**Лабораторна робота № 4. Способи отримання L-амінокислот**

**Мета:** Засвоїти методи отримання амінокислот шляхом тонкого органічного синтезу та біотехнології, закріпити навички розділення суміші амінокислот та їх ідентифікації.

*Контрольні запитання:*

1. Розглянути та охарактеризувати сучасні способи отримання амінокислот.
2. Розібрати можливі варіанти отримання L-амінокислот на окремому прикладі.
3. Практичне використання амінокислот.

*Завдання 1.* Проаналізувати та засвоїти методи хімічного та мікробного синтезу амінокислот, можливості використання білкових гідролізатів та хіміко-мікробіологічного методу на прикладі (синтез метіоніну, триптофану, треоніну, цистеїну, серину, лізину, аспарагінової та глутамінової кислоти та ін.).

*Завдання 2.**Якісні реакції виявлення амінокислот*

1. Проаналізувати приклади виявлення окремих амінокислот, наведених в таблиці, за кольоровими реакціями, що основані на хімічній природі радикалів.



1. *Провести якісні реакції виявлення амінокислот у розчинах.*
* *Ксантопротеїнова реакція.*

В ароматичних амінокислотах, які містять бензольні кільця (тирозин, триптофан, фенілаланін) під дією азотної кислоти здійснюється реакція нітрування бензольного кільця з утворенням забарвленої у жовтий колір нітросполуки. Наприклад, реакція нітрування тирозину:



У реакції гідроксиду натрію з хіноїдною формою динітротирозину утворюється натрієва сіль динітротирозину, яка має оранжеве забарвлення:



*Матеріали та реактиви.* Водний 0,01%-й розчин тирозину,

концентрована азотна кислота, 10%-й розчин гідроксиду натрію.

*Обладнання.* Скляні палички, пробірки, штатив для градуйованих пробірок, піпетки, пальник.

*Хід роботи.* В пробірку вносять 3 мл розчину тирозину та 1 мл концентрованої азотної кислоти. Суміш обережно нагрівають до появи жовтого забарвлення. Після охолодження в пробіркудодають розчин гідроксиду' натрію до появи оранжевого забарвлення.

* *Реакція Фоля на сірковмісні амінокислоти.*

При тривалому нагріванні рідина, що містить сірковмісні амінокислоти (цистеїн, цистин, метіонін) і білки, в яких присутні ці амінокислоти, набуває бурого кольору, і випадає чорний осад сірчистого свинцю. Реакція проходить у дві стадії: перша стадія – перехід сірки із органічної сполуки в неорганічну; друга стадія – якісне виявлення сірки в розчині. Під час кип’ятіння цистеїну та цистину в лужному середовищі від них легко відщеплюється сірка у вигляді сірководню, який в лужному середовищі утворює сульфід натрію.

Сульфід натрію можна виявити за допомогою важких металів, наприклад, іонів свинцю, які утворюють з іонами сірки нерозчинний сульфід свинцю чорного кольору. Для цього можна використати ацетат свинцю. Рівняння реакції за участю цистеїну має такий вигляд:



*Матеріали та реактиви.* Водний 0,01%-й розчин цистеїну, реактив Фоля (до 10%-го розчину ацетату свинцю додають 10%-й розчин гідроксиду натрію до розчинення осаду, що утворився), концентрований розчин гідроксиду натрію.

*Обладнання.* Скляні палички, штатив із пробірками градуйованими, піпетки, водяна баня, годинник.

*Хід роботи.* В пробірку вносять 1 мл розчину цистеїну, 2 мл конц. розчину гідроксиду натрію та 1 мл реактиву Фоля. Суміш перемішують і кип’ятять на водяній бані 2 хв. Через 3—5 хв випадає бурий чи чорний осад сульфіду свинцю.

* *Реакція з азотистою кислотою*

Продуктом взаємодії α-амінокислоти з азотистою кислотою, яка утворюється в реакції нітриту натрію з оцтовою кислотою, є газоподібний азот. Рівняння реакції за участю гліцину має такий вигляд:



*Матеріали та реактиви.* Водний 1%-й розчин гліцину, 5%-й розчин нітриту натрію, концентрована оцтова кислота.

*Обладнання.* Пробірки, крапельниці, штатив для пробірок.

*Хід роботи.* В пробірку вносять п’ять крапель розчину гліцину, п’ять крапель нітриту натрію, дві краплі концентрованої оцтової кислоти й обережно збовтують. Спостерігають виділення газу.

* *Утворення комплексної солі міді*

Під час нагрівання амінокислоти з карбонатом міді (II) утворюється комплексна сполука міді, яка має синє забарвлення. За участю гліцину рівняння реакції має такий вигляд:



*Матеріали та реактиви.* Водний 1%-й розчин гліцину, сухий карбонат міді.

*Обладнання.* Пробірки, штатив для пробірок, тримач пробірок, пальник.

*Хід роботи.* В пробірку вносять 1 мл розчину гліцину, а на кінчику лопатки – сухий карбонат міді (II). Суміш нагрівають у полум’ї пальника до кипіння. Розчин забарвлюється в синій колір.

* *Реакція Адамкевича на триптофан*

Триптофан у кислому середовищі вступає в реакцію з гліоксиловою кислотою (альдегідами), утворюючи забарвлені в червоно-фіолетовий колір продукти конденсації:



*Матеріали та реактиви.* Водний 0,01%-й розчин триптофану, льодяна оцтова кислота, концентрована сірчана кислота*.*

*Обладнання.* Пробірки градуйовані, піпетки, штатив для пробірок, водяна баня, годинник.

*Хід роботи.* До 0,5 мл розчину триптофану додають 0,5 мл льодяної оцтової кислоти, яка завжди містить невелику кількість гліоксилової кислоти. Отриману суміш спочатку нагрівають, а потім охолоджують і по стінці пробірки обережно, по краплинам, щоб рідини не змішувалися, додають 1 мл концентрованої сірчаної кислоти. Через 10 хв на межі розподілу двох шарів утворюється червоно-фіолетове кільце. Реакцію можна прискорити, якщо поставити пробірку з реагуючою сумішшю в киплячу водяну баню.

* *Реакція Вуазене на триптофан*

Триптофан, конденсуючись із формальдегідом, утворює забарвлений продукт конденсації біс-2-триптофанілметан, який окиснюється до біс-2-триптофанілкарбіноду:



За наявності мінеральних кислот біс-2-триптофанілкарбінол утворює солі, забарвлені у синьо-фіолетовий колір.

*Матеріали та реактиви.* Водний 0,01%-й розчин триптофану, водний 2,5%-й розчин формальдегіду, концентрована сірчана кислота, 0,5%-й розчин нітрату натрію.

*Обладнання.* Скляні палички, пробірки градуйовані, піпетки,

крапельниці, штатив для пробірок, годинник, ванночка з льодом.

*Хід роботи.* До 2 мл розчину триптофану додають одну краплю розчину формальдегіду, суміш перемішують і вливають порціями по декілька крапель 6 мл концентрованої сірчаної кислоти, охолоджуючи пробірку у ванночці з льодом. Суміш знову перемішують і дають відстоятися 10 хв. Потім, перемішуючи суміш, у пробірку вносять десять крапель розчину нітрату натрію; з’являється інтенсивне синьо-фіолетове забарвлення.

*Завдання 3.**Розділення амінокислот за допомогою розподільної хроматографії на папері*

*Обладнання та реактви:* прилад для виконання висхідних хроматограм, хроматографічний папір, набір амінокислот, суміш амінокислот, олівець, лінійка, скляні капіляри, суміші розчинників: а) н-бутанол-оцтова кислота-вода (4:1:5); б) ацетон-вода (3:2); в) н-бутанол-бензиловий спирт (1:1), розчин нінгідрину в ацетоні.

*Хід роботи:*

1. Одержати контрольну задачу – розчин суміші невідомих амінокислот та аркуш хроматографічного паперу, відрізати за розміром циліндра і розкреслити, як вказано на рис. 1.
2. За допомогою лінійки провести на відстані 2 см від нижнього краю горизонтальну лінію старту. Намалювати кільця діаметром 3 мм на відстані 2 см одне від одного та проставити над ними порядкові номери. Від лінії старту на відстані 10 см провести лінію фінішу.
3. Нанести розчини амінокислот на папір. Папір покласти на попередньо ретельно вимите скло, щоб частина де намальовані кільця, знаходилася в повітрі. Капілярами, для кожного розчину, на папір в кільця послідовно нанести краплі розчинів сумішей, що досліджуються, та “свідків”. Розчин на кожне кільце нанести 5-6 разів після висихання попередньої краплі.



1. Після висихання нанесених крапель ретельно вимити руки з милом, згорнути папір у циліндр та зшити аркуш через край так, щоб одержати більш чи менш правильний циліндр. На дно скляного циліндра налити суміш н-бутанолу, оцтової кислоти, води (4:1:5). Висота шару розчинника не повинна бути вища, ніж 1 см від дна циліндра.
2. Паперовий циліндр обережно вставити вертикально в скляний циліндр так, щоб він не торкався стінок і щоб нанесені краплі знаходились на нижньому кінці паперового циліндра.
3. Скляний циліндр щільно закрити кришкою з гумовою прокладкою і залишити стояти до тих пір, доки розчинник підніметься до лінії фінішу. Після цього вийняти паперовий циліндр, розрізати шов, розправити папір та висушити його під тягою чи в сушильній шафі (70-80оС).
4. Проявити хроматограму: проявник для α-амінокислот використовувати розчин нінгідрину (ω(нінгідрину)=0,5%) в ацетоні. Цим розчином обприснути хроматограму декілька разів з пульверизатора так, щоб папір став тільки слабо вологим та на ньому не утворювались би розмиті струмені розчину. Потім висушити папір на повітрі та прогріти в сушильній шафі при 110оС до появи лілових плям. Значно краще висушити хроматограму поступово в темряві. Плями, що проявилися, легко обвести олівцем та при бажанні закріпити розчином нікелю сульфату, після чого ще раз просушити хроматограму на повітрі.
5. Якісний склад контрольної суміші амінокислот визначити за значенням Rf кожної плями, порівнюючи з Rf, що обчислені за хроматограмою для “свідків”. Значення Rf амінокислот цієї системі: гліцин 0,13; аланін 0,18; валін 0,36; фенілаланін 0,46.

Оформити висновок.