**Инструментальные методы химического анализа.**

В инструментальных методах предусматривается использование инструментов – различного рода аналитических приборов. Количественный анализ инструментальными методами проводят двумя путями:

1. определение количества вещества по его физическим свойствам. Концентрация веществ в растворе в определенных пределах связана с некоторыми его физическими свойствами прямой пропорциональностью. Например, угол вращения, оптическое поглощение, электрическая проводимость: L = kC, где k – коэффициент пропорциональности, С – концентрация.

2. определение точки эквивалентности в титриметрическом методе анализа по изменению физических свойств растворов веществ. Применяется при невыраженности скачка титрования и др. причинах. Например, амперометрия, кондуктометрия, фотометрия, потенциометрия.

Инструментальные методы классифицируются:

1. оптические – измеряются оптические свойства веществ и их растворов;
2. электрометрические (***Электрохимические***) – измеряются электрические параметры растворов веществ;
3. резонансные – используют явление резонансного поглощения веществом электрического и магнитного поля;
4. радиометрические – количество вещества измеряют или по их радиоактивности, или с помощью радиоактивных индикаторов;
5. термические – измеряют тепловые эффекты, сопровождающие нагрев, высушивание, титрование и т.д. веществ;
6. хроматографические – применяется метод разделения в комбинации с детекторами разделенных веществ;
7. масс-спектральный – основан на измерении массы ионизированных осколков молекул веществ;
8. ультразвуковые – измеряют скорость ультразвука в растворах веществ.

***Электрохимические методы*** включают в себя

1)электрогравиметрию – выделение из раствора электролитов веществ, осаждающихся на электродах при прохождении через раствор постоянного электрического тока;

2)кондуктометрия – измерение электропроводности анализируемых растворов, изменяющейся в результате химических реакций и зависящей от свойств электролита, его температуры и концентрации растворенного вещества;

3)потенциометрия – измерение изменяющейся в процессе химической реакции потенциала электрода, погруженного в анализируемый раствор;

4) – вольтамперометрия – измерение силы тока, изменяющейся в зависимости от напряжения в процессе электролиза, в условиях, когда один из электродов имеет очень малую поверхность. При полярографии таким электродом является капли ртути, вытекающие из очень тонкого отверстия капилляра;

5) кулонометрия - - измерение количества электричества, израсходованного на электролиз определенного количества вещества.

***Спектральные (оптические) методы*** подразделяются:

1) эмиссионный спектральный анализ – изучение эмиссионных спектров элементов анализируемого вещества (для элементного анализа);

2) абсорбционный спектральный анализ - изучение спектров поглощения исследуемого вещества. Различают исследования в ультрафиолетовой, инфракрасной и видимой областях спектра. Абсорбционный спектральный анализ включает в себя спектрофотометрию (определение спектра поглощения или измерение светопоглощения при строго определенной длине волны, которая соответствует максимуму кривой поглощения данного исследуемого вещества) и колориметрию (сравнение интенсивности окраски исследуемого окрашенного вещества и стандартного окрашенного вещества строго определенной концентрации).

3) турбидиметрия – измерение количества света поглощаемого неокрашенной суспензией;

4) нефелометрия – использование явлений отражения или рассеивания света окрашенными или неокрашенными частицами взвешенного в растворе осадка;

5) люминесценция или флуоресценция, основан на флуоресценции веществ, облученных УФ-светом, и измерении интенсивности излучаемого или видимого света;

6) фотометрия пламени – распыление анализируемого раствора в пламени, выделение характерной окраски световой волны для данного элемента и измерение интенсивности излучения.

***Хроматографические*** методы основаны на различном распределении ве­ществ между подвижной (поток жидкости или газа) и неподвижной (твердой или жидкой) фазами.

***Радиометрические*** методы на измерении излучения, испускаемого радиоактивными элементами.

***Масс-спектрометрические*** методы анализа основаны на определении отдельных ионизированных атомов, молекул радикалов посредство разделения потоков ионов, содержащих частицы с разным отношением массы к заряду в результате комбинированного действия электрического и магнитного полей.

В последнее время все более часто стали использоваться в практике анализе и ***радиоспектроскопические методы***, такие как:

1) ***метод электронного парамагнитного резонанса*** (ЭПР) – использование явления резонансного поглощения электромагнитных волн частицами в постоянном магнитном поле;

2) ***метод ядерного магнитного резонанса*** (ЯМР) – основан на явлении резонансного поглощения электромагнитных волн исследуемым веществом в постоянном магнитном поле, обусловленного ядерным магнетизмом.

Широкое применение находят модифицированные рентгеновские методы, методы электронной микроскопии, ультразвуковые методы.

***Чувствительность и селективность*** инструментальных методов достаточно высоки. Чувствительность от 10-6 до 10-15 г (радиоизотопный анализ). Высокая степень селективности присуща методам, основан­ным на характерных свойствах молекул, функциональных группи­ровок, атомов, обладающих эмиссионными и абсорбционными спек­трами, радиоактивностью, способностью к электрохимическому восстановлению или окислению. Например, по линиям эмиссион­ного спектра обнаруживают и определяют практически все элементы при их совместном присутствии. Эти методы широко применяются в промышленности, сельском хозяйстве, медицине, научных исследованиях, при анализе материалов сложного состава.

***Правильность и воспроизводимость.***

Правильность инструментальных методов анализа зави­сит от того, насколько свойство адекватно отражает состав и свя­зано с ним строго определенными закономерностями. Закономерно­сти, связывающие свойство и состав, устанавливают эксперимен­тально. Поэтому при проведении инструментального анализа пред­варительно проводят калибровку аналитических приборов и выяв­ление зависимости физического свойства от состава. Эти задачи решаются с помощью стандартных образцов. Стандартными образ­цами называют вещества или материалы, имеющие постоянный состав и свойства. Например, в потенциометрии применяют стан­дартные буферные растворы с постоянным значением рН, с их по­мощью калибруют pH-метры, в спектрофотометрии по стандартам веществ составляют калибровочный график, используемый затем для интерпретации результатов измерений исследуемого образца. Применение стандартов позволяет получить правильные результаты анализа.

На воспроизводимость инструментальных методов помимо общих причин (точности отмеривания, отвешивания и др.) влияет стабильность работы аналитического прибора. Последняя зависит от постоянства напряжения электропитания приборов, и стабильности работы детекторов. Постоянство напряжения электро­сети обеспечивают стабилизаторы напряжения, от которых производят питание приборов. Стабильность работы детекторов (фотоэлементов, термоэлементов и т. д.) повышают разностными (дифференциальными) способами измерений. Дифференциальная схема измерений предусматривает использование двух детекторов - стандартного и измерительного, регистрируют в этих схемах раз­ностный сигнал. Иногда дифференциальный способ осуществляют одним детектором, замеряя сначала сигнал стандартного, затем исследуемого образца. Например, в фотоколориметрах используют два фотоэлемента, на один из них поступает световой луч, прошед­ший через растворитель или стандарт, на второй - через раствор определяемого вещества. Разностный сигнал фотоэлементов усили­вается и регистрируется, В однолучевых спектрофотометрах приме­няют один фотоэлемент. В световой поток сначала вводят кювету с растворителем и приводят электрический сигнал фотоэлемента к нулю, затем измеряют поглощение раствора определяемого вещества, получая на шкале разностное показание, связанное только с количеством определяемого вещества. Для точности проводят 3 -5 измерений, затем обрабатывают методами мат. статистики.

**Аналитические приборы.**

Инструментальные методы анализа проводят с помощью анали­тических приборов. Аналитические приборы можно подразделить на два типа: подготовительные и измерительные. Приборы под­готовительного типа предназначены для подготовки об­разца к проведению анализа: пробоотбора, растворения, фильтро­вания, разделения, гомогенизации, отмеривания, отвешивания образца и т.д. К ним можно отнести воронки, мерные колбы, фильтры, перегонные установки и др. Аналитические приборы подготовительного типа в инструментальных методах ана­лиза в принципе могут не отличаться от применяемых приборов в химических методах.

Аналитические приборы измерительного типа пред­назначены для измерений физической характеристики образца, связанной с количеством или другими параметрами определяемого вещества. В химическом количественном анализе такими измери­тельными приборами являлись бюретки (в титриметрическом ана­лизе) или аналитические весы (в гравиметрическом анализе). Ана­литические приборы инструментальных методов рассчитаны на изме­рение определенных физических характеристик веществ или их растворов. Результаты измерений на аналитических приборах либо наблюдают визуально (по отсчетной шкале), либо прибор про­изводит их автоматическую регистрацию (на ленте самописца). По способу регистрации в связи с этим различают нерегистрирую­щие и регистрирующие аналитические приборы. К нерегистрирую­щuм, например, относятся фотоколориметры, отсчет показаний которых производят визуально по шкале измерительного барабана; Регистрирующими приборами являются ИК-спектрофотометры, не­которые марки полярографов, ЯМР-, ЭПР-спектрометры, выдаю­щие результаты измерений в виде спектрограмм или полярограмм на ленте самопишущего потенциометра.

Большинство аналитических приборов включает следующие блоки:

1. Блок источника сигнала, взаимодействующего с веществом. В соответствии с типом сигнала его источником, например, служит электрическая батарея, лампа накаливания (или другие источники электромагнитных волн).
2. Блок селектора, выделяющий из общего потока сигнал с опре­деленными параметрами. Роль селектора выполняют, например, призма и щель в спектрофотометре, выделяющие световой луч опре­деленной волны.
3. Блок преобразователя поданного сигнала под действием опре­деляемого вещества. Преобразователем сигнала, например, в фото­колориметре является кювета с раствором вещества, обладающим способностью поглощать определенную часть видимого света. Блок преобразователя может размещаться до селектора сигнала (в атом­но-адсорбционном спектрофотометре) или даже объединяться с ис­точником сигнала (пламенный фотометр).
4. Блок детектора преобразованного сигнала. К детекторам сиг­налов относятся, например, фотоэлементы в фотоколориметрах, улавливающие световой поток, болометры в ИК-спектрофотометрах, , воспринимающие тепловое излучение, и т. д. Сигнал детектора (обычно электрический) затем усиливается радиотехническими уси­лителями и подается на блок регистратора сигнала.
5. Блок регистратора сигнала обычно представляет собой элек­трический стрелочный измерительный прибор (микроамперметр ), показывающий значение интенсивности сигнала, барабан или шкалу отсчетного устройства (в схемах с электрической или механи­ческой компенсацией сигнала), электронный самопишущий потенциометр (самописец).
6. Блок стабилизатора электропитания прибора необходим для получения устойчивых и воспроизводимых показаний, не завися­щих от колебаний напряжения в электросети. Описанная блок ­схема характеризует работу односигнальных приборов, например рефрактометров, поляриметров, полярографов, УФ-спектрофото­метров и др. В этих приборах используют один сигнал-луч света, разность потенциалов и т. д. При использовании односигнальных приборов обычно сначала регистрируют сигнал растворителя, за­тем сигнал раствора вещества, получая разностный сигнал, харак­теризующий только вещество.

В современных приборах разностный сигнал часто получают, применяя двухсигнальные (дифференциальные) схемы. Например, ИК-спектрофотометры многих марок работают по двухлучевой схеме. С помощью специального устройства детектор фиксирует только разность интенсивностей одного и второго луча, проходящих через раствор и растворитель соответственно. Дифференциальные схемы приборов работают более устойчиво, позволяют в значитель­ной мере автоматизировать процесс анализа и регистрацию резуль­татов измерений (на самопишущем потенциометре).

**Методы определения концентраций в инструментальном анализе.**

В инструментальном анализе применяют несколько методов опре­деления концентраций веществ. В общем виде их можно разделить на две группы - с использованием стандартов веществ и с приме­нением аналитических факторов (показателей) веществ. Стандарты используют в следующих методах аналитических определений.

**Метод калибровочного графика**. Готовят серию разведений стан­дартного раствора вещества с известной концентрацией, замеряют на приборе характеристику свойства приготовленных растворов. По полученным данным строят калибровочный график. Затем измеряют характеристику анализируемого раствора и по графику определяют его концен­трацию (рис. 8).

Приготовление стандартных и анализируемого рас­творов проводят в строго одинаковых условиях, добавляя к ним равные количества реактивов, растворите­лей и т. д.

Для получения более точ­ного результата вместо графического построения можно рассчитать урав­нение калибровочного графика, для чего используют метод средних или метод наименьших квадратов. В уравнение подставляют затем характеристику анализируемого раствора и вычисляют его кон­центрацию.

Пример. При анализе раствора вещества фотометрическим методом были приготовлены разведения его стандартного раствора определенных концентра­ций, которые имеют следующее оптическое поглощение

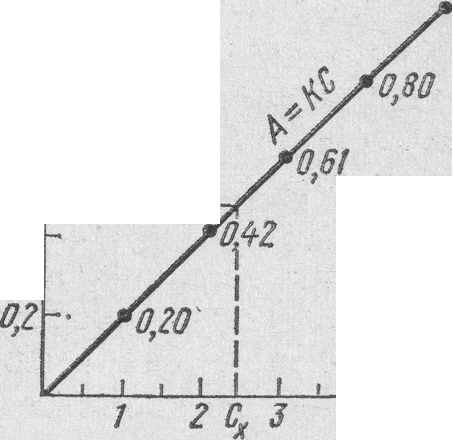


Рис. 8. Калибровочный график фотометрического определения:

А - поглощенне раствора; с­концентрацня вещества

Концентрация С, % 1 2 3 4 5

Поглощение Ас 0,20 0,42 0,61 0,80 0,98

Анализируемый раствор вещества имел поглощение Ах, равное 0,49. Для определения концентрации раствора используем уравнение калибровочного гра­фика, найденное методом средних. Выполнив предварительное построение ка­либровочного графика (рис. 21), убеждаемся в его прямолинейности и прохож­дении через центр осей координат линии зависимости поглощения от концентра­ции. Следовательно, для расчета можно использовать уравнение прямой линии, проходящей через центр координат С = КА, где К - угловой коэффициент: Составляем систему уравнений (по экспериментальным данным): 1 = КО,20; 2 = КО,42; 3 = КО,61; 4 = КО,80; 5 = КО,98. Суммируем полученные урав­нения и находим значение коэффициента К: ZC = ZKA; 15 = К3,01; К = = 15/3,01 = 4,983. Уравнение калибровочного графика С = 4,983А. Подста­вив в него поглощение анализируемого раствора, определяем его концентрацию: С = 4,983.0,49 = 2,441 = 2,44 %.

***Метод сравнения (метод стандарта***). Используется в тех слу­чаях, когда линия зависимости состав – свойство имеет прямолинейный характер и проходит через начало осей координат. На приборе замеряют характеристики свойств стандартного и анализи­руемого растворов. При этом отношение концентраций стандартного и анализируемого растворов равно отношению характеристик СС/Сх=fc/fх.

Метод сравнения обладает меньшей точностью, чем метод кали­бровочного графика (используется только одно измерение стан­дарта).

***Метод добавок***. Замеряют сначала свойство анализируемого раствора, затем повторяют измерение. добавив к раствору опре­деленное количество стандарта (соблюдая при этом равенство условий - объемов растворов и т. д.). Если зависимость состава от измеренного ­свойства прямолинейна, то приращение концентрации анализиру­емого раствора СС вызывает соответствующее приращение харак­теристики свойств fc и можно записать равенства (Сх+Сс)/Сс = (fх + fс)/fс, Сх = Ссfх/fс

Пример. При фотометрическом анализе поглощение анализируемого раст­вора Ах = 0,49, при добавке (к общему обьему раствора) I (W) стандарта (Сс) поглощение раствора стало равным 0.69. Следовательно, прирост поглощений

Ас = 0,69 - 0,49 = 0,20. По уравнению (Сс/Сх=fc/fх) находим Сх= 1.0,49/0,20=2,45 %.

***Метод аналитических факторов (показат*елей**). Этот метод основан на использовании численных значений свойства, отвечающих единице концентрации вещества. Аналитические факторы употребляют в расчетах при строгом соблюдении определенных закономерностей, связывающих характеристику свойства вещества с его концентрацией в растворе. Такие закономерности установлены, например, в рефрактометрии, поляриметрии; спектрофотометрии и ряде дру­гих методов. Применяют два вида аналитических факторов: моляр­ные показатели Fм - соответствующие молярной концентрации ве­щества (моль/дм3); удельные показатели F% - соответствующие процентной концентрации вещества.

Расчет концентраций при использовании аналитических факторов значительно упрощается. Измеряют свойство раствора и делят его на фактор. При этом получают концентрацию вещества в раст­воре в соответствующих единицах: С = f/F (моль/дм3); С = f/F (в %). Кривые инструментального титрования строят в координатах – свойств титруемого раствора – объем добавленного титранта.

**Хроматография.**

Среди методов разделения и очистки органических и неорганических соединений ведущее место занимает хроматография - метод, впервые предложенный в начале про­шлого века русским ученым М. С. Цветом.

Хроматографический метод основан на различном распределении ве­ществ между подвижной (поток жидкости или газа) и неподвижной (твердой или жидкой) фазами.

В зависимости от характера фаз, с по­мощью которых производится разделение, различают газовую, газожидкостную и жид­костную хроматографию. По типу взаимо­действия разделяемых веществ с фазами хроматография делится на адсорбционную, распределительную, ионообменную, гель­хроматографию и электрофорез.

Хроматографический процесс может осуществляться в колонках, тонком слое и на бумаге.

***Адсорбционная хроматография***основана на различии в относительном сродстве компо­нентов разделяемой смеси к твердым адсор­бентам (неподвижная фаза), в качестве ко­торых используются порошкообразные ве­щества - оксид алюминия, силикагель, крахмал, цеолиты, активированный уголь и т. п. Наиболее распространены колоноч­ный и тонкослойный варианты адсорбци­онной хроматографии.

В колонку, обычно представляющую со­бой заполненную адсорбентом стеклянную трубку, вносят раствор смеси веществ. При прохождении через колонку осуществляется разделение компонентов смеси. С помощью подаваемой в колонку подвижной фазы ­растворителя, называемого *элюентом,* - ад­сорбированные вещества в виде зон переме­щаются (вымываются) с различными ско­ростями (жидкостная адсорбционная хроматография). В результате из колон­ки выходят фракции (элюаты) разделенных веществ.

***Хроматография в тонком слое (ТСХ)*** - один из наиболее быстрых способов разделения органических смесей. На тонкий слой сорбента на подложке (стек­лянной или алюминиевой пластинке) в виде нескольких точек или зон нано­сят раствор разделяемых веществ. В хроматографической камере, при подъеме подвижной фазы по пластинке снизу вверх происходит разделе­ние веществ. Бесцветные вещества обнаруживают путем обработки пластинки различными химическими реагентами, образующими при взаимодействии сними окрашенные пятна. При использовании готовых пластинок с люминес­центным индикатором ряд веществ (пятен) можно обнаружить при облучении УФ-светом. Положение пятна на хроматограмме характеризуется величиной *Rf* являющейся отношением расстояния*,* пройденного веществом к расстоянию *L,* пройденному растворителем.

***Распределительная хроматография***основана на разделении веществ за счет различия в коэффициентах распределения между двумя или более несмеши­вающимися жидкими фазами или неподвижной жидкой и газовой фазами.

Неподвижной фазой служит твердый носитель, пропитанный специальной жидкостью, подвижной - растворитель (жидкостная распределительная хро­матография) или газ (газожидкостная хроматография, ГЖХ). Распределитель­ная хроматография обычно осуществляется на бумаге или колонках.

В хроматографии на бумаге носителем неподвижной водной фазы служит специальная хроматографическая бумага. Как и в тех, раствор смеси разде­ляемых веществ наносится на стартовую линию полоски бумаги, помещаемой в хроматографическую камеру. Подвижная фаза поднимается по бумаге вверх ­восходящая хроматография или стекает вниз - нисходящая хрома­тография. При этом происходит распределение компонентов смеси между фазами. В зависимости от значения коэффициентов распределе­ния вещества движутся с различной скоростью, разделяясь на бумаге на от­дельные пятна, отличающиеся величиной Rf

Впервые хроматография на бумаге была предложена для качественного и количественного определения аминокислот и пептидов, полученных при гид­ролизе белка. До настоящего времени этот способ пригоден для разделения природных веществ - углеводов, липидов, нуклеотидов и др.

***Колоночная хроматография*** с применением жидкой подвижной фазы (как правило, смеси органических растворителей) широко используется в обычной лабораторной практике (жидкостная распределительная хроматография).

Высокоэффективное разделение веществ достигается при использовании газовой подвижной фазы. ГЖХ - универсальный метод разделения смесей разнообразных веществ, испаряющихся без разложения. Для увеличения лету­чести многие природные соединения превращают в производные: а-амино­кислоты в метиловые или этиловые эфиры, моносахариды в их триметилсилиловые эфиры и др.

ГЖХ осуществляют на приборах, называемых хроматографами. Разделен­ные вещества фиксируются в виде пиков на хроматограмме. Поло­жение каждого пика определяется временем, в течение которого вещество проходит колонку до момента выхода (время удерживания), или объемом про­шедшего газа-носителя (удерживаемый объем). Количественное определение компонентов в смеси может быть с высокой точностью осуществлено путем измерения относительных площадей соответствующих пиков.

***Ионообменная хроматография*** включает обратимый обмен ионов, содержа­щихся в растворе разделяемой смеси, на ионы полимерных смол, называемых ионитами (катиониты, аниониты) и используемых в качестве неподвижной фазы. Катиониты - это вещества кислотного характера, содержащие карбо­ксильные и сульфогруппы, протоны которых обмениваются на катионы. Ани­ониты содержат в своем составе группы основного характера, например ами­ногруппы различной степени замещения.

В отличие от ранее рассмотренных видов хроматографии ионообменная хроматография основана на химическом взаимодействии активных групп неподвижной фазы с ионами разделяемых соединений. Она используется для разделения смесей белков и аминокислот, которые в водном растворе находят­ся в виде ионов. Ионообменная хроматография положена в основу действия специальных приборов - автоматических аминокислотных анализа­торов.

***Гель-хроматография*** (гель-фильтрация, или ситовая хроматография) - ме­тод разделения, очистки и анализа веществ, основанный на различии в разме­рах или массе молекул. В качестве стационарной фазы используют различные гели с трехмерной сетчатой структурой: декстраны (полисахариды), полиакрил­амиды, пористые силикагели, цеолиты и др. При разделении смеси небольшие молекулы диффундируют через поры набухшего в растворителе геля, а крупные молекулы проходят через пространство между частицами геля. При промыва­нии геля растворителем в первую очередь перемещаются крупные молекулы, а затем уже мелкие, т. е. компоненты смеси элюируют в порядке уменьшения их молекулярной массы. Гель действует как молекулярное сито. Аппаратурная простота метода и мягкие условия разделения способствовали особенно ши­рокому применению гель-хроматографии в биохимических исследованиях. Основное назначение гель-хроматографии - разделение высокомолекулярных веществ. С ее помощью выделены и очищены многие ферменты, пептидные гормоны, нуклеиновые кислоты.

***Электрофорез*** представляет собой метод разделения смеси веществ под дей­ствием электрического тока. При этом в электрическом поле перемещаются заряженные молекулы, а растворитель остается неподвижным. Электрофорез применяется главным образом в области биополимеров - белков, гликолипопротеинов, нуклеопротеинов, нуклеиновых кислот, среди которых пер­выми с помощью этого метода были разделены белки плазмы крови человека.

Хроматографические методы находятся в стадии развития и постоянного обновления, совершенствуется аппаратура для их проведения. Например, за счет применения высокого давления, колонок малого сечения и мелкодис­персных сорбентов жидкостная распределительная хроматография стала вы­сокоскоростным процессом, осуществляемым с помощью современных жид­костных хроматографов. Появились разновидности хроматографических мето­дов, базирующихся на новых принципах. Так, в биохимической практике для выделения белков - ферментов, иммуноглобулинов, рецепторных белков ­используется аффинная хроматография, основанная на способности биологи­чески активных соединений взаимодействовать лишь с определенными веще­ствами смеси и образовывать с ними нековалентносвязанные комплексы, ко­торые под действием элюирующего раствора могут диссоциировать. Теорети­ческие основы рассмотренных хроматографических методов более подробно излагаются в курсе общей химии.

Важной частью хроматографического анализа является детек­тирование (обнаружение) разделенных компонентов. Чаще всего детектирование осуществляют специальными реактивами, обра­зующими цветные соединения с компонентами; в отдельных мето­дах применяют инструментальные способы. Детектирование может быть проведено непосредственно на неподвижной фазе (на хромато­грамме), при обработке которой растворами реактивов проявляются окрашенные зоны или пятна, содержащие компоненты, пробы. Такой способ детектирования применяют в бумажной и тонкослойной хроматографии. Иногда компонент экстрагируют из зоны подходя­щим растворителем, и детектирование проводят в полученном экстракте. В колоночной и капиллярной хроматографии детекти­рование осуществляют либо в потоке элюата, либо во фракциях элюата. Здесь чаще используют инструментальные способы детек­тирования, применяя специальные детекторы, сигнал которых ре­гистрируется самописцем в виде хроматограммы - графика зависимо­сти величины сигнала детектора от времени или объема элюата. При появлении компонента образца в элюате на хроматограмме регистрируется соответствующий сигнал детектора.

**Спектральные методы.**

Спектральные методы связаны с воздействием на вещество электромаг­нитного излучения. Важнейшими из них являются электронная (ультрафиоле­товая, УФ), колебательная (инфракрасная, ИК) спектроскопия и спектроско­пия ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Механизм взаимодействия элек­тромагнитного излучения с веществом в разных областях электромагнитного спектра (табл. 17.1) различен, но в любом случае происходит поглощение мо­лекулой определенного количества энергии (абсорбционная спектроскопия). При этом молекула переходит из одного энергетического состояния в другое.

Таблица 18.

Электромагнитный спектр.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Излучение | Длина волны, см | Процессы, происходящие при поглощении или излучении | Спектральные методы |
| Мягкое рентгеновское | 10-8-10-6 | Переходы внутренних электронов в атомах | Рентгеноспектроскопия |
| ультрафиолетовое и видимое | 10-6-10-4 | Переходы валентных электронов | Электронная спектроскопия |
| Инфракрасное | 10-4-10-2 | Колебательные переходы молекул | Инфракрасная спектроскопия |
| Микроволновое | 10-1-10 | Вращательные переходы молекул | Спектроскопия гамма- резонанса |
| Короткие радиоволны | >100 | Спиновые переходы ядер и электронов | Спектроскопия ЯМР, ЭПР |

В общем случае для получения спектра поглощения образец вещества по­мещают между источником и приемником электромагнитного излучения. Приемник измеряет интенсивность прошедшего через образец излучения в сравнении с первоначальной интенсивностью при данной длине волны.

Электромагнитное излучение может быть охарактеризовано либо волновыми, либо энергетическими параметрами. Волновой параметр – длина волны λ (нм, ммк, мк, А, см, м (1 ммк = 1 нм = 10-7см = 10 А)), либо частота колебаний ν (cv-1), которые связаны между собой уравнением ν = Сс/λ, где Сс – скорость света. Спектральные методы исследования применяются для анализа органических соединений. Все спектральные методы основаны на общих законах поглощения света:

Первый закон Бугера-Ламберта – если световой поток с интенсивностью I0 падает на кювету с раствором, то часть его отразится от воверности кюветы (Iотр), часть будет поглащена раствором (Iп) и часть пройдет через кювету (It). Так как Iотр  - небольшая величина ею можно пренебречь, то I0 = Iп + It. Вследсьвие экспериментов Бугер и Ламберт сформулировали закон: «слои вещества одинаковой толщины, при прочих равных условиях, всегда поглощают одну и ту же часть падающего на них светового потока. It = I0⋅e – k`l, где е – основание натурального логарифма, l – толщина слоя. Положив в основу десятичный логарифм, получим It = I0⋅10 – Kl, где K – коэффициент погашения, зависящий от природы растворенного вещества и длины волны падающего света.

Второй закон Бера гласит, что коэффициент погашения K пропорционален концентрациям поглощенного вещества K = εС, где ε - коэффициент не зависящий от концентрации, называющийся молярным коэффициентом погашения; С – концентрация вещества.

Объединив эти законы получим закон Бугера - Ламберта – Бера It = I0⋅10 – εСl.

It / I0 = Т = 10 – εСl, величина Т отнесенная к толщине 1 см, называется коэффициентом пропускания. Логарифм обратной величины коэффициента пропускания носит название экстинкции или оптической плотности: Е = D = 1/Т = lg (I0/It). С применение данных закон ведут вычисления концентрации вещества в исследуемых растворах.

**Электронная спектроскопия**

Электронная спектроскопия, т. е. УФ-спектроскопия и спектроскопия в видимой области, применяется для идентификации и установления структуры соединений, анализа их смесей и кинетических исследований.

Возникновение электронного спектра связано с поглощением света соединениями в ближней УФ- (200-400 нм) и видимой (400-800 нм) областях спектра. Спектр поглощения записывается в виде зависимости интенсивности поглощения ε (или ее логарифма) от длины волны λ. Энергия света в УФ- и видимой областях настолько велика, что одновременно с перераспределением электронной плотности вызывает колебания и враще­ние атома. В результате их наложения в спектре вместо узких линий наблюда­ются полосы поглощения, характеризующиеся интенсивностью (ε макс) и дли­ной волны в точке максимума (λмакс).

При поглощении света молекула пе­реходит из основного в возбужденное состояние, что сопровождается перерас­пределением электронной плотности. Упрощенно это можно представить как перемещение электронов со связываю­щих σ- и π- несвязывающих π-МО на разрыхляющие σ- и π-МО.

Возможны четыре типа электронных переходов: σ~σ\*, π~σ\* и π~π\* и π~π\*. Электроны на несвязываю­щей МО не участвуют в образовании связей, поэтому соответствующих им разрыхляющих орбиталей не существу­ет. Переход π-электрона при поглоще­нии света может происходить на σ\* - и π\*-МО.

Поглощение света молекулой осуществляется избирательно: поглощаются те кванты света, энергия которых равна разности энергий между орбита­лями основного и возбужденного состояний. Чем меньше эта разность, тем больших длин волн поглощается светом. Наибольшая энергия требуется для осуществления σ~σ\* электронного перехода. Поэтому соедине­ния, у которых имеются только σ-связи, например алканы и циклоалканы, непоглощают свет в рабочем интервале серийных УФ-спектрофотометров (200­ - 800 нм). В связи с этим они могут использоваться в качестве растворителей при снятии УФ-спектров других соединений. Аналогичное применение нахо­дят насыщенные соединения, содержащие гетероатомы с неподеленными па­рами электронов (О, N, S, галогены). Хотя в их спектрах возможно проявление π~σ\*-перехода, максимум поглощения в таких соединениях, как спирты, простые эфиры, хлороалканы, все же не превышает 200 нм.

Способность поглощать свет представляет собой суммарное свойство всех связей молекулы в целом. Однако некоторые полосы поглощения в УФ-спект­ре можно отнести к электронным переходам в отдельных структурных фраг­ментах молекулы, называемых хромофорами. К ним относятся многие функциональные группы, в которых атом с неподеленной парой электронов связан с соседним атомом кратной связью. В таких группах, кроме σ~σ\*, возможны еще два электронных перехода: π~π\* и π~π\* Если π~π\*­переход в изолированных хромофорах всегда находится в дальней УФ-области (200 нм), то n~π\*-переход уже проявляется в ближней УФ-области и может быть использован в практических целях.

В молекулах с сопряженными хромофорами (полиены, арены) увеличение делокализации π-электронов приводит к тому, что переход π-электронов будет происходить при облучении светом с меньшей энергией, чем в несопряжен­ных системах.

Полосы поглощения, обусловленные π~π\*-переходами в сопряженных системах, имеют большую интенсивность и смещены в более длинноволновую часть спектра. Такое смещение называют батохромным сдвигом. Так, транс-каротин, в молекуле которого имеется открытая цепь из 11 сопряженных двойных связей, интенсивно поглощает свет в видимой об­ласти за счет π~π\* электронных переходов.

В электронной спектроскопии практически основными объектами анали­за являются соединения с сопряженными хромофорами, например кароти­ноиды, ароматические соединения бензольного и гетероциклического рядов.

**Инфракрасная спектроскопия.** Молекула не является жесткой покоящейся структурой. Составляющие ее атомы постоянно колеблются. Поэтому даже при отсутствии внешнего воздей­ствия молекула находится в колебательном состоянии с определенной колеба­тельной энергией.

Колебания связанных атомов в молекуле подразделяются на два основных типа:

***валентные*** колебания - ритмичные колебания вдоль оси связи, при ко­торых расстояние между колеблющимися атомами увеличивается или умень­шается, но сами атомы остаются на оси валентной связи (связь растягивается или сокращается);

***деформационные*** колебания - атомы отклоняются от оси валентной свя­зи с изменением валентных углов. При этом связи меняют положение относи­тельно друг друга в одной (плоскостные колебания) или разных (внеплоскост­ные колебания) плоскостях.

Информацию о валентных и деформационных колебаниях атомов в моле­куле дают спектры поглощения в средней ИК-области электромагнитного спектра (см. табл. 19). Колебания атомов происходят с определенными кван­тованными частотами. Связь поглощает ИК-излучение такой же частоты, с какой колеблется сама, т. е. частота поглощенного излучения равна частоте колебаний определенной связи в молекуле. Следовательно, проанализировав с помощью ИК-спектрометра весь диапазон частот прошедшего через образец света, можно получить информацию о том, какие частоты колебаний имеются в молекуле.

Поглощение ИК-излучения фиксируется как ослабление интенсивности I прошедшего через образец света по отношению к исходной интенсивности **I0: T =(I/I0).100%.** Пропускание записывается на оси ординат ИК-спектра, а по оси абсцисс откладывается длина волны λ в микрометрах (мкм) или волновое число l/λ в обратных сантиметрах (см-l). Хотя поглощение энергии квантовано, ИК- спектр состо­ит не из узких пиков, а из полос. Это обусловлено тем, что каждое изменение колебательной энергии сопровождается изменениями вращательной энергии и к колебательному переходу примешиваются врашательные переходы.

Некоторые группы атомов поглощают ИК-излучение в узком интервале частот почти независимо от структуры остальной части молекулы, причем эти частоты мало меняются при переходе от одного соединения к другому. Такие частоты или полосы в ИК -спектре называют характеристическими. Характе­ристические полосы поглощения дают все связи, в которых принимает учас­тие легкий атом водорода (О-Н, N-H, С-Н и др.), а также группы, содер­жащие кратные связи (С=О, С=С и др.) (табл. 3).

На основании табличных характеристических частот по полученному ИК -спектру органического соединения определяют различные группировки атомов в молекуле и тем самым устанавливают его строение. Для этого ИК-спектр целесообразно условно разделить на четыре области и проанализи­ровать каждую из них, начиная с высокочастотной области:

**область** 3700-2900 см-l - проявляются валентные колебания связей атома водорода с атомами кислорода, азота, серы и углерода;

**область** 2500-1900 см-l - обычно называется областью тройных свя­зей, потому что здесь находятся полосы поглощения таких характеристиче­ских групп, как с=с, C=N;

**область** 1900-1300 см-l - проявляются валентные колебания связей С=С алкенов, С=С ароматического кольца, С=О, С= N и других групп, т. е. это область двойных связей;

**область** менее 1300 см-l - особенно богата полосами, большая часть которых трудно поддается расшифровке, так как обусловлена колебаниями уг­леродного скелета всей молекулы. Спектр поглощения в этой области являет­ся индивидуальной характеристикой соединения, поэтому ее называют об­ластью «отпечатков пальцев» и при установлении идентичности соединений обращают на нее особое внимание.

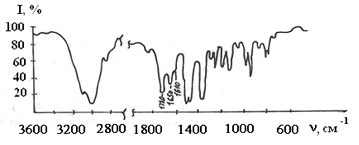


Рис. 9. ИК -спектры конденсирующихся продуктов окисления АПП

ИК-спектроскопия в органической химии используется для идентифи­кации и установления строения соединений, изучения внутри- и межмоле­кулярных взаимодействий (водородные связи), кинетического контроля реак­ций и т. д.

Таблица 19.

Характеристические частоты поглощения некоторых связей

в инфракрасной области

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Связь | Соединения | Диапазон частот (ν), см-1 | Интенсивность полосы |
| -С-Н | Алканы | 2960-2850 | Сильная, средняя |
| =С-Н | Алкены | 3100-3010 | Средняя |
| ≡С-Н | Алкины | 3300 | Сильная |
| >С-Н | Арены | 3100-3000 | Переменная |
| -О-Н (неассоциированная) | Спирты, фенолы | 3700-3600 | Средняя |
| -S-H | Тиоспирты, тиофенолы | 2600-2550 | Слабая |
| >N-H(неассоциированная) | Первичные и вторичные амины | 3550-3350 | Средняя |
| -С-ОН, >С-ОН | Спирты, фенолы | 1200-1000 | Сильная |
| >С=О | Алифатические альдегиды Алифатические кетоны Алифатические кислоты | 1740-1720  1725-1705  1725-1700 | »  »  » |
| -СОО- | Соли карбоновых кислот | 1600-1590  1400 | Сильная, слабая |
| >С=С< | Алкены, ароматические соединения | 1660-1500 | Средняя |
| -С≡С- | Алкины | 2250-2150 | Слабая |
| -C≡N | Нитрилы | 2250-2200 | » |

**Спектроскопии ЯМР lH**

По «полю» или «против поля». Эти направления ориентации характеризуются раз­личной величиной энергии - первое обладает меньшей энергией, чем второе. Поэтому большая часть протонов будет занимать низший энерге­тический уровень. При воздействии на протоны внешним электромагнитным излучением с величиной энергии, равной разности энергетических уровней, происходит ее поглощение, и протоны переходят с одного уровня на другой (резонансный переход). Резонансная частота ν поглощенного излучения фик­сируется в приемнике ЯМР-спектрометра и выдается в виде графика зависи­мости от интенсивности излучения.

Информативная ценность спектроскопии ЯМР lH базируется на том, что протон в зависимости от электронного окружения поглощает излучение раз­личных частот, так как в разной степени экранируется магнитными полями электронов и ядер. Смещение резонансной частоты поглощения под влияни­ем электронного окружения было названо химическим сдвигом о. Его измеря­ют относительно выбранного стандарта - тетраметилсилана (CH)4Si (ТМС), химический сдвиг ядер lH которого принят равным нулю. Химический сдвиг измеряется в безразмерных миллионных долях (м. д.) и рассчитывается по формуле

δ = ((vобразец – vТМС)/рабочая частота генератора).106

Величина химических сдвигов протонов, как правило, зависит от электроотрицательности соседних атомов и групп. Элек­троноакцепторные заместители уменьшают электронную плотность вокруг данного протона (дезэкранируют его) и сдвигают сигнал в слабое поле по сравнению с протонами ТМС. Электронодонорные заместители действуют противоположным образом. В первом приближении, чем более кислым явля­ется протон, тем больше его химический сдвиг. Однако протоны в некоторых соединениях, например бензоле, дают сигнал в более слабом поле, чем можно было бы ожидать, исходя из электроотрицательности sр2гибридизованного

Сдвиг в сильное поле: увеличение магнитного экранированного протона атома углерода. Такое сильное дезэкранирование объясняется возникновени­ем «кольцевого тока» за счет циркуляции электронов бензольного кольца подвлиянием внешнего магнитного поля. Кольцевой ток индуцирует магнитное поле, которое совпадает с направлением внешнего магнитного поля в областинахождения протонов и дезэкранирует их. Величины химических сдвигов ароматических протонов используются в качестве экспериментально­го критерия ароматичности.

В спектре ЯМР lH этанола протоны метиленовой и гидро­ксильной групп вследствие различного окружения имеют отличающиеся резо­нансные сигналы, наблюдаемые при разных напряженностях поля. Сравнение интенсивности сигналов, определяемых по высоте ступенек интегральной кривой (пунктирная линия), позволяет определить соотношение числа экви­валентных протонов в отдельных группировках. Таким образом, по величине химических сдвигов и суммарной интенсивности резонансных сигналов мож­но сделать начальные выводы о структуре исследуемого соединения.

Как видно из рис. 10, протоны одного типа - метильные или метиле­новые - проявляются не в виде единичного резонансного сигнала, а расщеп­ляютcя на ряд линий. Это явление, называемое спин-спиновым взаимодействu­ем, возникает в результате влияния соседних протонов друг на друга через две(Н-С-Н) или три ковалентных связи (Н-С-С-Н). Магнитное поле, на­веденное одним протоном, изменяет магнитное поле вокруг второго протона, приводя к расщеплению его сигнала. Мерой спин-спинового взаимодействия служит константа спин-спинового взаимодействия J, которая характеризует расстояние между расщепленными линиями.

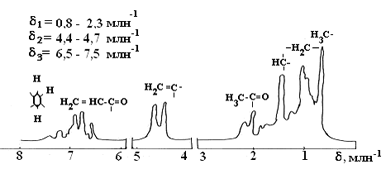


Рис. 10. ЯМР Н1-спектр конденсирующихся продуктов окисления АПП.

В отличие от химического сдвига константа J не зависит от напряженнос­ти внешнего магнитного поля. Число сигналов, обусловленных спин-спино­вым взаимодействием (мультиплетность сигнала М), зависит от числа прото­нов п у соседних атомов и определяется по формуле М = n + 1. Так, протон ОН-группы этанола под влиянием двух протонов соседней метиленовой груп­пы проявляется в спектре ЯМР1Н в виде триплета с соотношением интенсив­ностей 1:2:1. Аналогичным образом расщепляются протоны метильной груп­пы. Протоны метиленовой группы, взаимодействуя как с тремя протонами СН3-группы, так и протоном ОН-группы, дают в спектре сигнал в виде муль­типлета.

Таким образом, каждый сигнал в спектре ЯМР1Н характеризуется тремя параметрами: величиной химического сдвига, интенсивностью и величиной константы спин -спинового взаимодействия.

**Электронный парамагнитный резонанс**

Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) применя­ется для исследования парамагнитных молекул, т. е. молекул с неспаренные электронами (свободные радикалы, ион-радикалы и т. д.). Метод ЭПР осно­ван на тех же принципах, что и метод ЯМР. Однако в случае ЭПР регистриру­ется резонансное поглощение электромагнитных волн электронами (а не яд­рами), имеющими нескомпенсированные магнитные моменты.

Спектр ЭПР дает в первую очередь информацию о наличии и количестве парамагнитных (свободнорадикальных) частиц в исследуемом веществе в сравнении со стандартом. Кроме того, в результате взаимодействия неспарен­ного электрона с соседними магнитными ядрами 1Н, 13С, 14N, 17О и др.) его резонансный сигнал расщепляется (сверхтонкое расщепление). Следователь­но, по спектрам ЭПР можно определит строение свободных радикалов, рас­пределение в них электронной плотности и отличить их друг от друга.

В связи с малой стабильностью большинства свободных радикалов метод ЭПР незаменим при изучении радикальных реакций, например реакций окис­ления под действием ферментов. ЭПР также применяется для исследования структуры и конформаций различных биообъектов (ферменты, фосфолипиды и т. д.). Для этого к исследуемому веществу присоединяют устойчивую ради­кальную частицу, называемую «спиновой меткой», вводят вещество в ка­кую-либо биологическую систему и по спектрам ЭПР наблюдают за происхо­дящими во времени изменениями.

**Масс-спектрометрия**.

Масс-спектрометрия используется для выяснения структуры органиче­ских соединений, а также определения их молекулярной массы. Метод осно­ван на ионизации молекул под действием потока электронов, интенсивного коротковолнового излучения, путем столкновения с возбужденными атомами и ионами или в сильном электрическом поле.

Например, под действием электронного удара за счет выбивания одного электрона из нейтральной молекулы может образоваться один из электронов неподеленной пары гетероатома или один из π-электронов: R + е-→R+.+2е-. Образовавшийся катион-радикал называют молекулярным ионом (М+), образова­ние которого в масс-спектре дает возможность определить молекулярную массу соединения. При действии пучка электронов с большей энергией (-70 Эв) моле­кулярный ион претерпевает разноплановый постадийный распад (фрагментацию) с разрывом химических связей и образованием более простых нейтральных мо­лекул и мелких осколочных положительно заряженных ионов. Эти ионы ускоря­ются в электрическом поле, после чего в зоне магнитной фокусировки меняю траекторию движения в соответствии с отношением их массы к заряду (m/е). При различной силе магнитного поля ионы поочередно попадают в детектор. После усиления сигнал записывается в виде зависимости числа ионов от вели­чины m/е. Вероятность образования различных ионов зависит от энергии свя­зи и стабильности возникающих заряженных или нейтральных осколков.



Рис. 11. Фрагмент масс-хроматограммы гексановой фракции

При изучении масс-спектров был выявлен ряд общих правил для интер­претации и прогнозирования наиболее характерных пиков и путей распада.

Например, установлено, что при фрагментации преимущественно образуются более стабильные третичные карбокатионы; распад ненасыщен­ных соединений происходит с разрывом связи, расположенной в β-положении к кратной связи, ароматической системе или гeтepoaтoмy, которые способствуют стабилизации образующегocя ка­тиона. При фрагментации часто образуются следующие стабильные нейтральные молекулы: монооксид углерода, вода, аммиак, сероводо­род, циановодород и др. для алифатических функциональных производных (спирты, альде­гиды, кетоны, амины и др.) наиболее важным процессом фрагментации служит разрыв связи у атома углерода, несущего функциональную группу (α-разрыв). Например, фрагментация молекулярного иона этиламина, возникшего при потере одного из электронов неподеленной пары атома азота, протекает преимущественно с отщеплением метильного радикала.

Образовавшийся ион (М – СН3)+ проявляется в масс-спектре в виде максимального пика. В то же время пик фрагмента (M-l)+ с m/е 44, обус­ловленный альтернативным отрывом атома водорода, в 5 раз менее интенсивен.

Определив по масс-спектру образующиеся фрагменты, можно в сочета­нии с другими физическими методами воссоздать структуру исходной молеку­лы. С этой целью масс-спектрометрия быта использована для определения последовательности аминокислотных остатков в пептидах (М. М. Шемякин, Ю. А. Овчинников, И. С. Вульфсон), установления строения производных угле­водов (Н. К. Кочетков, О. С. Чижов). В настоящее время перспективным ме­тодом идентификации и структурного анализа смесей стала хромат-­масс-спектрометрия, явившаяся результатом объединения в одном приборе хроматографа и масс-спектрометра.

**Дифракционные методы**

Рентгенография основана на явлении дифракции рентгеновских лучей, имеющих длины волн, соизмеримые с межатомными расстояниями в иссле­дуемом соединении. Рентгенография (рентгеноструктурный анализ) использу­ется для исследования пространственно­го расположения атомов в соединениях, находящихся в кристаллическом состоя­нии.

При облучении монокристалла рент­геновскими лучами происходит их рассе­ивание (отражение) электронами атомов. Отклоненные (дифракционные) лучи ре­гистрируются на фотопленке в виде со­вокупности пятен с различной степенью почернения, характеризующей интенсив­ность лучей. Так возникает рентгенограм­ма. На основании измерений интенсив­ности пятен и расстояний между ними строят карты электронной плотности мо­лекулы, в которых точки с одинаковой электронной плотностью соединены не­прерывной линией. На основе карт элек­тронной плотности рассчитывают межатомные расстояния, валентные углы и строят пространственную модель молекулы. Методом рентгеноструктурного анализа была доказана равноценность двух атомов кислорода и их связей в карбоксилат-ионе.

С помощью этого метода была установлена α-спиральная структура двух глобулярных белков - миоглобина и гемоглобина (Дж. Кендрью, М. Перутц), витамина B12 и инсулина (Д. Ходжкин), двойная спираль ДНК (Ф. Крик, Дж. Уотсон, М. Уилкинс), структура фермента лизоцима и т. д.

Электронография основана на явлении дифракции электронов на ядрах атомов. Метод применяется для изучения структуры различных веществ в га­зообразном состоянии. Дифракционная картина взаимодействия быстрых электронов с веществом фиксируется на фотопластинке в виде электроно­граммы. Она состоит из центрального пятна, образованного неотклонивши­мися электронами, и колец различной интенсивности, являющихся результа­том действия рассеянных электронов. Характер колец и их интенсивность обусловлены строением исследуемого соединения. Расшифровка электроно­грамм путем использования определенных математических соотношений дает возможность установить геометрическую форму, расположение атомов, межъядерные расстояния и валентные углы несложных молекул. В случае сложных соединений применение электронографии затруднено.

Каждый из рассмотренных выше физических методов имеет свою область применения. Для получения исчерпывающей информации соединение необ­ходимо изучать комплексно, различными методами и творчески интерпрети­ровать результаты.

Высокоразрешающие физические методы позволили достичь больших ус­пехов в расшифровке строения сложных природных соединений - витами­нов, гормонов, биополимеров. Эти методы широко используются в биомеди­цинских исследованиях.

**Анализ органических и неорганических соединений.**

Выделенное и очищенное соединение идентифицируют путем сравнения его физических констант с аналогичными константами известных веществ. К таким константам относятся температуры плавления и кипения, плотность, показатель преломления, удельное вращение, хроматографические и спект­ральные характеристики. Одновременно они служат и для оценки степени чистоты соединения.

Для соединений, которые не удалось идентифицировать по физическим константам, определяют молекулярную формулу, показывающую количество различных атомов в молекуле. Для этого сначала проводят качественный и ко­личественный анализ. С помощью качественных реакций устанавливают, ка­кие элементы входят в состав анализируемого соединения. Затем по разрабо­танным методикам определяют содержание элементов.

На основании данных количественного анализа рассчитывается эмпири­ческая формула, которая показывает лишь соотношение атомов в молекуле. Для установления истинной молекулярной формулы необходимо кроме этого знать молекулярную массу соединения, которую определяют крuоскопuческu (по понижению температуры замерзания), эбулuоскопuческu (по повышению температуры кипения), осмометрuческu (по изменению осмотического давле­ния) или каким-либо другим методом. Современным экспресс-методом опре­деления молекулярной массы является масс-спектрометрия.

Для установления строения органических соединений используют неко­торые химические методы. Например, с помощью качественных реакций об­наруживают функциональные группы и выясняют строение углеродного ске­лета. Так, двойную связь обнаруживают по реакциям обесцвечивания бром­ной воды и раствора перманганата калия.

Присутствие в молекуле фенольной или енольной гидроксильной группы подтверждается цветной реакцией с раствором хлорида железа(III). Отличительной особенностью альдегидной группы служит способность восстанавливать аммиачный раствор гидроксида серебра (реактив Толленса) и щелочной раствор тартратного комплекса меди(II) (реактив Фелинга).

Наличие в соединении функциональных групп определяют также путем получения производных, которые легче идентифицируются при сравнении их с известными соединениями. Например, для характеристики альдегидов и ке­тонов используют образование 2,4-динитрофенилгидразонов.

В основе определения строения углеродного скелета соединения лежит расщепление углерод-углеродных связей с образованием в качестве осколков более легко идентифицируемых соединений. Чаще всего расщепление про во­дят путем окисления перманганатом, трикислородом (озоном), хромовой, азотной, иодной кислотами, водородпероксидом. Однако использование хи­мических методов связано с большой затратой времени и вещества.