



Лабораторна робота №1 ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА АМІНОКИСЛОТИ ТА БІЛКИ

Мета роботи: провести якісні реакції на амінокислоти та білки; засвоїти механізм цих реакцій.

Практичне значення роботи. Якісні реакції на амінокислоти та білки широко використовуються для встановлення білкової природи речовини, вивчення амінокислотного складу різноманітних природних білків, пептидів, для ідентифікації індивідуальних амінокислот, для виявлення амінокислот у гідролізатах білків, у біорідинах, тканинах організму, в лікарських засобах.

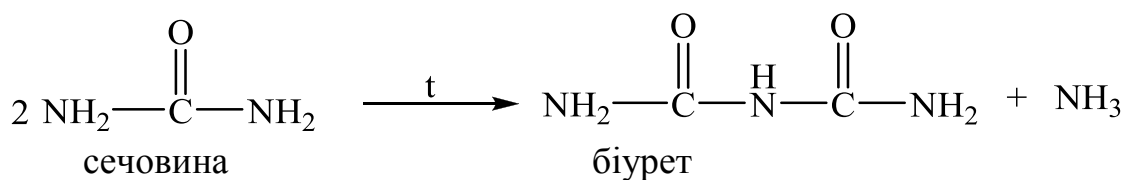
Матеріали та реактиви: штатив для пробірок, пробірки, пробіркотримач, скляні палички, піпетки, сухе пальне, сірники; дистильована вода, 1%-й розчин яєчного білка або концентрований розчин яєчного білка, 10%-й розчин натрій гідроксиду, 1%-й розчин купрум сульфату, розчин нінгідрину, концентрована нітратна кислота, волосся або шматочок нігтя, розчин плюмбум ацетату, розчин натрій нітриту, концентрована оцтова кислота.

Хід роботи

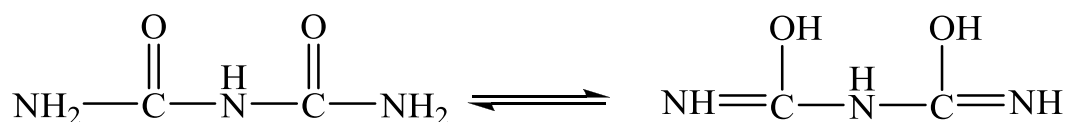
Дослід 1. Біуретова реакція (реакція Піотровського)

Принцип реакції. Біуретова реакція доводить наявність у молекулах білків пептидних зв'язків (-CO-NH-). Сполуки, які мають у своєму складі не менше двох пептидних зв'язків (білки, пептиди), у лужному середовищі утворюють із купрум сульфатом комплекс *фіолетового кольору*. Біуретова реакція доводить наявність пептидних зв'язків у білках і поліпептидах.

Біуретову реакцію вперше було досліджено Данілевським О.Я. Реакція отримала назву від похідного сечовини – біурету. Він утворюється при взаємодії 2-х молекул сечовини внаслідок відщеплення амоніаку, при температурі 180 °С.

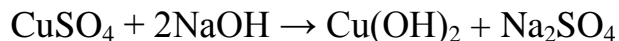


У лужному середовищі біурет зазнає енолізації:

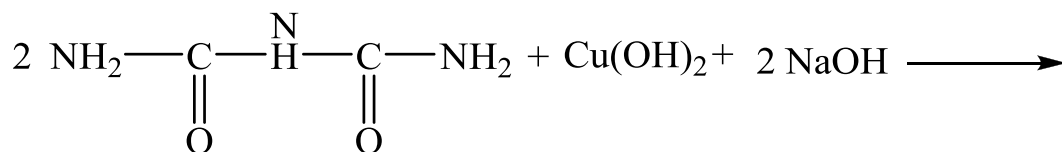


Дві молекули енольної форми біурету взаємодіють з купрум (II) гідроксидом та утворюють комплекс, у якому координаційні зв'язки утворені за рахунок електронних пар атомів Нітрогену імінних груп.

Купрум (II) гідроксид для проведення біуретової реакції отримують, як правило, в результаті взаємодії купрум (II) сульфату з натрій гідроксидом:



Утворення комплексу біурету з купрум (II) гідроксидом відбувається за схемою:



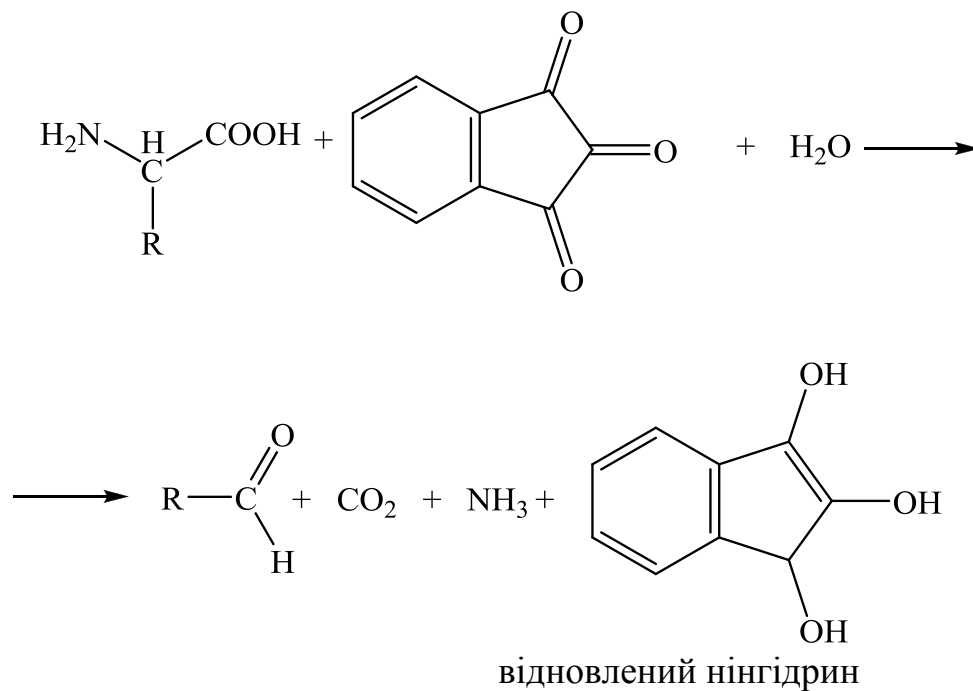
Хід роботи. До 5 крапель 1%-го розчину яєчного білка (або концентрованого яєчного білка) додають 5 крапель 10%-го розчину натрій гідроксиду, 2 краплі 1%-го розчину купрум (II) сульфату та все перемішують. Вміст пробірки набуває *фіолетового забарвлення*.

Примітка. Не можна додавати надлишок купрум (II) сульфату, оскільки маскується характерне *фіолетове забарвлення* біуретового комплексу білка.

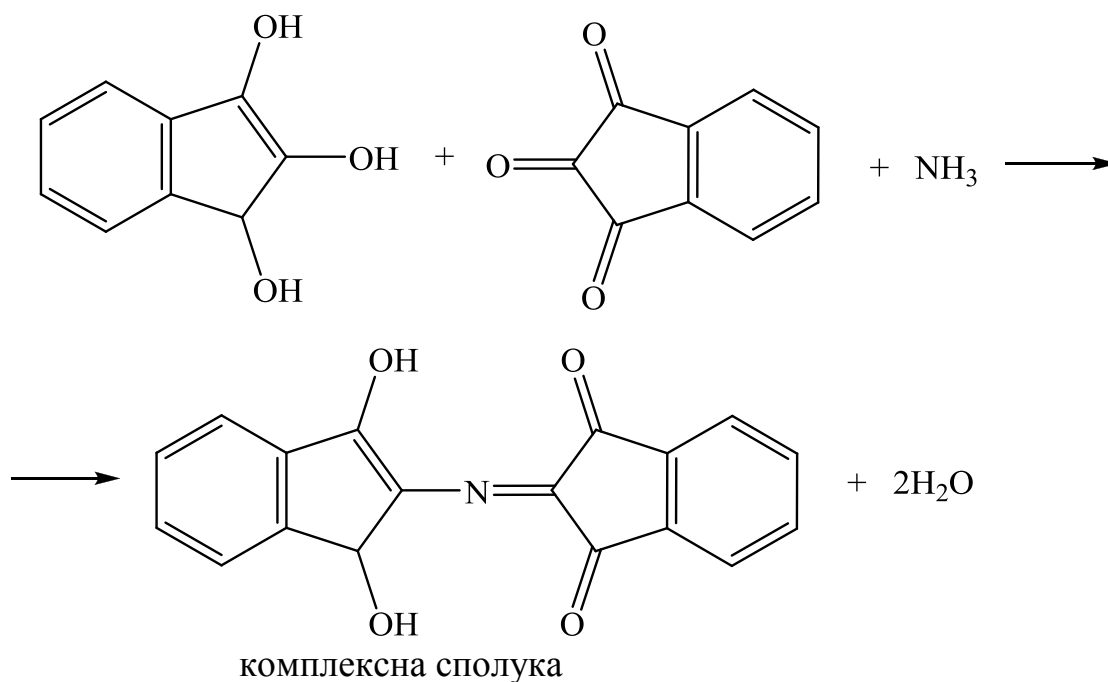
Дослід 2. Нінгідринова реакція

Принцип реакції. Білки, поліпептиди, вільні амінокислоти при нагріванні з нінгідрином дають *рожево-фіолетове забарвлення*. Реакція характерна для $\alpha\text{-NH}_2$ -групи, використовується для виявлення α -амінокислот.

Реакція ґрунтується на окисно-відновних властивостях нінгідрину. Внаслідок нагрівання до 70°C та окиснювального дезамінування та декарбоксілювання від амінокислоти відщеплюється аміногрупа з утворенням амоніаку, виділяється карбон (IV) оксид та утворюється альдегід. Нінгідрин за цих умов відновлюється.



Відновлений нінгідрин конденсується з амоніаком та окисненою формою нінгідрину й утворює комплексну сполуку *рожево-фіолетового кольору*:



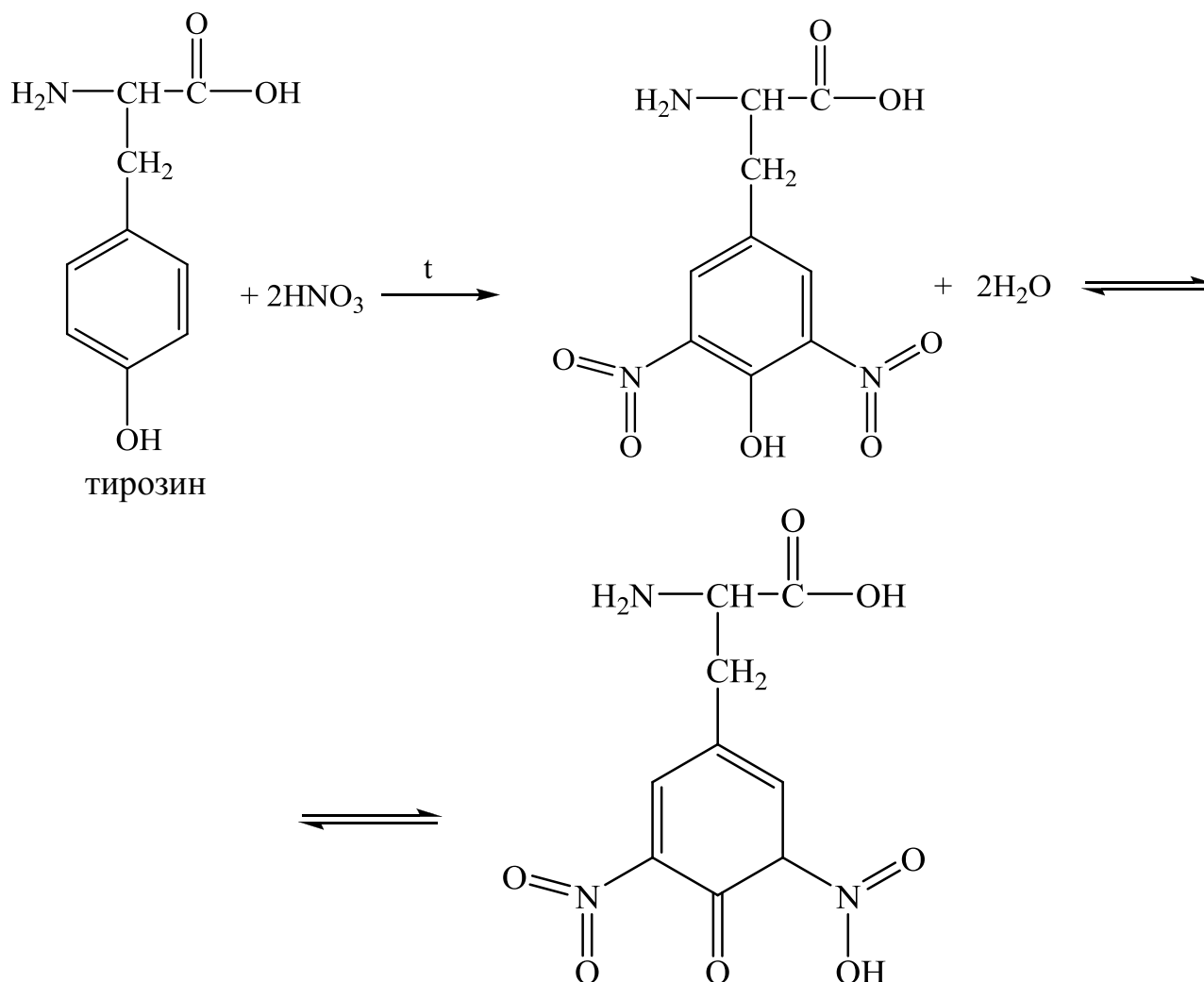
Ця реакція не є специфічною лише для амінокислот, оскільки її дають деякі аміни та амід.

Обережно!!! Нінгідрин токсичний, тому слід уникати його потрапляння на шкіру та слизові оболонки.

Хід роботи. До 3-4 крапель 1%-го розчину яєчного білка або концентрованого яєчного білка додають 1-2 краплі розчину нінгідрину та нагрівають пробірку. У ній з'являється *рожево-фіолетове забарвлення*.

Дослід 3. Ксантопротеїнова реакція (реакція Мульдера)

Принцип реакції. Реакція характерна для бензенового ядра ароматичних амінокислот (фенілаланіну, тирозину, триптофану). Ароматичне кільце амінокислот нітрується при дії концентрованої нітратної кислоти з утворенням нітросполук, забарвлених у *жовтий колір*:

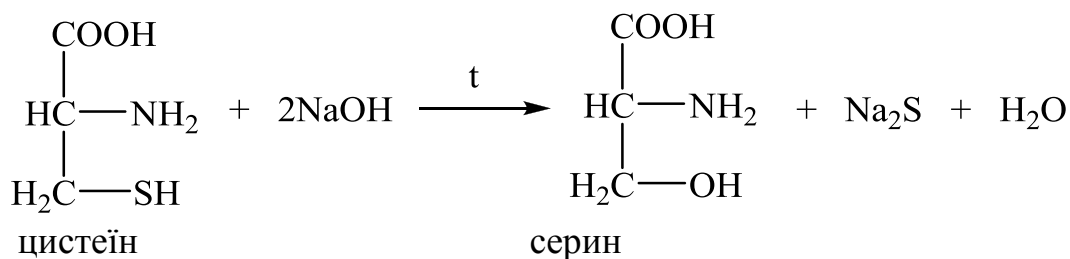


При додаванні амоніаку забарвлення переходить в *оранжове*.

Хід роботи. У пробірку до 3-4 крапель 1%-го розчину яєчного білка або концентрованого яєчного білка додають 1-2 краплі концентрованої нітратної кислоти. Пробірку обережно нагрівають, спостерігають за зміною забарвлення. Утворюється нітросполука *жовтого кольору*.

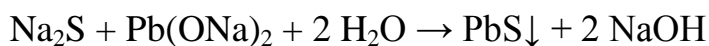
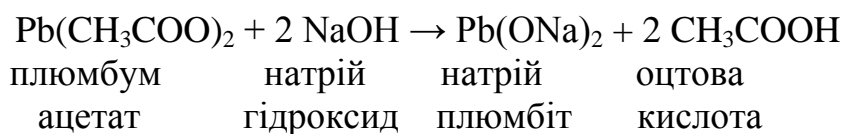
Дослід 4. Реакція Фоля

Принцип реакції. Реакція відкриває сульфуровмісні амінокислоти (цистин, цистеїн). При нагріванні цистеїну (або цистину) в лужному середовищі від них легко відщеплюється Сульфур у вигляді гідрогенсульфіду, який в лужному середовищі утворює натрій сульфід:



Утворення натрій сульфїду можна визначити за допомогою іонів важких металів, наприклад, іонів пльумбуму, які утворюють з іонами Сульфуру нерозчинний пльумбум сульфїд *чорного кольору*.

Для виявлення Сульфуру можна використовувати пльумбум ацетат, який при взаємодії з натрій гідроксидом утворює натрій пльумбіт. Своєю чергою натрій пльумбіт, реагуючи з натрій сульфїдом, зумовлює утворення пльумбум сульфїду:

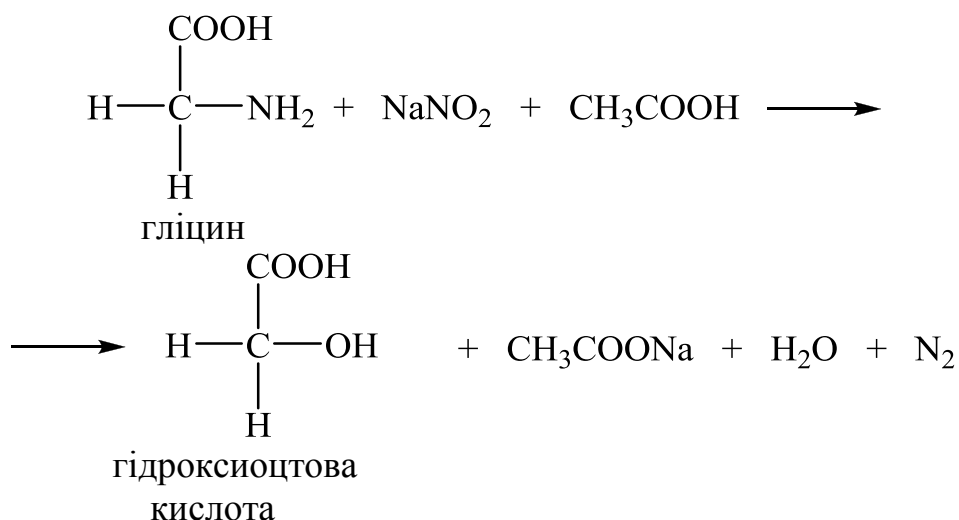


Хід роботи. В 1-у пробірку поміщають трохи волосся або шматочок нігтя, а в 2-у пробірку – 5 крапель 1%-го розчину яєчного білка або концентрованого яєчного білка. У кожену із пробірок додають по 1 краплі розчину пльумбум ацетату, а потім 1 краплю розчину гідроксиду натрію; пробірки нагрівають до кипіння. У 1-й пробірці з'являється *осад чорного кольору*, у 2-й пробірці – нічого не відбувається або ж утворюється осад білого кольору.

Дослід 5. Реакція Ван-Слайка

Принцип реакції. Реакція дозволяє визначити NH_2 -групу в амінокислотах і білках.

У результаті взаємодії амінокислоти з нітритом натрію та оцтовою кислотою відбувається утворення газоподібного азоту.



Хід роботи. У пробірку наливають 1-2 мл 1%-го розчину яєчного білка (або концентрованого яєчного білка) або амінокислоти, додають рівний об'єм (1-2 мл) розчину нітриту натрію та декілька крапель концентрованої оцтової кислоти. При цьому утворюється нітритна кислота, яка вступає в реакцію з аміногрупою. Виділяються бульбашки газу – азоту.

Результати дослідів 1-5 запишіть у таблицю 3 за аналогією:

Таблиця 3

Якісні реакції на амінокислоти й білки

№ п/п	Назва дослідів	Реактиви, які використовуються	Зміни, що відбуваються під час реакції	Висновок
1	2	3	4	5
1	Біуретова реакція	1) 5 крапель 1%-го розчину яєчного білка (або концентрованого яєчного білка); 2) 5 крапель 10%-го розчину гідроксиду натрію; 3) 2 краплі 1%-го розчину купрум (II) сульфату; все перемішують.	Фіолетове забарвлення	Реакція доводить наявність у молекулах білків, пептидів, пептидних зв'язків (-CO-NH-).

За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.