***Лабораторна робота № 3***

***Тема:* Якісні реакції на амінокислоти та білки**

***Мета і завдання роботи:***

* сформувати вміння хімічного виявлення деяких вільних амінокислот і їх залишків у складі білків, виявлення пептидного зв’язку в білках і пептидах.

***Знання і вміння, які повинні отримати студенти:***

* знання про механізм біуретової, нінгідринової, ксантопротеїнової реакцій, реакції Адамкевича, реакції Паулі, нітропруссидної реакцій.
* вміння використовувати ці кольорові реакції на амінокислоти та білки, складати рівняння відповідних реакцій.

**Характеристика реакцій та хід роботи**

***1. Біуретова реакція*** становить процес виникнення мідного комплексу, забарвленого в рожево фіолетовий колір, при взаємодії пептидів і білків з купрум гідроксидом у лужному середовищі. Ця реакція не є специфічної, бо подібний комплекс утворює не тільки пептиди і білки, а й біурет, який теж має зв'язок.

Саме тому реакція отримала назву біуретової. Правильно було б сказати, що ця реакція утворення пептидами і білками мідного комплексу – такого ж, як і з біуретом.

*Хід роботи.* До 1-2 см3 розведеного розчину білка додають подвійний об’єм розчину натрій гідроксиду (ω = 30%), добре перемішують і вносять за допомогою скляної палички декілька крапель розчину купрум сульфату (ω = 1%). Знову ретельно перемішують. З’являється рожево-фіолетове забарвлення. Якщо було внесено велику кількість розчину купрум сульфату, то надлишок купрум гідроксиду, що при цьому утворився, маскуватиме рожево-фіолетове забарвлення мідного комплексу білка, весь розчин набуде синього кольору.

***2. Нінгідринова реакція*** – це реакція ароматичного трикетону нінгідрину з речовинами, що мають вільні аміногрупи. Амінокислоти, пептиди і білки мають такі вільні аміногрупи і при взаємодії з нінгідрином утворюють барвник Руемана синьо-фіолетового кольору. Як і біуретова, нінгідринова реакція не є специфічною на амінокислоти, пептиди і білки. Будь-які речовини, що містять вільну аміногрупу, і навіть амоніак, дають позитивну реакцію. У нуклеїнових кислот теж така реакція. Тому говорять про нінгідринпозитивні речовини.

Взаємодія нінгідрину з амінокислотою:

*Хід роботи.* До 2-3 см3 розведеного розчину білка додають розчин нінгідрину (ω = 1%) в ацетоні (ω = 95%). Перемішують і нагрівають на киплячій водяній бані при 70°С 15-20 хвилин. Розвивається синьо-фіолетове забарвлення.

***3. Ксантопротеїнова реакція*** – це реакція нітрування ароматичних амінокислот у складі пептидів і білків, у результаті якої утворюються нітропохідні жовтого кольору. Реакція не специфічна, бо нітропохідні вільних ароматичних вуглеводнів теж мають таке забарвлення.

*Хід роботи*. До 1-2 см3 розчину білка додають 5-6 крапель концентрованої нітратної кислоти до появи білого осаду або помутніння, нагрівають на киплячій водяній бані. При цьому осад і розчин забарвлюють у жовтий колір, осад потім майже повністю розчиняється.

Охолоджують суміш і, не перемішуючи, додають краплинами до кислого розчину надлишок концентрованого розчину амоніаку або лугу до лужної реакції середовища. Вміст забарвлюється в яскраво-оранжевий колір, що обумовлено виникненням у лужному середовищі хромофорної групи.

***4. Реакція Адамкевича*** – це реакція на амінокислоту триптофан з гліоксалевою кислотою, у результаті якої відбувається конденсація двох залишків триптофану з утворенням сполуки, що має довгий ланцюг спряжених подвійних зв’язків, який зумовлює виникнення червоно-фіолетового забарвлення.

Гліоксалева кислота за участі концентрованої сульфатної кислоти декарболізуються:

Утворений формальдегід вступає в реакцію конденсації з двома залишками триптофану у складі білка:

*Хід роботи*. У пробірку вносять приблизно 0,5 см3 нерозведеного білка, додають 2 см3 льодяної оцтової кислоти, до якої внесено трохи гліоксалевої кислоти. Суміш нагрівають до розчинення осаду, який утворився. Охолоджують пробірку із сумішшю, а потім, нахиливши її, обережно по стінці приливають до 1 см3 концентрованої сульфатної кислоти так, щоб рідини не змішалися, а утворили два шари. На межі двох рідин з’являється червоно-фіолетове кільце.

***5. Реакція Паулі*** – це реакція азосполучення *п*-сульфофенілдіазонійхлориду з ароматичними амінокислотами – як вільними, так і в складі пептидів і білків. Спочатку проводять на холоді діазотування сульфанілової кислоти, а потім реакцію азосполучення з ароматичними амінокислотами у складі білків. З’являється оранжево-червоне забарвлення в результаті утворення азобарвника.

*Хід роботи.* До 1 см3 розчину сульфанілової кислоти (ω = 1%) в розчині хлоридної кислоти (ω = 5%) додають 2 см3 розчину натрій нітрату (ІІІ, ω = 0,5%), ретельно перемішують і додають спочатку 2 см3 розведеного розчину білка, а потім (після перемішування вмісту пробірки) 6 см3 розчину натрій карбонату (ω = 10%), знову перемішують. З’являється вишнево-червоне забарвлення.

***Нітропруссидна реакція*** – це реакція на амінокислоту цистеїн, що містить сульфгідрильну групу –SH. При взаємодії натрій нітропруссиду зі сполуками, що містять –SH-групу або S2-, з’являється пурпурове забарвлення. Ця реакція на білки теж неспецифічна.

*Хід роботи.* У пробірку вносять 1-2 см3 розведеного білка, додають рівний об’єм насиченого розчину амоній сульфату і 2-3 краплини розчину натрій нітропруссиду (ω = 5%). Потім вносять декілька крапель концентрованого розчину амоніаку.

Якщо в білку є цистеїн, то відбувається реакція, у результаті якої з’являється пурпурове забарвлення.

Загалом слід зазначити, що специфічних реакцій на білки немає, у тому для ідентифікації білків застосовується декілька реакцій.