

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ белков

Качественные реакции на  
остатки аминокислот

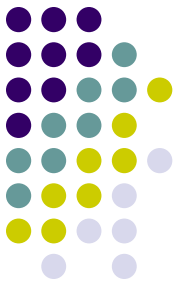




# Указатель реакций

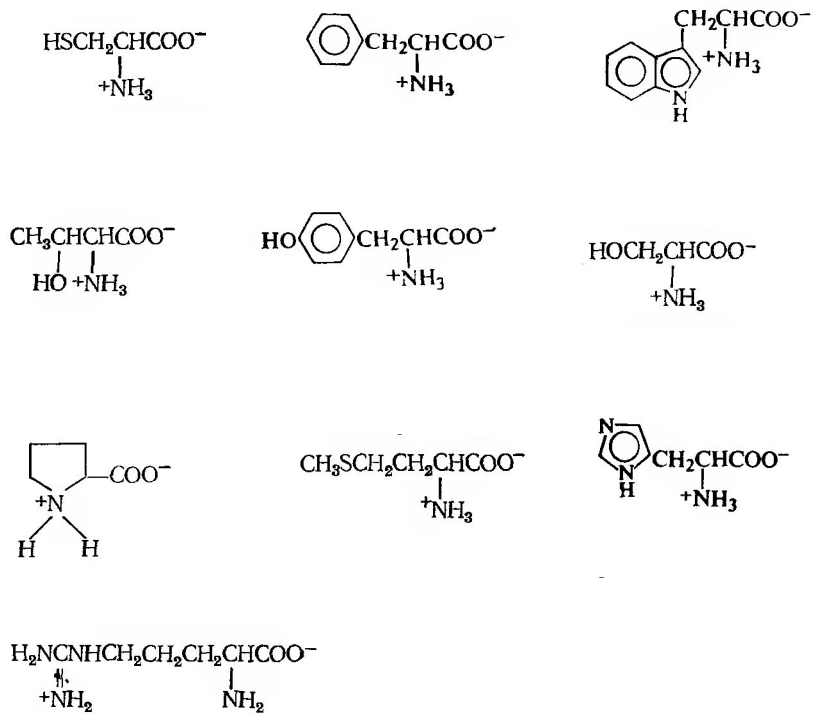
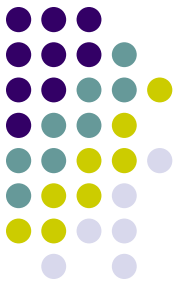
- Биуретовая
  - a) [Уравнение реакции](#)
  - b) [Проведение опыта](#)
- [Нингидриновая](#)
- Ксантопротеиновая
  - a) [Уравнение реакции](#)
  - b) [Проведение опыта](#)
- [Миллона](#)
- [Гопкинса-Коле](#)
- [Диазореакция Паули](#)

# Функция качественных реакций



- Для аминокислот, постоянно встречающихся в составе белков, разработано множество цветных (в том числе именных) реакций. Многие из них высокоспецифичны, что позволяет определять ничтожные количества той или иной аминокислоты.
- Надо помнить, что все качественные реакции – это реакции не собственно на белки, а на определенные аминокислоты, входящие в их состав.

# Аминокислоты



- Основной структурной единицей белков служат α-аминокислоты. В состав большинства природных белков входит около 20 α-аминокислот.
- Качественные реакции служат как для определения принадлежности вещества к классу белков, так и для идентификации входящих в его состав аминокислот






[Наиболее распространённые аминокислоты см. таблицу](#)

# Аминокислоты



Наиболее распространенные  $\alpha$ -аминокислоты

Название (сокращение)	R	Температура плавления, °C	Изоэлектрическая точка (pI)	pKa
1	2	3	4	5
<i>Алифатические аминокислоты</i>				
Глицин (гли)	-H	293	5,97	2,34; 9,60
Аланин (ала)	-CH <sub>3</sub>	297	6,02	2,35; 9,69
Валин (вал)	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	315	5,97	2,32; 9,62
Лейцин (лей)	-CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	337	5,98	2,36; 9,60
Изолейцин (илей)	-CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>   CH <sub>3</sub>	284	6,02	2,36; 9,68
<i>Оксиаминокислоты</i>				
Серин (сер)	-CH <sub>2</sub> OH	228	5,68	2,21; 9,15
Треонин (тре)	-CH-CH <sub>3</sub>   OH	253	6,53	2,63; 10,43
<i>Дикарбоновые аминокислоты и их амиды</i>				
Аспарагиновая кислота (асп)	-CH <sub>2</sub> COOH	270	2,97	2,09 ( $\alpha$ -COOH), 3,86 ( $\beta$ -COOH); 9,82
Аспарагин (аспи)	-CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	236	5,41	2,02; 8,80
Глутаминовая кислота (глу)	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	249	3,22	2,19 ( $\alpha$ -COOH), 4,25 ( $\gamma$ -COOH); 9,67
Глутамин (глун)	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	185	5,65	2,17; 9,13
<i>Двухосновные аминокислоты</i>				
Лизин (лиз)	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	224	9,74	2,18; 8,95 ( $\alpha$ -NH <sub>2</sub> ), 10,53 ( $\epsilon$ -NH <sub>2</sub> )
Аргинин (арг)	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHCNHNH <sub>2</sub>    NH	238	10,76	2,17; 9,04 ( $\alpha$ -NH <sub>2</sub> ), 12,48 (ион гуанидиния)

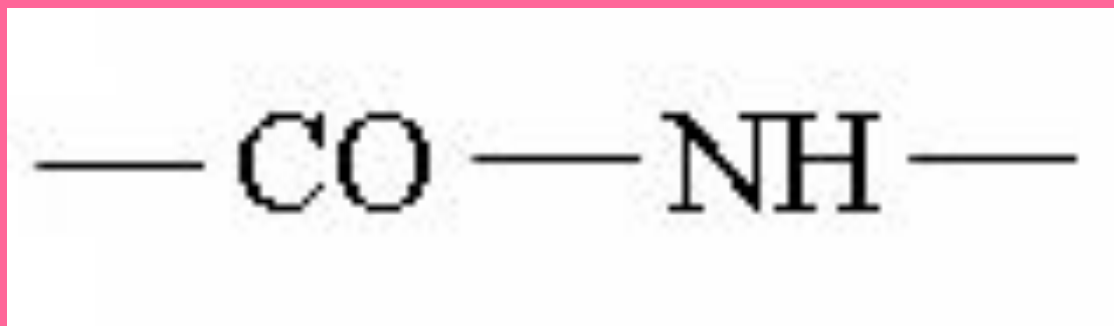
1	2	3	4	5
Гистидин (гис)	-CH <sub>2</sub> 	277	7,58	1,82; 6,0 (имидазол), 9,17
<i>Ароматические аминокислоты</i>				
Фенилаланин (фен)	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	275	5,98	1,83; 9,13
Тирозин (тир)	-CH <sub>2</sub> - 	344	5,65	2,20; 9,11 ( $\alpha$ -NH <sub>2</sub> ), 10,07 (-OH)
Триптофан (три)	-CH <sub>2</sub> - 	282	5,88	2,38; 9,39
<i>Серосодержащие аминокислоты</i>				
Цистеин (цис-SH)	-CH <sub>2</sub> SH	178 (хлоргидрат)	5,02	1,71; 8,33 (-SH), 10,78 ( $\alpha$ -NH <sub>2</sub> )
Цистин (цис-S-S-цис)	-CH <sub>2</sub> -S-S-CH <sub>2</sub> -	260	5,06	1,65; 2,26 (COOH); 7,85; 9,85 ( $\alpha$ -NH <sub>2</sub> )
Метионин (мет)	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -S-CH <sub>3</sub>	283	5,75	2,38; 9,39
<i>Иминокислоты</i>				
Пролин (про)		222	6,10	1,99; 10,60
Оксипролин (опро)	HO- 	270	5,83	1,92; 9,73

[Вернуться](#)



# Биуретовая реакция

- Определяет наличие пептидной связи в растворе исследуемого соединения.

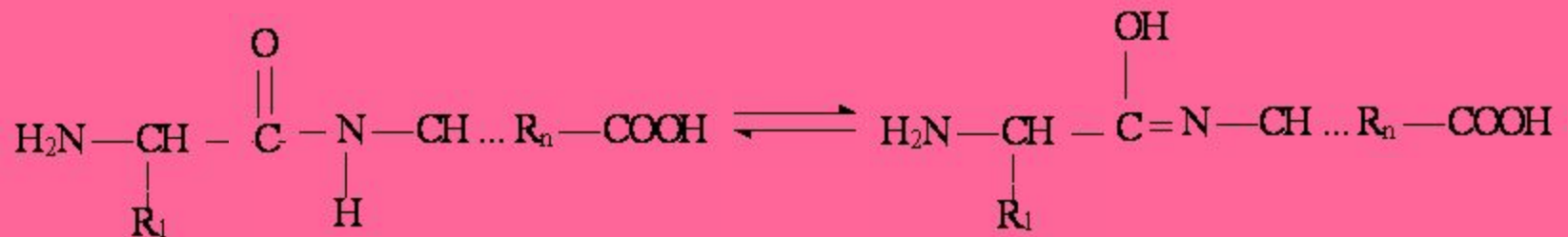


пептидная связь



# Биуретовая реакция

- Реакция обусловлена образованием биуретового комплекса в результате соединения меди с пептидной группировкой белка.
- В пептидах и белках пептидная связь обычно находится в амидной форме (или кетоформе), но в щелочной среде она переходит в иминольную (енольную):





# Биуретовая реакция

- Биуретовая реакция протекает так:



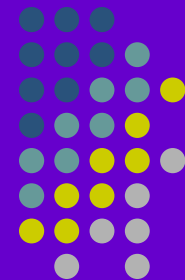
[Вернуться](#)



# Биуретовая реакция



[Вернуться](#)



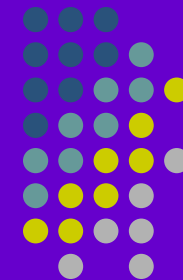
# Нингидриновая реакция

Качественная реакция на  $\alpha$ -аминокислоты

- Аминокислота с нингидрином образует продукт конденсации типа азометина



# Нингидриновая реакция



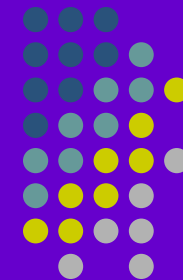
- путем перегруппировки



- и гидролиза

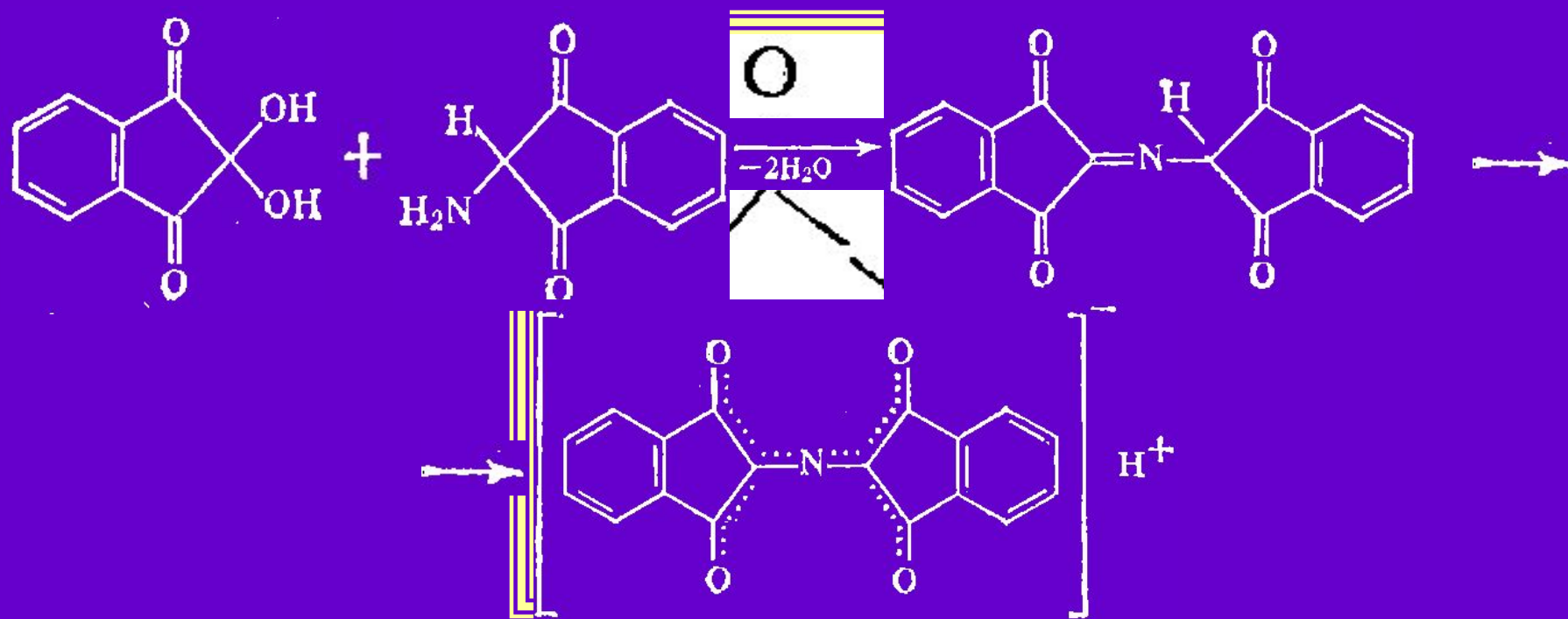


образуется 2-аминоиндандион



# Нингидриновая реакция

- 2-аминоиндандион реагирует с нингидрином и дает краситель.



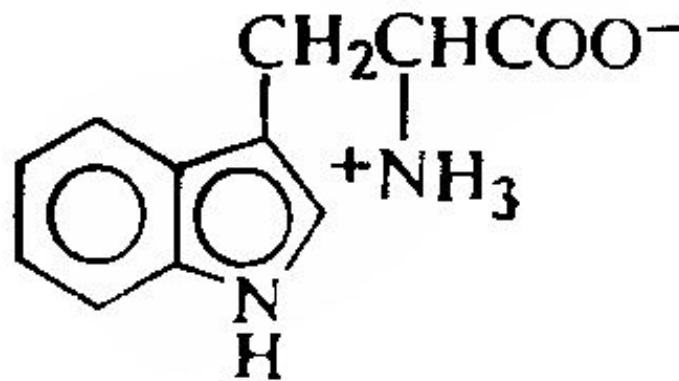
[Вернуться](#)



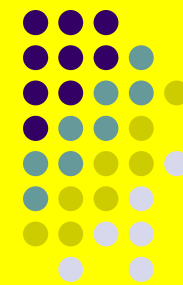
# Ксантопротеиновая реакция

Определяет присутствие в белке ароматических и гетероциклических  $\alpha$  - аминокислот :

- триптофана,
- фенилаланина,
- тирозина,
- гистидина.

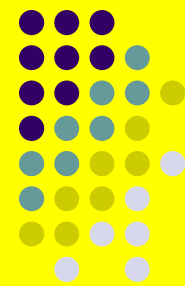


# Ксантопротеиновая реакция



[Вернуться](#)

# Ксантопротеиновая реакция

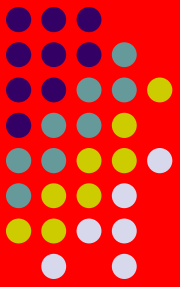


- При действии концентрированной  $\text{HNO}_3$  на раствор белка образуется нитросоединение, окрашенное в желтый цвет.

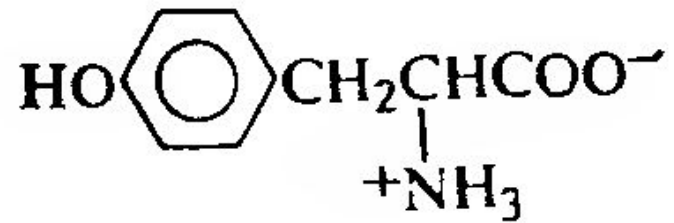


[Вернуться](#)

# Реакция Миллона



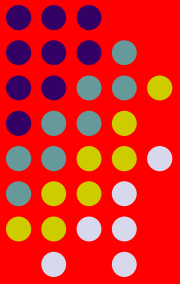
- Это реакция на аминокислоту тирозин



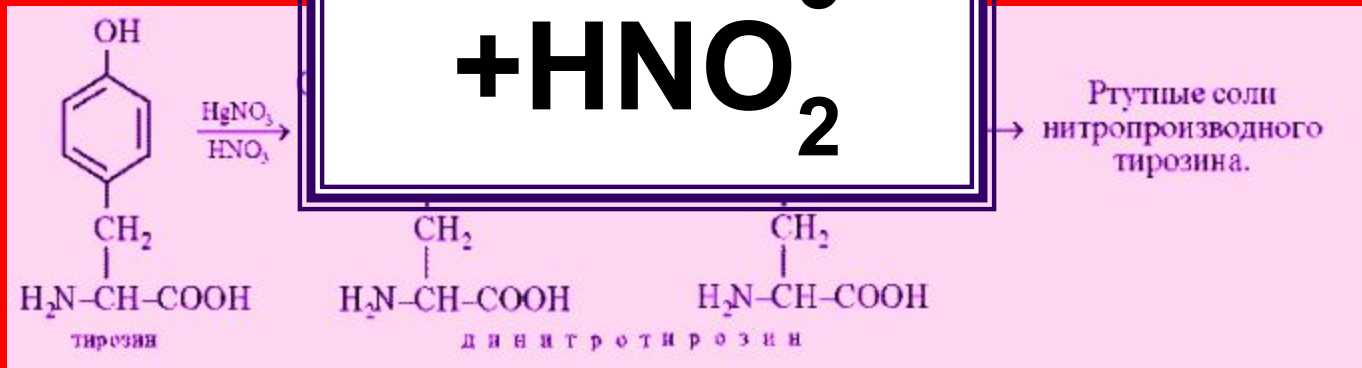
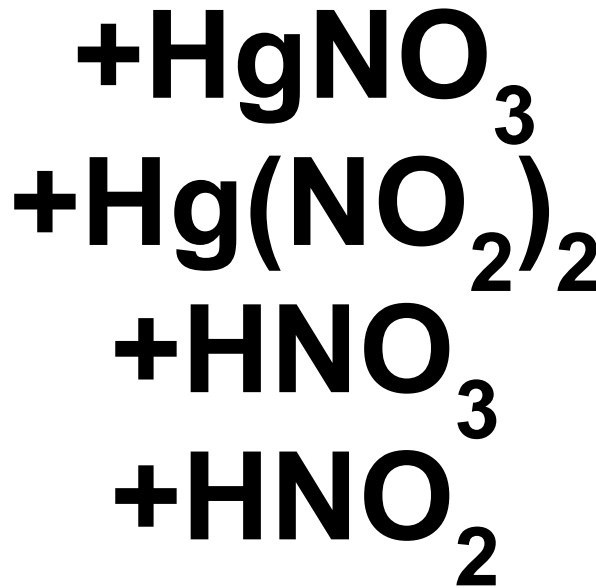




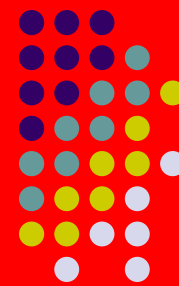
# Реакция Миллона



- Реактив Миллона (раствор  $\text{HgNO}_3$  и  $\text{Hg}(\text{NO}_2)_2$  в разбавленном  $\text{HNO}_3$  с примесью  $\text{HNO}_2$ ) взаимодействует с аминокислотами с образованием нитропроизводных, окрашенных в розовато-красный цвет.



# Рекомендации к проведению опыта



- К 2 мл концентрированного раствора тирозина прибавляют ~1 мл реактива Миллона
- встряхивают
- осторожно нагревают пробирки на пламени спиртовки.

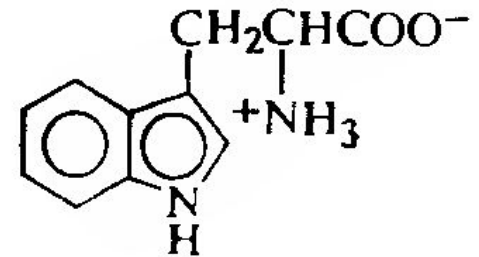
Образуется красное окрашивание.

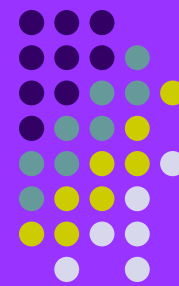


# Реакция Гопкинса–Коле



- Эта реакция определяет аминокислоту триптофан.

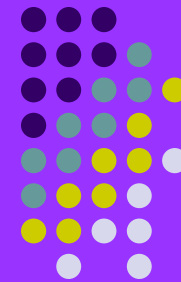




# Реакция Гопкинса–Коле

- Из глиоксиловой кислоты под действием концентрированной серной кислоты сначала получается формальдегид:



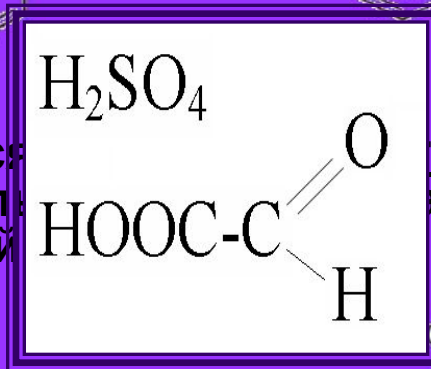


# Реакция Гопкинса–Коле

формальдегид затем конденсируется с триптофаном:



Продукт конденсации окисляется до триптофанилкарбинола, который в присутствии минеральных солей образует соли, окрашенные в сине-фиолетовый цвет.



[Вернуться](#)

# Рекомендации к проведению опыта

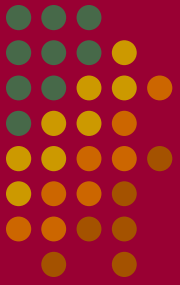


- Охладить до 0 °С насыщенного раствора щавелевой кислоты
- К 2 г порошка магния (слегка увлажненного) добавить щавелевую кислоту
- Полученный осадок оксалата магния отфильтровать и декантировать небольшим количеством воды.
- Фильтрат подкислить уксусной кислотой и довести до объема 200 мл (полученный раствор хранить в холодильнике!). Это и есть глиоксиловая кислота.
- 1 мл 0,005%-го раствора триптофана смешать с равным объемом глиоксиловой кислоты и к смеси прибавляют 10 капель раствора сульфата меди(II).
- Небольшими порциями добавляют 2–3 мл концентрированной серной кислоты, охлаждая пробирку после приливания очередной порции кислоты током холодной воды (или в ванночке со льдом).
- Полученную смесь оставляют на 10 мин при комнатной температуре, после чего ставят на 5 мин в кипящую водяную баню.

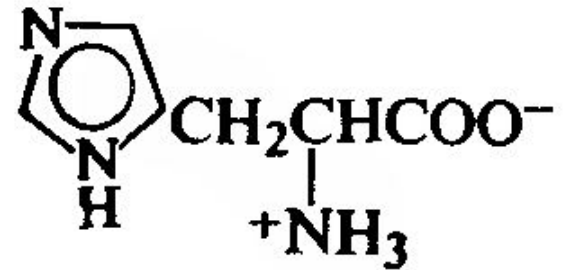
Наблюдается образование сине-фиолетового окрашивания



# Реакция Паули (Диазореакция Паули)



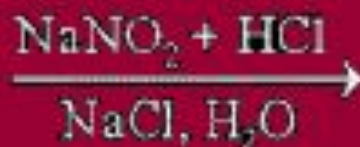
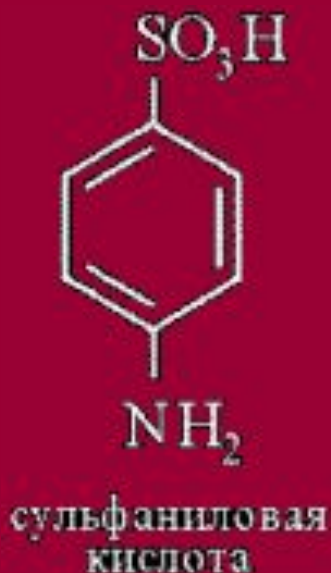
Эта реакция  
аминокислоту  
ГИСТИДИН.



# Реакция Паули (Диазореакция Паули)



- при взаимодействии кислого раствора сульфаниловой кислоты с нитритом натрия образуется диазобензолсульфоная кислота:



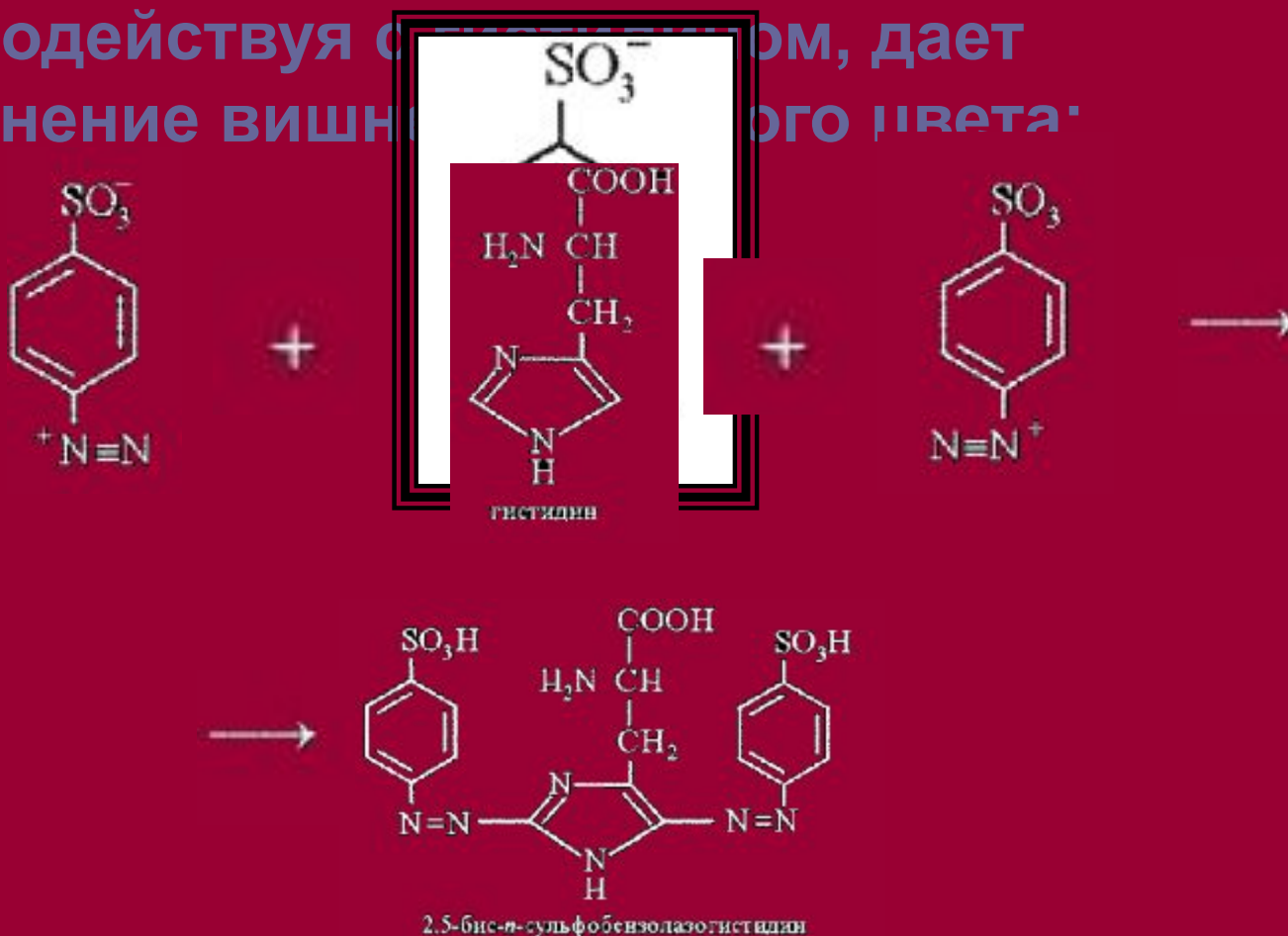




# Реакция Паули (Диазореакция Паули)



- Диазобензолсульфоновая кислота, взаимодействуя с гистидином, дает соединение вишневого цвета



[Вернуться](#)

# Рекомендации к проведению опыта



- В пробирку наливают 1 мл 1%-го раствора сульфаниловой кислоты в 5%-м растворе соляной кислоты.
  - Прибавляют 2 мл 0,5%-го раствора нитрита натрия
  - Сильно встряхивают
  - Немедленно приливают 2 мл 0,01%-го раствора гистидина
  - После перемешивания содержимого пробирки сразу приливают 6 мл 10%-го раствора соды.
- Появляется интенсивная вишнево-красная окраска.

