

ОПРЕДЕЛЕНИЕ белков

Качественные реакции на
остатки аминокислот

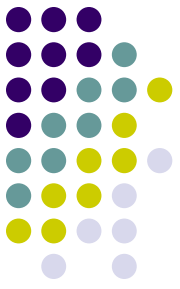




Указатель реакций

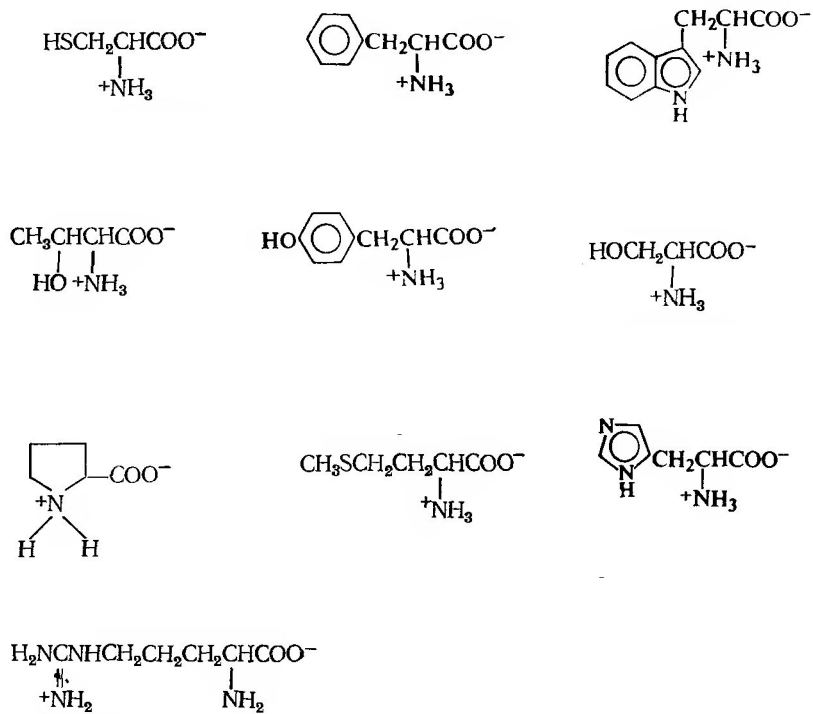
- Биуретовая
 - a) [Уравнение реакции](#)
 - b) [Проведение опыта](#)
- [Нингидриновая](#)
- Ксантопротеиновая
 - a) [Уравнение реакции](#)
 - b) [Проведение опыта](#)
- [Миллона](#)
- [Гопкинса-Коле](#)
- [Диазореакция Паули](#)

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.

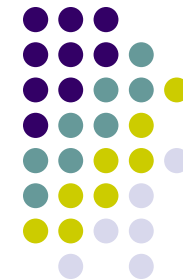
Аминокислоты



- 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 α -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 ₃	297	6,02	2,35; 9,69
Валин (вал)	-CH(CH ₃) ₂	315	5,97	2,32; 9,62
Лейцин (лей)	-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	337	5,98	2,36; 9,60
Изолейцин (илей)	-CH-CH ₂ -CH ₃ CH ₃	284	6,02	2,36; 9,68
<i>Оксиаминокислоты</i>				
Серин (сер)	-CH ₂ OH	228	5,68	2,21; 9,15
Треонин (тре)	-CH-CH ₃ OH	253	6,53	2,63; 10,43
<i>Дикарбоновые аминокислоты и их амиды</i>				
Аспарагиновая кислота (асп)	-CH ₂ COOH	270	2,97	2,09 (α -COOH), 3,86 (β -COOH); 9,82
Аспарагин (аспи)	-CH ₂ CONH ₂	236	5,41	2,02; 8,80
Глутаминовая кислота (глу)	-CH ₂ CH ₂ COOH	249	3,22	2,19 (α -COOH), 4,25 (γ -COOH); 9,67
Глутамин (глун)	-CH ₂ CH ₂ CONH ₂	185	5,65	2,17; 9,13
<i>Двухосновные аминокислоты</i>				
Лизин (лиз)	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂	224	9,74	2,18; 8,95 (α -NH ₂), 10,53 (ϵ -NH ₂)
Аргинин (арг)	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ NHCNHNH ₂ NH	238	10,76	2,17; 9,04 (α -NH ₂), 12,48 (ион гуанидиния)

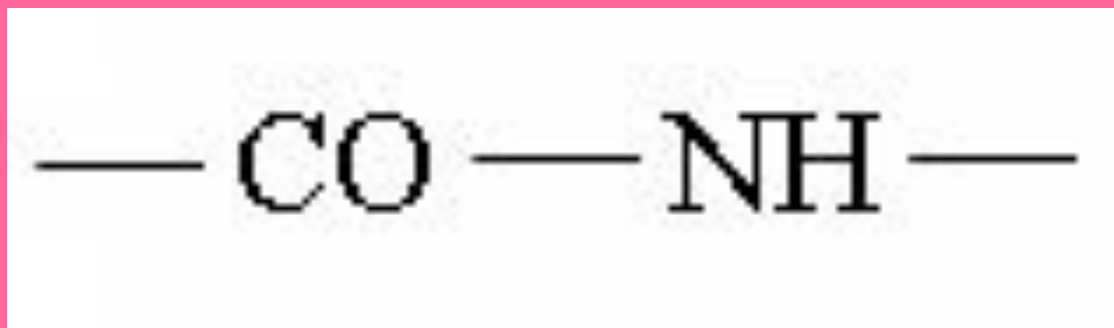
1	2	3	4	5
Гистидин (гис)	-CH ₂ 	277	7,58	1,82; 6,0 (имидазол), 9,17
<i>Ароматические аминокислоты</i>				
Фенилаланин (фен)	-CH ₂ C ₆ H ₅	275	5,98	1,83; 9,13
Тирозин (тир)	-CH ₂ - 	344	5,65	2,20; 9,11 (α -NH ₂), 10,07 (-OH)
Триптофан (три)	-CH ₂ - 	282	5,88	2,38; 9,39
<i>Серосодержащие аминокислоты</i>				
Цистеин (цис-SH)	-CH ₂ SH	178 (хлор-гидрат)	5,02	1,71; 8,33 (-SH), 10,78 (α -NH ₂)
Цистин (цис-S-S-цис)	-CH ₂ -S-S-CH ₂ -	260	5,06	1,65; 2,26 (COOH); 7,85; 9,85 (α -NH ₂)
Метионин (мет)	-CH ₂ CH ₂ -S-CH ₃	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.

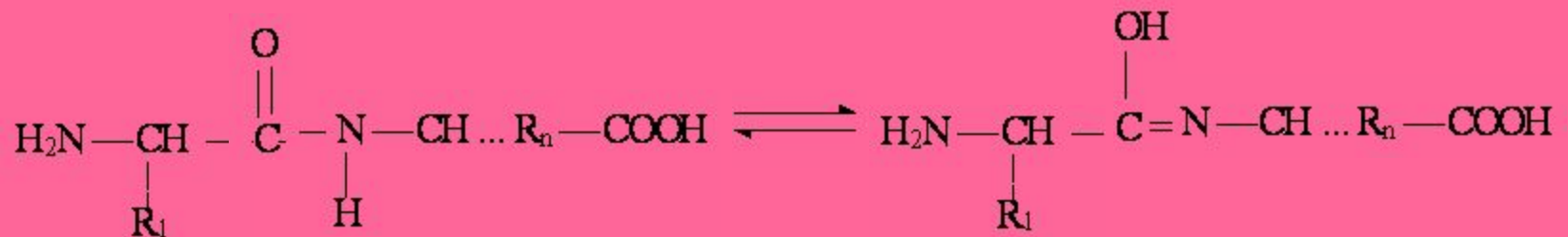


пептидная связь



Биуретовая реакция

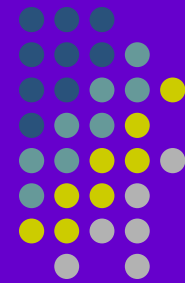
- Реакция обусловлена образованием биуретового комплекса в результате соединения меди с пептидной группировкой белка.
- В пептидах и белках пептидная связь обычно находится в амидной форме (или кетоформе), но в щелочной среде она переходит в иминольную (енольную):



Биуретовая реакция



[Вернуться](#)



Нингидриновая реакция

Качественная реакция на α -аминокислоты

- Аминокислота с нингидрином образует продукт конденсации типа азометина



Нингидриновая реакция



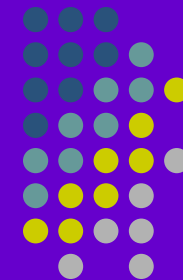
- путем перегруппировки



- и гидролиза

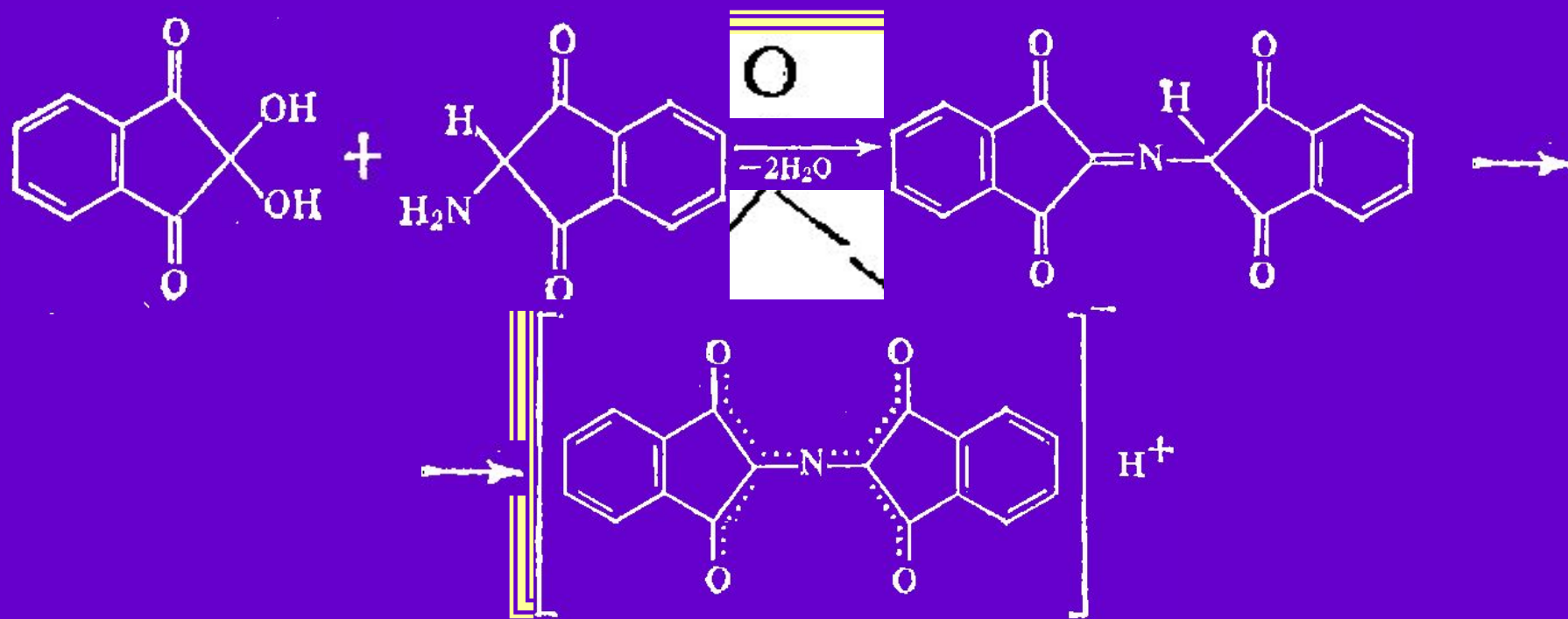


образуется 2-аминоиндандион

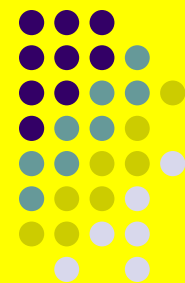


Нингидриновая реакция

- 2-аминоиндандион реагирует с нингидрином и дает краситель.



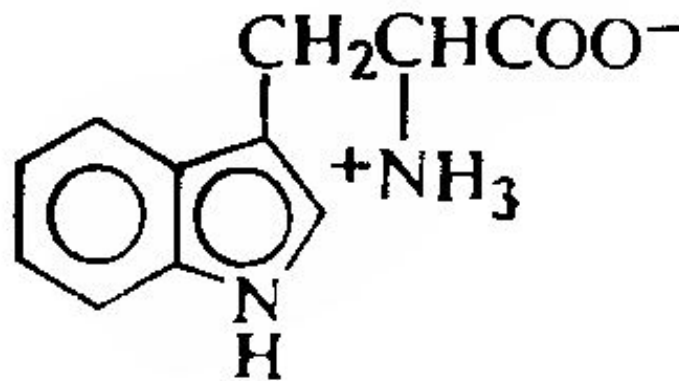
[Вернуться](#)



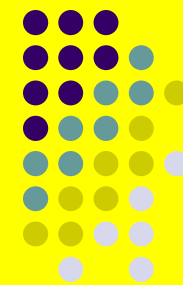
Ксантопротеиновая реакция

Определяет присутствие в белке ароматических и гетероциклических α - аминокислот :

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

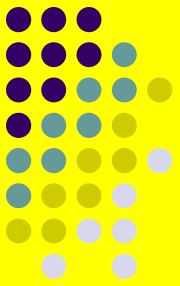


Ксантопротеиновая реакция

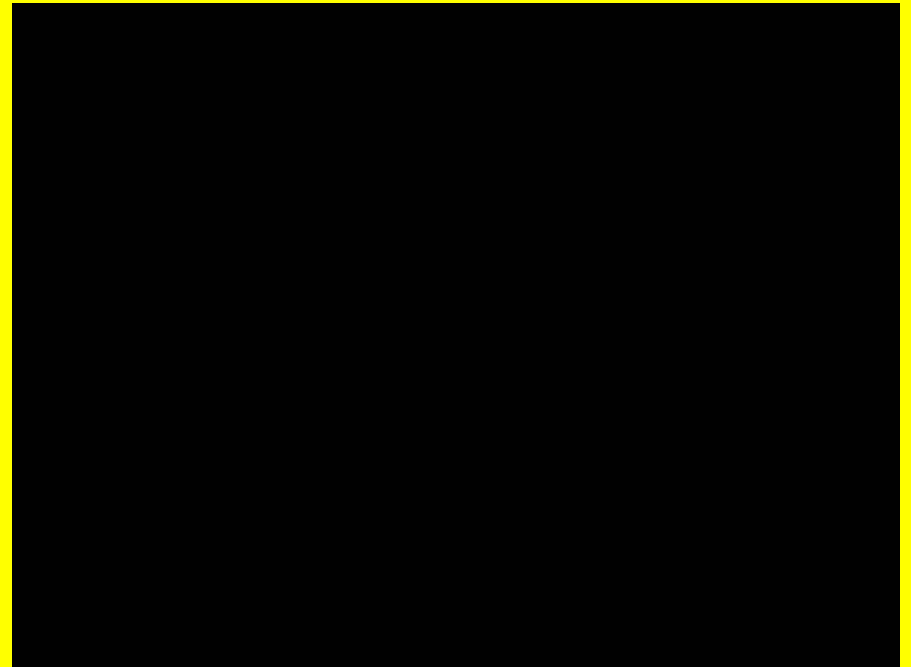


[Вернуться](#)

Ксантопротеиновая реакция

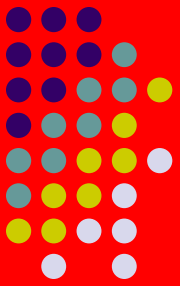


- При действии концентрированной HNO_3 на раствор белка образуется нитросоединение, окрашенное в желтый цвет.

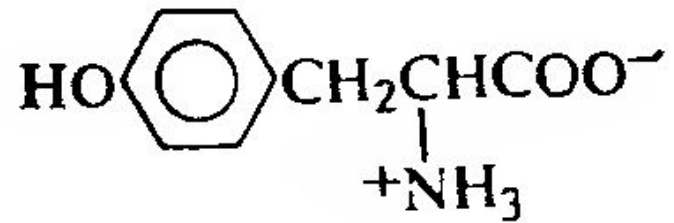


[Вернуться](#)

Реакция Миллона

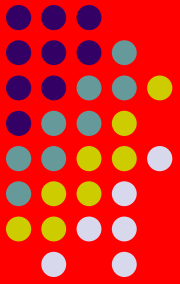


- Это реакция на аминокислоту тирозин

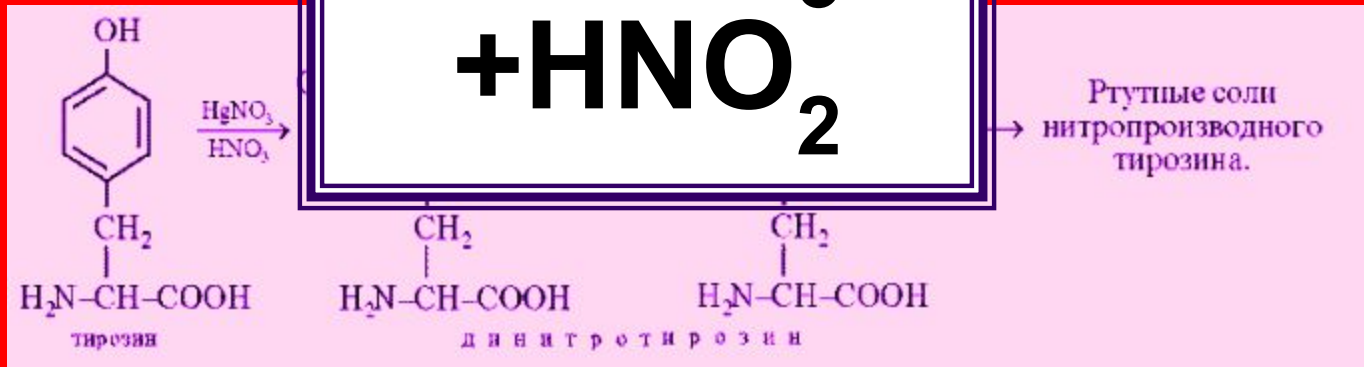
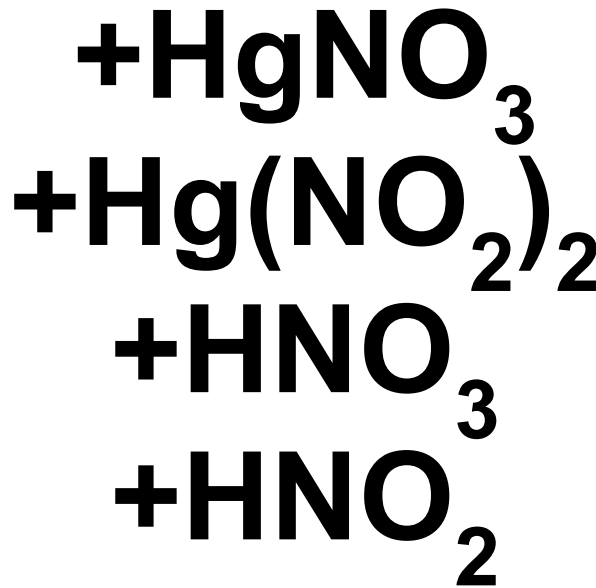




Реакция Миллона



- Реактив Миллона (раствор HgNO_3 и $\text{Hg}(\text{NO}_2)_2$ в разбавленном HNO_3 с примесью 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.

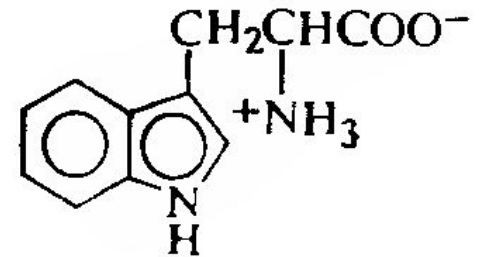
Образуется красное окрашивание.

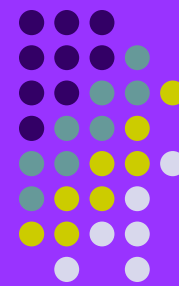


Реакция Гопкинса–Коле



- Эта реакция определяет аминокислоту триптофан.

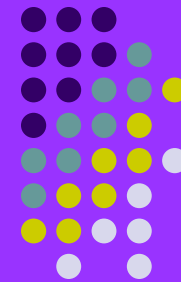




Реакция Гопкинса–Коле

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



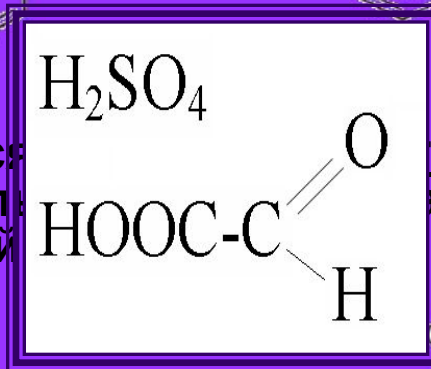


Реакция Гопкинса–Коле

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

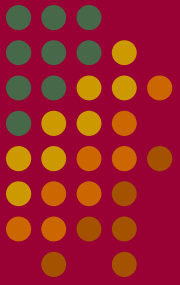


- Охладить до 0 °С насыщенного раствора щавелевой кислоты
- К 2 г порошка магния (слегка увлажненного) добавить щавелевую кислоту
- Полученный осадок оксалата магния отфильтровать и декантировать небольшим количеством воды.
- Фильтрат подкислить уксусной кислотой и довести до объема 200 мл (полученный 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.

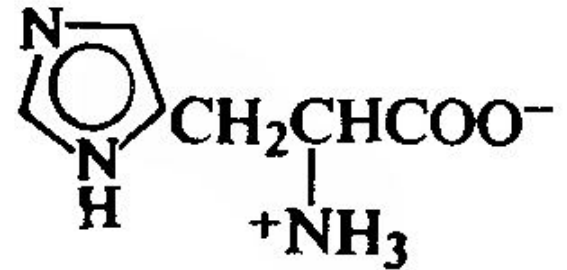
Наблюдается образование сине-фиолетового окрашивания



Реакция Паули (Диазореакция Паули)



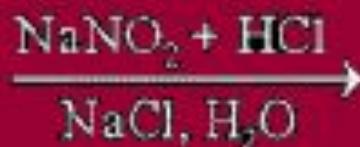
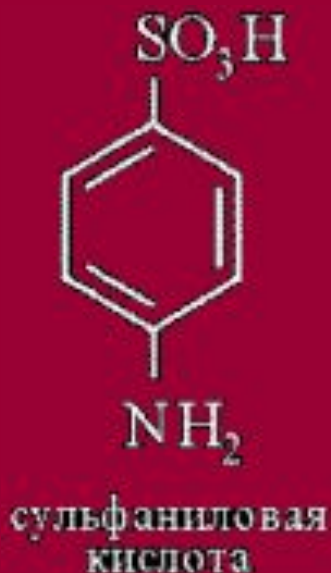
Эта реакция
аминокислоту
ГИСТИДИН.



Реакция Паули (Диазореакция Паули)

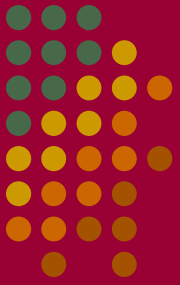


- при взаимодействии кислого раствора сульфаниловой кислоты с нитритом натрия образуется диазобензолсульфоная кислота:





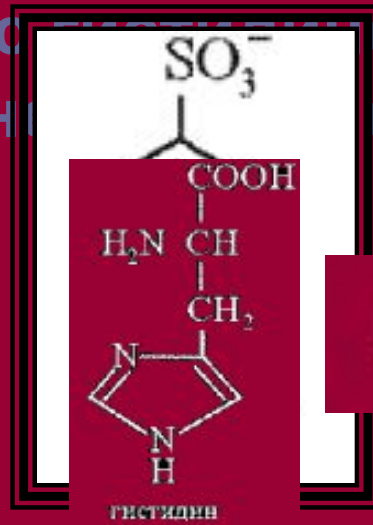
Реакция Паули (Диазореакция Паули)



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



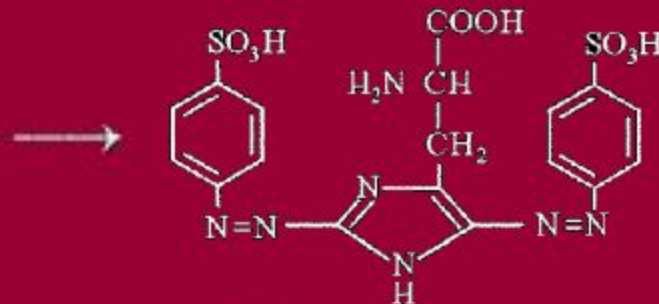
+



+



→



2,5-бис-*p*-сульфобензодиазогистидин

[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.

