolę solubilizatora wodorotlenku miedziowego spełnia sam cukier (zamiast winianu sodowo-potasowego, kwasu cytrynowego lub glicerolu) i dlatego błędem jest dodawanie zbyt dużej ilości siarczanu miedziowego, gdyż nadmiar wytworzonego Cu(OH)_2 po ogrzaniu przejdzie w czarny CuO i zamaskuje reakcję. W przypadku, gdy dodano zbyt, dużo CuSO_4 i wytrącający się wodorotlenek miedzi nie rozpuszcza się, należy osad odsączyć, po czym dopiero ogrzać próbę.

W y k o n a n i e : do 1 ml roztworu glukozy dodać 1 ml roztw. NaOH , po czym kroplami roztworu siarczanu miedziowego dopóty, dopóki strącający się wodorotlenek miedziowy jeszcze się rozpuszcza przy wytrząsaniu płynu. Podgrzać górną część płynu do wrzenia. Powstaje żółto-pomarańczowy lub czerwony osad tlenku miedziawego.

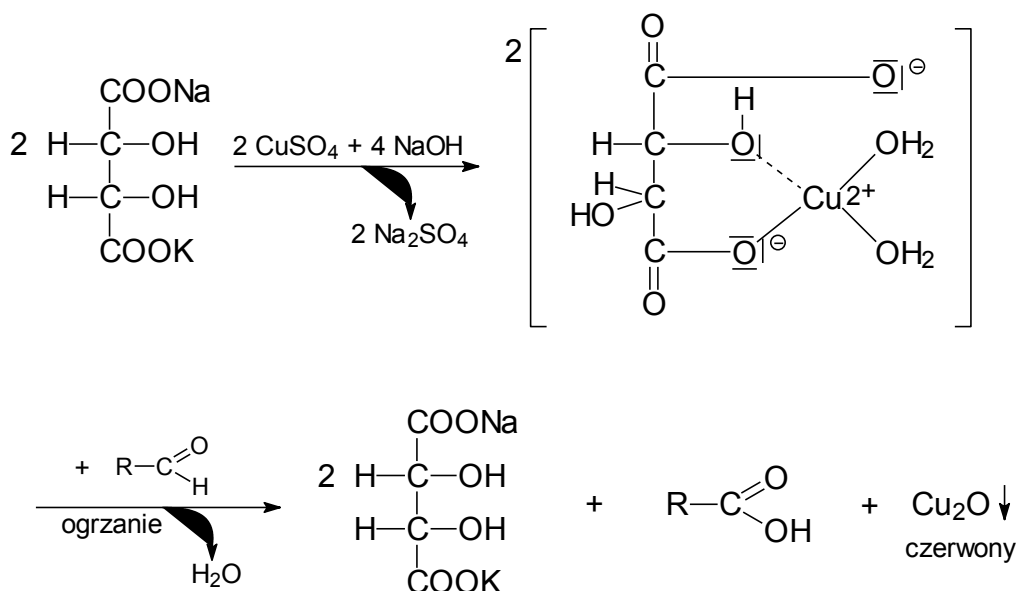
Próba Seliwanowa na ketozy

Ketozy w obecności mocnego 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.

W y k o n a n i e : do 1 ml odczynnika Seliwanowa (0,05% roztwór rezorcyny w kwasie solnym rozcieńczonym wodą destylowaną w stosunku 1:2) dodać 1 kroplę roztworu fruktozy, zmieszać i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej dokładnie 45 sekund, po czym oziębic. W obecności ketoz próba barwi się na czerwono, zaś przy dużych ich stężeniach powstaje osad.

Próba Fehlinga

W próbie Fehlinga po zmieszaniu odczynników Fehling I i II (I - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ w rozcieńczonym H_2SO_4 , II - roztwór winianu sodowo-potasowego i NaOH) powstaje zasadowy roztwór kompleksu wodorotlenku miedzi z winianem, co zapobiega wytrącaniu się $\text{Cu}(\text{OH})_2$ i maskowaniu końcowego produktu reakcji, czerwonego Cu_2O . Dodany cukier redukujący ulega utlenieniu oddając elektrony, które przyjmowane są przez miedź dwuwartościową. W wyniku tego kompleks wodorotlenku miedzi z winianem rozpada się, Cu^{2+} redukuje się do Cu^+ i po ogrzaniu wytrąca się w postaci osadu tlenku miedziawego (Cu_2O).



W y k o n a n i e : zmieszać po 1 ml roztworów Fehlinga I i II, ogrzać do wrzenia (celem sprawdzenia czy nie wystąpi redukcja własna odczynnika), po czym dodać kilka kropli cukru i ponownie ogrzać. Pojawia się osad o barwie od żółtej do czerwonej, co zależy od stanu rozproszenia powstającego tlenku miedziawego.

Próba Molischa z α -naftolem

W y k o n a n i e : do 1 ml roztworu cukru dodać 2 krople alkoholowego roztworu α -naftolu, dobrze wymieszać, a następnie dodać z pipety 1 ml stęż. H_2SO_4 , wlewając go ostrożnie po ściankach do ukośnie trzymanej probówki tak, aby kwas utworzył warstwę poniżej wodnego roztworu, nie mieszając się z nim. Po około 3 minutach, na granic warstw, powstaje czerwono-fioletowy pierścień. Często, poniżej pierścienia pojawia się krążek zielony, który pochodzi od zanieczyszczeń α -naftolu.