



Учреждение образования
«Белорусская государственная
орденов Октябрьской Революции
и Трудового Красного Знамени
сельскохозяйственная академия»



Кафедра биологии растений и химии

ХИМИЯ

Лабораторный практикум

**Лабораторная работа
Цветные реакции на белки и аминокислоты**



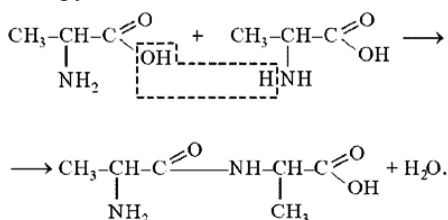
Лабораторная работа Цветные реакции на белки и аминокислоты

Цель работы: изучить основные способы получения и химические свойства аминокислот и белков, а так же качественные цветные реакции.

Материалы и оборудование. 1%-ный раствор глицина; раствор яичного белка или разбавленная сыворотка; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; сульфат меди (II), 1%-ный раствор; реактив Милона: состоит из азотнокислых солей окиси и закиси ртути в HNO_3 с примесью HNO_2 ; фенол, 0,1%-ный раствор; желатина, 1%-ный раствор; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; концентрированная азотная кислота; ледяная уксусная кислота (в ней в виде примеси всегда содержится глиоксиловая кислота); концентрированная серная кислота; сахароза, 10%-ный раствор; ацетат свинца (II), 5%-ный раствор; нингидрин, 0,2%-ный раствор в спирте; индикатор метиловый красный; 40%-ный раствор формальдегида; штатив с пробирками, капельницы или пипетки.

Цветные реакции на белки являются реакциями на структурные элементы белка – аминокислоты или образуемые ими химические группировки. При взаимодействии белка с отдельными химическими веществами возникают окрашенные продукты реакции, обусловленные присутствием в белках определенных аминокислот и групп.

1. Биуретовая реакция (реакция Пиотровского). Реакция обусловлена наличием в белках пептидных связей, соединяющих остатки аминокислот в молекуле белка путем отнятия элементов частицы воды из —COOH-группы одной аминокислоты и —NH₂- группы другой:



В сильно щелочной среде в присутствии сернистой меди образуются комплексные соединения меди с пептидной группировкой, окрашенные в красно-фиолетовый или сине-фиолетовый цвет.

Биуретовой реакцией обнаруживаются все без исключения белки, а также продукты их неполного гидролиза – пептоны и полипептиды. Для ди- и трипептидов биуретовая реакция ненадежна. Отенок окрашивания зависит от длины пептидной цепочки. Пептоны при этой реакции дают розовое или красное окрашивание. Биуретовая реакция положительна и с веществами небелкового характера, имеющими

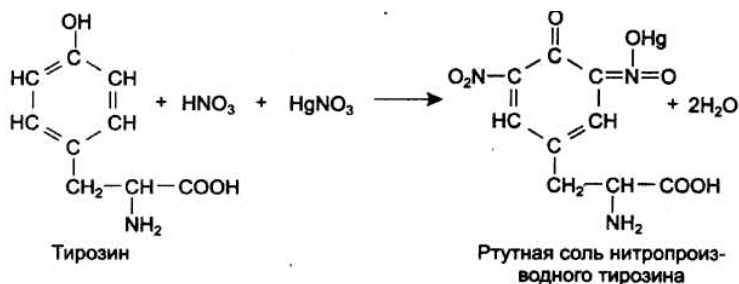


в своем составе не менее двух —CO—NH₂-групп, к ним относятся, например, оксамид —H₂N—CO—CO—NH₂, биурет —H₂N—CO—NH—CO—NH₂, по которому и названа реакция.

В пробирку наливают 5 капель раствора белка, 5 капель 10%-ного раствора гидроксида натрия и по каплям, начиная с 1 капли, раствор сернокислой меди до появления при взбалтывании розово-фиолетового или сине-фиолетового окрашивания. Надо избегать избытка CuSO₄, так как при дальнейшем его прибавлении все более усиливается нехарактерный синий оттенок и, наконец, выпадает осадок гидрата окиси меди.

При малых концентрациях белка в растворе в пробирку наливают 20 капель 10%-ного раствора гидроксида натрия, добавляют 1–2 капли 1%-ного раствора сернокислой меди и перемешивают. Затем набирают в пипетку разбавленный раствор белка и осторожно спускают его по стенке пробирки так, чтобы он наслаивался сверху и не смешивался со щелочным раствором сернокислой меди. На границе двух слоев жидкости образуется фиолетовое кольцо.

2. Реакция Миллона. Реактив Миллона состоит из азотнокислых солей окиси и закиси ртути в HNO₃ с примесью HNO₂. Он дает окрашивание с фенолами, полифенолами. В случае белков реакция обусловлена присутствием в них тирозинового остатка со свободной фенольной группой. При нагревании раствора белка с реактивом Миллона образуется нитросоединение тирозина, которое, присоединяя ртуть, превращается в ртутную соль нитротирозина, имеющую пурпурно-красный цвет:



Белки, не содержащие тирозин (желатина, клупеин, сальмин и др.), не дают реакции Миллона.

В пробирку наливают 5 капель раствора белка и 3 капли реактива Миллона. Образуется белый осадок (действие соли тяжелого металла, а также концентрированной азотной кислоты). При слабом нагревании (нагревать не выше 50 °С) осадок окрашивается сначала в розовый, а затем в пурпурно-красный цвет от образования ртутной соли нитропроизводного тирозина.

Для сравнения производят аналогичным образом Миллонову реакцию с желатиной. Жидкость остается бесцветной (или слегка желтеет), так как в молекуле желати-



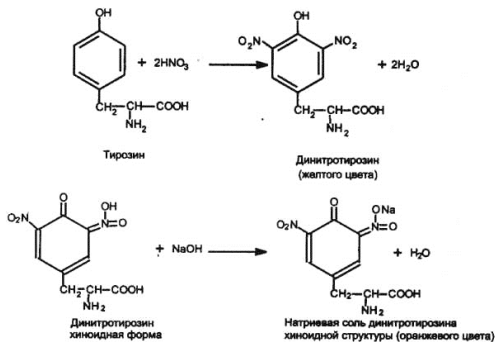
тины остатки тирозина отсутствуют.

Проделявают реакцию с фенолом. В пробирку наливают 10 капель раствора фенола, 5 капель реактива Миллона и осторожно нагревают. Появляется розовое окрашивание.

Реакции вредят хлориды, перекись водорода, алкоголь, большое количество минеральных солей, так как дают осадки с ртутью и превращают реактив в недействительный. Щелочные растворы перед производством реакции должны быть нейтрализованы азотной или уксусной кислотой во избежание выпадения осадка окиси ртути.

3. Ксантопротеиновая реакция (Мульдера). Реакция обусловлена наличием в белке циклических аминокислот – тирозина и триптофана, содержащих в своем составе бензольное ядро. При нагревании большинства белков с концентрированной азотной кислотой бензольное ядро тирозина и триптофана нитруется с образованием нитропроизводных желтого цвета. Последние при добавлении щелочи превращаются в соли хиноидной структуры, окрашенные в оранжевый цвет.

Реакцию нитрования и образования солей хиноидной структуры можно представить следующим образом:



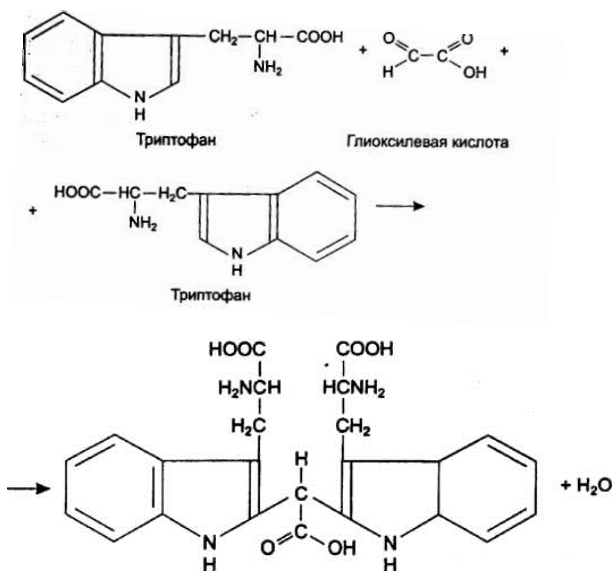
Ксантопротеиновую реакцию (желтое окрашивание) можно наблюдать на коже, ногтях, шерсти и т. п. при попадании на них концентрированной азотной кислоты. Белки, не содержащие тирозина и триптофана, не дают ксантопротеиновой реакции (желатина, сальмин и др.). В отличие от тирозина и триптофана, фенилаланин подвергается нитрованию с большим трудом и, по-видимому, не обуславливает ксантопротеиновой реакции. Поскольку ксантопротеиновая реакция обусловлена нитрованием ароматического кольца, она может быть положительной с более простыми ароматическими соединениями, например, с фенолом.

В пробирку наливают 5 капель раствора белка и 3 капли концентрированной азотной кислоты. Образуется осадок белка под действием кислоты. При нагревании осадок окрашивается в желтый цвет (нитрование) и постепенно растворяется (происходит гидролиз белка), сообщая желтую окраску раствору.



Содержимое пробирки охлаждают под краном. К охлажденной смеси прибавляют по каплям 10%-ный раствор гидроксида натрия. Когда реакция жидкости делается щелочной, появляется оранжевое окрашивание вследствие образования натриевой соли динитротирозина.

4. Реакция Адамкевича. Реакция обусловлена присутствием в белке остатков аминокислоты триптофана. Она основана на способности триптофана в кислой среде вступать в реакцию с глиоксильной кислотой, образуя при этом окрашенные продукты конденсации. В качестве источника глиоксильной кислоты обычно используют ледяную уксусную кислоту, содержащую примесь глиоксильной. Две молекулы триптофана, реагируя с глиоксильной кислотой, образуют соединение красно-фиолетового цвета:



К 1 капле неразбавленного белка или 5–10 каплям сыворотки добавляют 10 капель ледяной уксусной кислоты (или глиоксильной кислоты) и слегка нагревают до растворения белка.

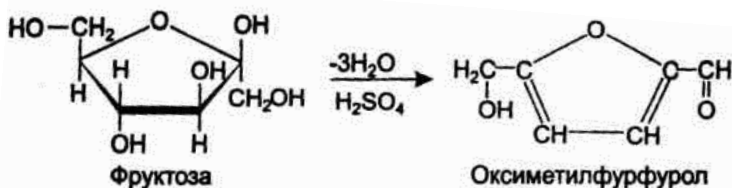
Содержимое пробирки охлаждают и, сильно наклонив пробирку, очень осторожно, по стенке подслаивают из пипетки около 1 мл концентрированной серной кислоты так, чтобы обе жидкости не смешались. При стоянии на границе соприкосновения двух слоев жидкости возникает красно-фиолетовое окрашивание в виде



кольца. Окраска постепенно распространяется на весь раствор. При нагревании в кипящей водяной бане окрашивание развивается быстрее.

5. Реакция Шульце-Распайля. Данная реакция обусловлена наличием в белке остатка триптофана. Триптофан, взаимодействуя с оксиметилфурфулолом, дает продукты конденсации, окрашенные в вишнево-красный цвет. Оксиметилфурфулол в этой реакции образуется из гексоз (быстрее из фруктозы), получающихся при гидролизе сахарозы под влиянием концентрированной серной кислоты.

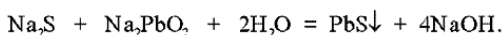
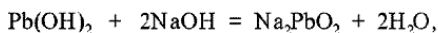
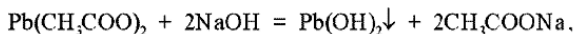
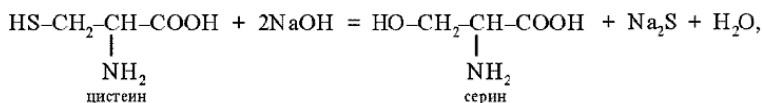
Образование оксиметилфурфулола из фруктозы в присутствии концентрированной серной кислоты происходит в результате следующей реакции:



К 1 капле неразбавленного яичного белка или к 5–10 каплям сыворотки добавляют 1–2 капли 10%-ного раствора сахарозы и пипеткой осторожно по стенке пробирки подслаивают около 1 мл концентрированной серной кислоты.

Легким встряхиванием пробирки смешивают обе жидкости. Вследствие выделения тепла при растворении H_2SO_4 в воде происходит саморазогревание жидкости на месте соприкосновения обоих слоев и появляется вишнево-красное окрашивание. Необходимо следить, чтобы жидкость не перегрелась выше $70^\circ C$, так как иначе под влиянием H_2SO_4 происходит обугливание органического вещества и раствор буреет.

6. Реакция Фоля. Реакция обусловлена присутствием в белке аминокислот цистина и цистеина, содержащих слабосвязанную серу. Эти аминокислоты под влиянием щелочи при нагревании разрушаются с образованием сероводорода. Последний в щелочной среде дает сернистый натрий, который, реагируя с плюмбитом натрия, образует черный осадок сернистого свинца. Для выявления сульфида натрия используют ацетат свинца, который при взаимодействии с гидроксидом натрия превращается в его плюмбит. В результате взаимодействия ионов серы и свинца образуется сульфид свинца черного или бурого цвета:

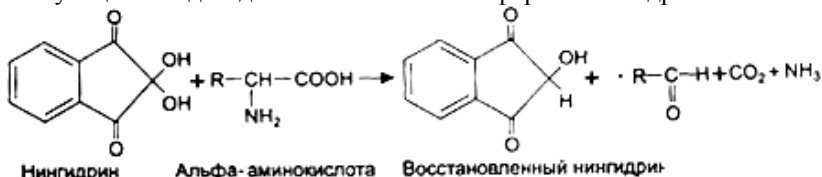


Другая серосодержащая аминокислота метионин более устойчива и при слабом щелочном гидролизе не разрушается.

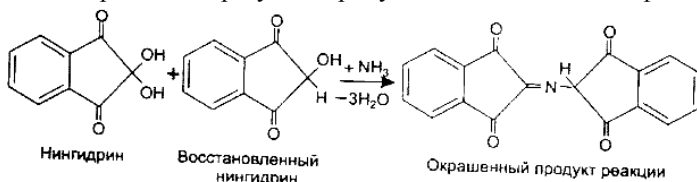
Наливают в пробирку 10 капель 5%-ного раствора ацетата свинца (II) и по каплям прибавляют 10%-ный раствор гидроксида натрия до растворения образующегося вначале осадка гидроксида свинца (II) (Реактив Фоля). Приливают несколько капель белка и смесь кипятят. Через некоторое время жидкость буреет и выпадает черный осадок сульфида свинца (II).

7. Нингидриновая реакция (реакция Руэмманна). Реакция обусловлена наличием в белке остатков α -аминокислот. При нагревании растворов белка, пептидов и α -аминокислот с нингидрином образуются окрашенные соединения.

Нингидрин, являясь сильным окислителем, вызывает окислительное дезаминирование α -аминокислоты, приводящее к образованию аммиака, двуокиси углерода, соответствующего альдегида и восстановленной формы нингидрина:



Восстановленная форма нингидрина реагирует с избытком нингидрина и с аммиаком. При этом образуется продукт конденсации сине-фиолетового цвета:



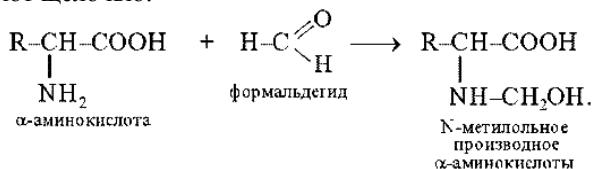
В случае аминокислот (пролина и оксипролина) образуется продукт ярко-желтого цвета. Нингидриновую реакцию дают некоторые амины, амиды кислот, а также аммонийные соли и другие соединения.



В пробирку наливают 10 капель раствора белка, добавляют 3–6 капель 0,2%-ного раствора нингидрина и кипятят. Через 1–3 мин наблюдают появление розового, красного, а затем сине-фиолетового окрашивания. Через некоторое время раствор становится синим.

Каждая из рассмотренных выше цветных реакций в отдельности не является специфичной для белка. Доказательством присутствия белка может служить лишь положительный результат нескольких реакций.

8. Реакция с формальдегидом. При взаимодействии α -амино-кислот с формальдегидом образуются относительно устойчивые карбиноламины – N-метилольные производные, содержащие свободную карбоксильную группу, которую затем титруют щелочью:



Эта реакция лежит в основе количественного определения α -аминокислот методом формального титрования (метод Сёрсенена).

В пробирку наливают 5 капель 1%-ного раствора глицина и прибавляют 1 каплю индикатора метилового красного. Раствор окрашивается в желтый цвет (нейтральная среда). К полученной смеси добавляют равный объем 40%-ного раствора формальдегида (формалин). Появляется красное окрашивание (кислая среда).

Результаты работы оформить в виде таблицы. В выводах указать, на чем основаны цветные реакции на белки. Написать формулы определяемых аминокислот.

№	Название	Реактивы и условия	Окраска	Определяемые аминокислоты



Учреждение образования
«Белорусская государственная
орденов Октябрьской Революции
и Трудового Красного Знамени
сельскохозяйственная академия»



ЛИТЕРАТУРА

Основная

1. Ахметов, Н. С. Общая и неорганическая химия: Учебник для вузов/ Н. С. Ахметов. – М.: Высш. шк., 2006. – 743. .
2. Барковский, Е. В. Аналитическая химия: Учеб. пособие/ Е. В. Барковский. – Мн.: Высш. шк., 2004. – 351 с.
3. Барковский, Е. В. Введение в химию биогенных элементов и химический анализ: Учеб. пос./ Е. В. Барковский, С. В. Ткачев и др. – М.: Высш. шк., 1997. –126 с.
4. Болдырев, А. И. Физическая и коллоидная химия. – М.: Высш. шк., 1983.
5. Гольбрайх, З. Е. Сборник задач и упражнений по химии: Учеб. пособие/ З. Е. Гольбрайх.–М.:ООО «Издательство Астрель»,2004.–383с
6. Грандберг, И.И. Органическая химия: Учеб. для студ. вузов обучающихся на агрономических специальностях/ И. И. Грандберг. – М.: Дрофа, 2004. –672 с.
7. Князев Д. А. Неорганическая химия: Учебник для вузов/ Д. А. Князев, С. Н. Смарилин. – М.: Высш. шк., 1990. – 430 с.
8. Руководство к изучению курса “Общая и неорганическая химия”: Пособие для студентов нехимических специальностей / И. Е. Шиманович [и др.]; под ред. И.Е. Шимановича. – 3-е изд. – Минск: РИВШ, 2008. – 112 с.
9. Химия. Курс лекций: учебно-методическое пособие / О. В. Поддубная [и др.]. – Горки : БГСХА, 2024. – 383 с.
10. Химия. Лабораторный практикум: учеб. пособие/А. Р. Цыганов, О. В. Поддубная, И. В. Ковалева, Т. В. Булак.–Минск: ИВЦ Минфина, 2015. – 320 с.
11. Угай Я. А. Общая и неорганическая химия: Учебник для вузов/ Я. А. Угай. 4-е изд. – М.: Высш. шк., 2004. – 440 с.
12. Химия: учебно-методический комплекс: Учебно-методическое пособие / О. В. Поддубная, И.В. Ковалева и др. – Горки: БГСХА, 2011. – 452 с. ISBN 978-985-467-359-2
13. Хмельницкий, Р. А. Физическая и коллоидная химия: Учебник для вузов/ Р. А. Хмельницкий. – М.: Высш. шк., 1988.
14. Цитович, Н. К. Курс аналитической химии: Учебник для вузов/ Н. К. Цитович. – М.: Высш. шк., 1987. – 397 с.
15. Цыганов, А. Р. Сборник задач и упражнений по химии: Учеб. пособие / А. Р. Цыганов, О. В. Поддубная. – Минск: ИВЦ Минфина, 2013. – 236 с.
16. Щербина, А.Э. Органическая химия. Задачи и упражнения: Учеб. пособие / А.Э. Щербина, Л.Г. Матусевич, И.В. Сенько. – Минск : Новое знание, 2007. – 304 с.

Дополнительная

1. Белясова, Н.А. Биохимия и молекулярная биология: Учеб. пособие/ Н.А. Белясова. – Минск: Книжный дом, 2004. – 416 с.
2. Введение в лабораторный практикум по неорганической химии: Учеб. пособие / В.В. Свиридов, Г.А.Попкович и др. – Мн : Высш. шк., 2003. – 96 с.
3. Дорохова, Е. Н. Аналитическая химия. Физико-химические методы анализа: Учебник для почвенно-агрохимических специальностей / Е. Н. Дорохова, Г. В. Прохорова. – М.: Высш. шк., 1991. – 354 с.
4. Жарский, И. М. Теоретические основы химии: сборник задач: Учеб. пособие. – Минск.: Аверсев, 2004. – 397 с.
5. Практикум по общей и биоорганической химии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / под ред. В. А. Попкова. – 3-е изд. – М.: Изд. центр «Академия», 2008. – 240 с.
6. Слесарев, В. И. Химия: основы химии живого: Учебник для вузов / В. И. Слесарев. – СПб: Химиздат, 2001. – 784 с.
7. Степин, Б. Д. Неорганическая химия: Учебник для вузов/ Б. Д. Степин, А.А. Цветков. – М.: Высш. шк., 1994. – 608 с.

Справочники:

1. Краткий химический справочник. – М.: Химия, 1977.
2. Кольман, Я. Наглядная биохимия: Пер. с нем/ Я.Кольман, К.Г. Рем. – М.: Мир, 2000. – 469 с.
3. Лидин, Р.А. Химические свойства неорганических веществ/ Под ред. Р.А. Лидина. – 5-е изд., стер. – М.: КолосС, 2008, – 480 с.



Учреждение образования
«Белорусская государственная
орденов Октябрьской Революции
и Трудового Красного Знамени
сельскохозяйственная академия»



Составители
Поддубная Ольга Владимировна
Ковалева Ирина Владимировна