

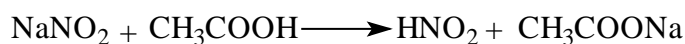
# 11. REAKCJE CHARAKTERYSTYCZNE AMINOKWASÓW

## 1. Deaminacja aminokwasów kwasem azotowym (III)

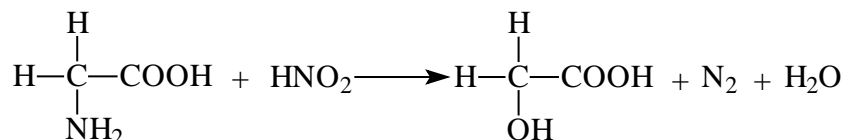
### Zasada:

Aminokwasy pod wpływem kwasu azotowego (III), tworzącego się wg reakcji pierwszej, ulegają reakcji deaminacji, której produktami są: azot cząsteczkowy (wydzielający się w formie gazowej) oraz odpowiedni hydroksykwas. Deaminacja  $\alpha$ -aminokwasu przebiega zgodnie z drugą reakcją przedstawioną poniżej:

### Reakcja 1



### Reakcja 2



Reakcja ta jest podstawą w gazometrycznej metodzie ilościowego oznaczania  $\alpha$ -aminokwasów metodą van Slyke'a.

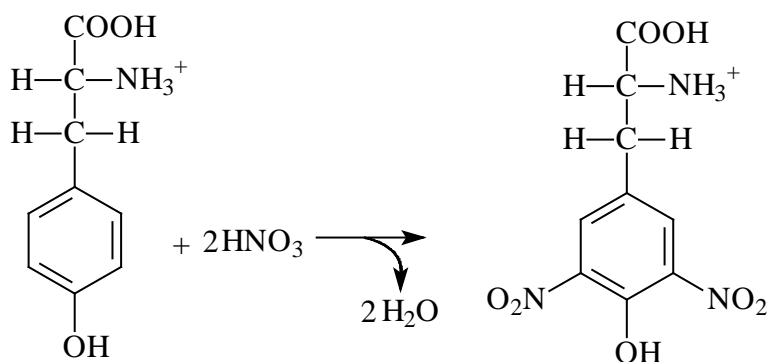
### Wykonanie:

- W probówce zmieszać:
  - 1 ml 10% roztworu  $\text{NaNO}_2$  (azotanu (III) sodowego),
  - 1 ml 2 M roztworu  $\text{CH}_3\text{COOH}$  – odczekać, aż zmniejszy się wydzielanie gazu o żółtej barwie i ostrej woni (tlenki azotu), po czym dopiero dodać do probówki:
  - 2 ml 1% roztworu glicyny lub innego  $\alpha$ -aminokwasu i obserwować wydzielanie się produktu gazowego reakcji deaminacji.

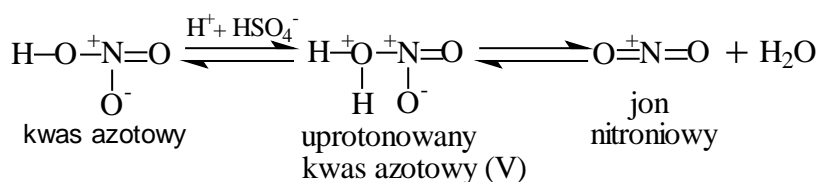
## 2. Wykrywanie aminokwasów aromatycznych, reakcja ksantoproteinowa

### Zasada:

Aminokwasy aromatyczne – zarówno wolne, jak i związane w białku – ulegają nitrowaniu, tworząc nitrowe pochodne o barwie żółtej. Tylko sporadycznie można nitrować związki aromatyczne samym stężonym kwasem azotowym (V). Udaje się to w przypadku związków o skondensowanych pierścieniach, np. antracenu, oraz w przypadku dwóch aminokwasów, tyrozyny i tryptofanu. Reakcja z tyrozyną przebiega według następującego schematu:



W reakcjach nitrowania innych związków aromatycznych, w tym również fenyloalaniny, najczęściej wykorzystywanym azotowym elektrofilem jest kation nitroniowy,  $\text{NO}_2^+$ . Jon nitroniowy powstaje z kwasu azotowego (V) pod wpływem katalizującego protonu, dostarczanego przez kwas siarkowy, zgodnie z reakcją:



Uprotonowany kwas azotowy po odłączeniu cząsteczki wody przechodzi w jon nitroniowy. W praktyce podczas reakcji nitrowania stosuje się tzw. mieszaninę nitrującą, która składa się ze stężonego kwasu azotowego (V) oraz ze stężonego kwasu siarkowego (w stosunku 1:3 v/v). W środowisku zasadowym barwa nitrowych pochodnych aminokwasów pogłębia się do żółtopomarańczowej, skutkiem utworzenia soli.

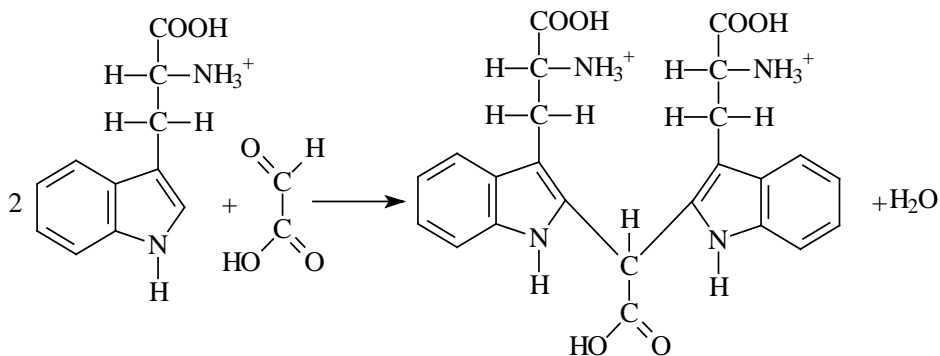
### Wykonanie:

- Przygotować trzy probówki, do których należy odmierzyć po 1 ml:
  - 1% roztworu tyrozyny – do pierwszej,
  - 1% roztworu glicyny – do drugiej probówki,
  - 1% roztworu białka (albuminy, owoalbuminy, żelatyny lub rozcieńczonej surowicy) – do trzeciej.
- Do wszystkich probówek dodać po 1 ml stężonego kwasu azotowego (V) i ogrzewać 5 minut we wrzącej łaźni wodnej.
- Zaobserwować, w których probówkach roztwór zabarwił się na żółto.
- Następnie wszystkie probówki należy oziębic pod bieżącą wodą i dodać po 4 ml 20% roztworu NaOH (reakcja silnie egzotermiczna!).
- Zaobserwować, w których probówkach roztwór zabarwi się na kolor żółtopomarańczowy. Zinterpretować uzyskane wyniki.

### 3. Wykrywanie pierścienia indolowego w tryptofanie

#### Zasada:

W środowisku kwaśnym tryptofan reaguje z aldehydami, między innymi z kwasem glioksalowym (reakcja Adamkiewicza-Hopkinsa) lub aldehydem mrówkowym (reakcja Voisseneta), dając barwne produkty kondensacji. W kwaśnych hydrolizatach peptydów lub białek wynik tej reakcji jest ujemny, ponieważ tryptofan podczas kwaśnej hydrolizy ulega zniszczeniu.



#### Wykonanie:

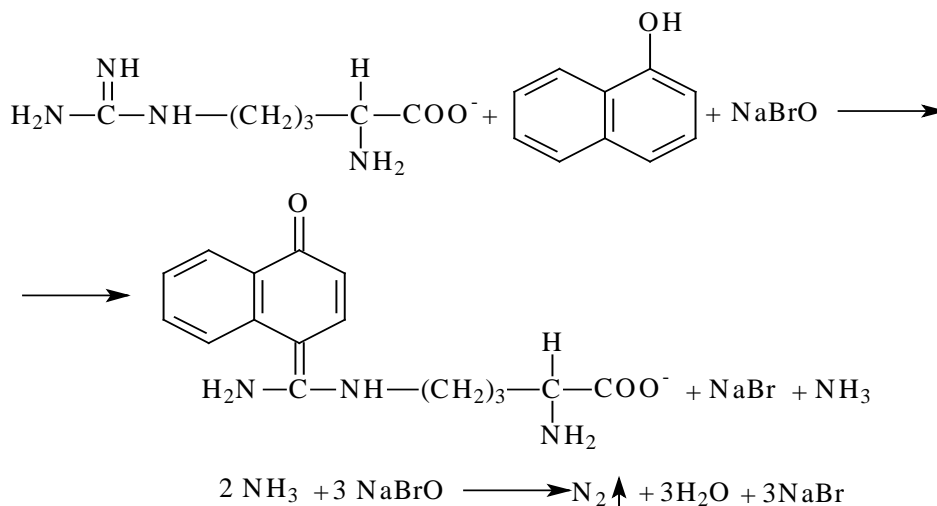
- Przygotować trzy probówki, do których należy odmierzyć po 1 ml:
  - 1% roztworu tryptofanu – do pierwszej,

- 1% roztworu glicyny – do drugiej,
- 2% roztworu białka (jaja kurzego, albuminy, żelatyny lub rozcieńczonej surowicy) – do trzeciej.
- Do wszystkich probówek dodać 0,5 ml kwasu glioksalowego (lub formaliny) i wymieszać.
- W każdej próbie podwarstwić 1 ml stężonego kwasu siarkowego – dodając kwas powoli, po ściance lekko przechylonej probówki, której nie należy wstrząsać. Ogrzewać we wrzącej łaźni do 2 minut.
- Pojawienie się czerwono-fioletowego pierścienia na granicy faz oznacza dodatni wynik na obecność tryptofanu.
- Zinterpretować uzyskane wyniki.

#### 4. Wykrywanie układu guanidynowego w argininie, reakcja Sakaguchiego

##### Zasada:

Grupa guanidynowa argininy w obecności utleniacza bromianu (I) w środowisku zasadowym tworzy z  $\alpha$ -naftolem barwny, pomarańczowoczerwony produkt i uwalnia się amoniak. W razie dłuższego działania NaBrO następuje odbarwienie roztworu, ponieważ barwny produkt utlenia się dalej. Dodanie roztworu mocznika (40%) stabilizuje utworzony barwnik. Reakcja ta wykorzystywana jest do ilościowego oznaczenia argininy w białkach, szczególnie bogatych w ten aminokwas.



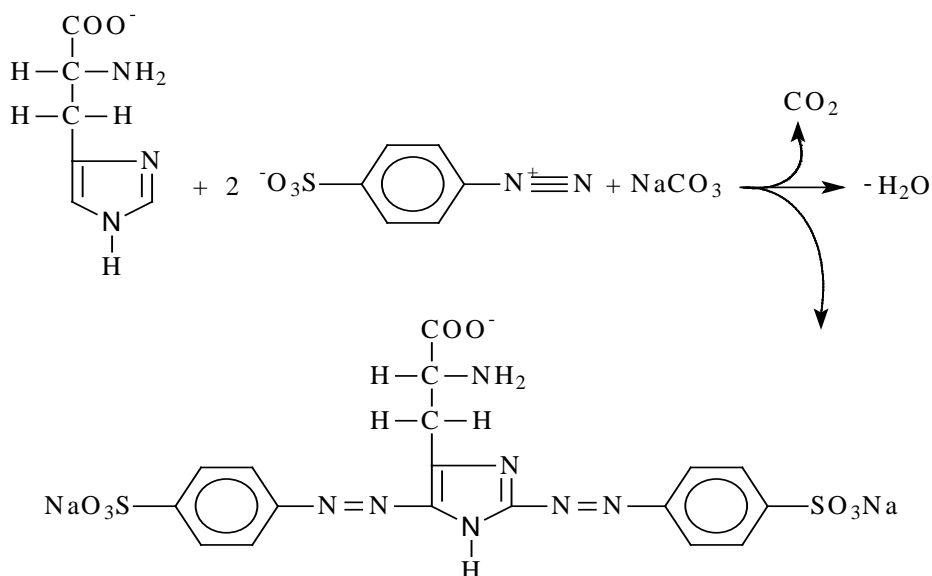
### Wykonanie:

- Przygotować trzy próbówki, do których należy odmierzyć po 1 ml:
  - 0,1% roztworu argininy – do pierwszej,
  - 1% roztworu glicyny – do drugiej,
  - 1% roztworu białka (jaja kurzego, albuminy, żelatyny lub rozcieńczonej surowicy) – do trzeciej.
- Do wszystkich próbek dodać po:
  - 1 ml 10% roztworu NaOH, a następnie po 2–3 krople 0,2% alkoholowego roztworu  $\alpha$ -naftolu (odczynnik Molischa), każdą próbę dokładnie wymieszać.
- Do wszystkich prób dodać po 0,25 ml bromianu (I) sodowego, dokładnie wymieszać i dodać po: 0,5 ml 40% roztworu mocznika w celu stabilizacji pojawiającego się pomarańczowoczerwonego barwnika.
- Zinterpretować uzyskane wyniki.

## 5. Wykrywanie pierścienia imidazolowego w histydynie, reakcja Pauly'ego

### Zasada:

Pierścień imidazolowy histydyny w środowisku zasadowym ulega reakcji sprzęgania z jonem p-sulfobenzenodiazoniowym, której produktem jest pomarańczowy barwnik azowy, powstający zgodnie z przedstawionym schematem:



### Wykonanie:

- Przygotować trzy probówki, do których należy odmierzyć po 0,5 ml:
  - 0,5% roztworu histydyny – do pierwszej,
  - 1% roztworu glicyny – do drugiej,
  - 1% roztworu białka (jaja kurzego, albuminy, żelatyny lub rozcieńczonej surowicy) – do trzeciej.

### Otrzymywanie roztworu soli diazoniowej:

5 ml 0,5% roztworu kwasu sulfanilowego odmierzyć do probówki, umieścić ją w zlewce z zimną wodą, następnie do próby dodać: 0,5 ml 0,5% roztworu  $\text{NaNO}_2$  i wymieszać. Otrzymany roztwór zalkalizować za pomocą  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  *in subst.*, sprawdzając pH roztworu papierkiem wskaźnikowym.

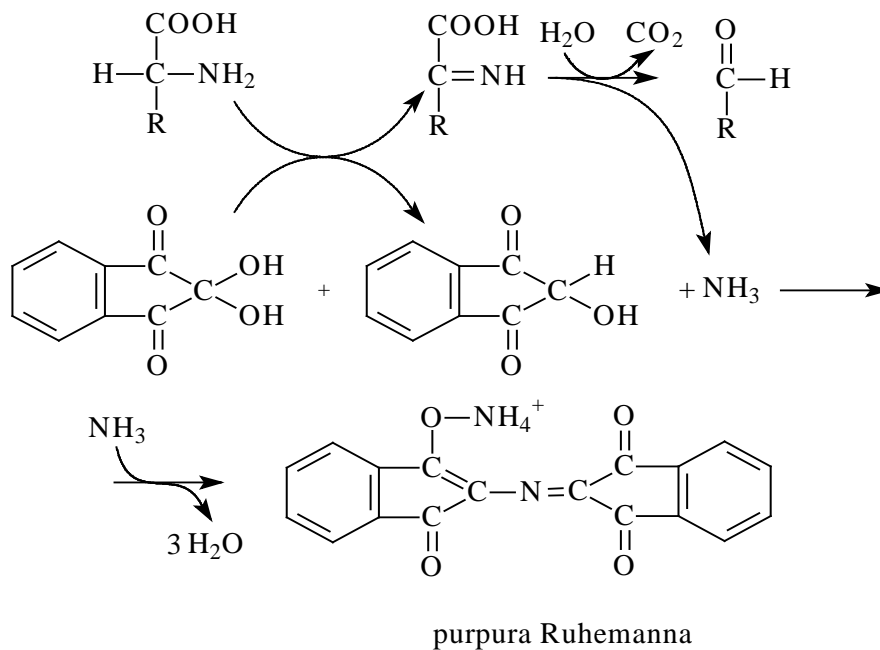
- Do trzech probówek z wcześniej przygotowanymi roztworami aminokwasów lub białka dodać zalkalizowany roztwór soli diazoniowej i wymieszać.
- Pojawienie się pomarańczowego zabarwienia oznacza dodatni wynik na obecność histydyny.
- Zinterpretować uzyskane wyniki.

## 6. Reakcja ninhydrynowa

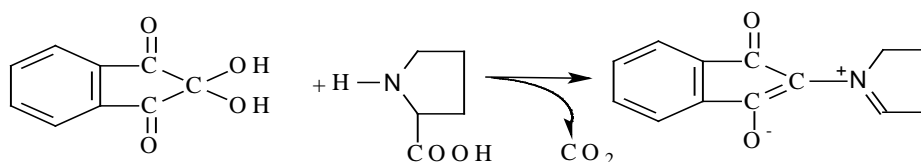
### Zasada:

Aminokwasy pod wpływem ninhydryny ulegają utlenieniu, dekarboksylacji, a później deaminacji. Przejściowo powstaje iminokwas i zredukowana ninhydryna. Następnie iminokwas przekształca się w aldehyd uboższy o jeden atom węgla, uwalnia się  $\text{CO}_2$  oraz amoniak. W obecności powstałego amoniaku zredukowana cząsteczka ninhydryny ulega reakcji kondensacji z utlenioną cząsteczką ninhydryny i powstaje fioletowoniebieski produkt kondensacji zwany purpurą Ruhemanna. Zależnie od rodzaju aminokwasu różna jest intensywność i odcień powstającego zabarwienia. Reakcja ninhydrynowa jest czuła i dokładna. Dodatni jej wynik dają wszystkie wolne aminokwasy w środowisku o  $\text{pH} > 4$ , dlatego reakcja ta jest powszechnie stosowana do wykazania rozdzielanych aminokwasów metodą chromatograficzną (patrz ćwiczenie: chromatografia cienkowarstwowa). Natężenie zabarwienia jest proporcjonalne do stężenia  $\alpha$ -aminokwasów, dlatego reakcja ninhydrynowa stanowi podstawę metody kolorymetrycznej, ilościowego oznaczania wolnych  $\alpha$ -aminokwasów. Dodatni odczyn ninhydrynowy dają również inne związki, które zawierają grupę  $\alpha$ -aminową, czyli sole amonowe, aminocukry, amoniak. Peptydy i białka również mogą dawać dodatni odczyn ninhydrynowy, jednak tylko w nieznacznym stopniu;

zastanów się dlaczego? Reakcja aminokwasów z ninhydryną stanowi podstawę metod gazometrycznych ilościowego oznaczania aminokwasów na podstawie ilości wydzielonego CO<sub>2</sub> lub NH<sub>3</sub>.



Iminokwasy, prolina i hydroksypolina, które nie zawierają grupy α-aminowej, dają w reakcji z ninhydryną produkt o barwie żółtej.



### Wykonanie:

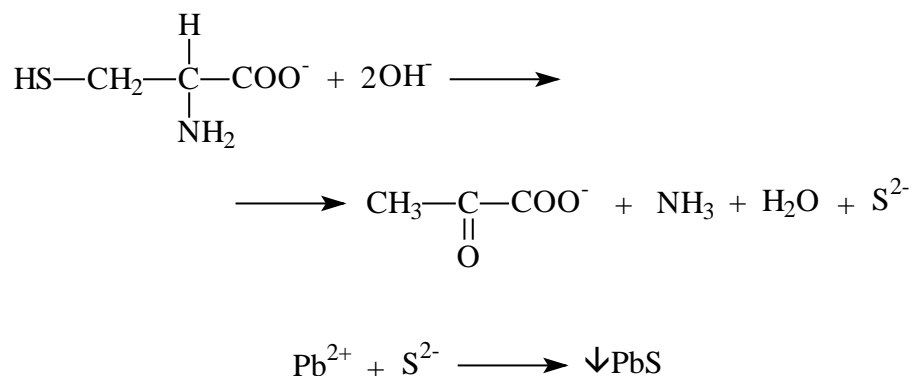
- Przygotować trzy probówki, do których należy odmierzyć po 1 ml:
  - 0,1% roztworu α-aminokwasu (leucyny) do pierwszej,
  - 1% roztworu proliny do drugiej,
  - 1% roztworu peptydu lub białka (glutajonu, albuminy, żelatyny lub rozcieńczonej surowicy) do trzeciej.
- Zakwaszone roztwory aminokwasów zobojętnić roztworem NaOH.

- Do wszystkich probówek dodać po: 0,5 ml 0,1% roztworu ninhydryny w 50% etanolu.
- Próby ogrzać do wrzenia we wrzącej łaźni wodnej.
- Zaobserwować pojawienie się charakterystycznego zabarwienia. Porównać i zinterpretować uzyskane wyniki w poszczególnych próbach.

## 7. Wykrywanie siarki cysteiny i cystyny

### Zasada:

Aminokwasy siarkowe z grupami –SH lub –S-S- (zarówno w stanie wolnym lub związanym w białkach), podczas ogrzewania w środowisku silnie alkalicznym, przekształcając się w kwas pirogronowy, uwalniają siarkę w postaci jonów siarczkowych. Jony siarczkowe reagują z jonami ołowiu (II), dając czarny osad PbS. Dodatkowym produktem jest amoniak. Metionina nie daje dodatniego wyniku tej reakcji.



### Wykonanie:

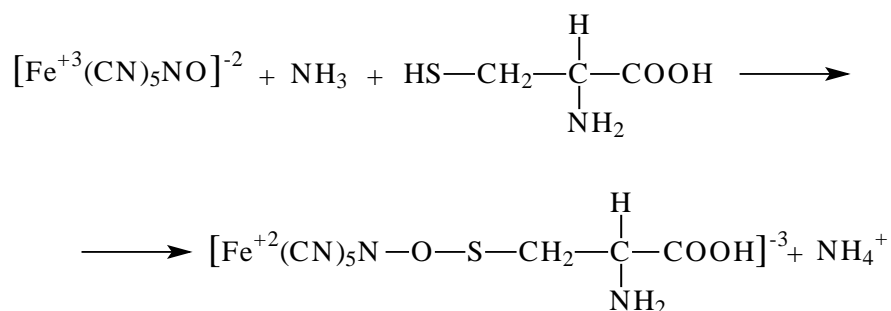
- Przygotować trzy probówki, do których należy odmierzyć po 0,5 ml:
  - 1% roztworu cysteiny lub cystyny do pierwszej,
  - 1% roztworu metioniny do drugiej,
  - 1% roztworu białka: (jaja kurzego, albuminy, żelatyny lub rozcieńczonej surowicy) do trzeciej.
- Do wszystkich probówek dodać po: 1 kropli 0,25 M roztworu octanu ołowiu (II), wymieszać i dodać 2 ml 20% roztworu NaOH.
- Wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 2–3 minuty.
- Porównać i zinterpretować wyniki w poszczególnych próbach.



## 8. Wykrywanie grup tiolowych

### Zasada:

Grupy tiolowe –SH tworzą z nitroprusydkiem sodu związek kompleksowy o zabarwieniu czerwono-fioletowym, według przedstawionej reakcji:



### Wykonanie:

- Przygotować trzy próbki, do których należy odmierzyć po 1 ml:
  - 0,1% świeżego roztworu cysteiny do pierwszej,
  - 0,1% świeżego roztworu cystyny do drugiej,
  - 1% roztworu białka (jaja kurzego, albuminy, żelatyny lub rozcieńczonej surowicy) do trzeciej.
- Do wszystkich próbek dodać po: 1 ml 1% wodnego roztworu nitroprusydku sodu, następnie siarczanu amonu *in subst.* do nasycenia roztworu, po czym próby zalkalizować amoniakiem pod dygestorium.
- Pojawienie się czerwono-fioletowego zabarwienia prób oznacza dodatni wynik na obecność grup tiolowych.
- Porównać i zinterpretować wyniki w poszczególnych próbach.

### ODCZYNNIKI

10% roztwór  $\text{NaNO}_2$ ; 2 M roztwór  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ; 1% wodny roztwór glicyny; 1% wodny roztwór lizyny; 0,1% wodny roztwór argininy; 0,5% wodny roztwór histydyny; 1% wodny roztwór proliny; 1% roztwór tyrozyny w 0,1 M HCl; 1% roztwór fenyloalaniny w 0,1 M HCl; 1% roztwór tryptofanu w 0,1 M HCl; 0,1% roztwór leucyny w 0,05 M HCl; 1% roztwór cysteiny w 0,1M HCl; 1% roztwór cystyny w 0,1 M HCl; 1% roztwór metioniny; 1% wodny roztwór białka; 20-krotnie rozcieńczone białko jaja kurzego (białko jaja roztrzepywać bagietką szklaną, dodać dwudziestokrotną objętość wody, po maksymalnym roztrzepa-

niu, przesączyć); 2% roztwór albuminy w 0,9% NaCl; 2% roztwór żelatyny w 0,9% NaCl; surowica bydlęca 10-krotnie rozcieńczona 0,9% NaCl; 1% roztwór glutationu; stężony HNO<sub>3</sub>; stężony H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 20% NaOH; 10% NaOH; stężony NH<sub>3</sub>aq.; aldehyd mrówkowy (formalina) lub kwas glioksalowy (sporządzony w następujący sposób: a) przygotować zawiesinę magnezową: 10 g pyłu magnezowego dodać do 200 ml H<sub>2</sub>O w 2-litrowej zlewce; b) osobno przygotować nasycony roztwór kwasu szczawowego – 25 g kwasu szczawowego do 250 ml H<sub>2</sub>O; roztwór „b” wlać do zawiesiny „a” mieszaninę szybko schłodzić, przesączyć przez sącdek z bibuły i odrzucić osad szczawianu magnezu); 0,2% etanolowy roztwór α-naftolu; roztwór NaOBr (sporządzony następująco: do 100 ml 5% NaOH dodać 0,62 ml bromu – przed użyciem roztwór ten rozcieńczyć 10-krotnie 5% NaOH); 40% roztwór mocznika; 0,5% roztwór kwasu sulfanilowego w 2 M HCl; 0,5% roztwór NaNO<sub>2</sub>; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> *in subst.*; papierki wskaźnikowe; 0,1% roztwór ninhydryny w 50% etanolu; 0,25 M roztwór octanu ołowiu (II); 1% wodny roztwór nitroprusydku sodu; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> *in subst.*

## NOTATKI