

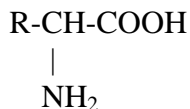
Лабораторна робота № 8

Тема: Дослідження властивостей білка, біуретова, ксантопротейінова реакції, реакція Фоля

I. Теоретична частина

Білки – біоорганічні високомолекулярні сполуки, молекули яких являють собою гетерополімери, побудовані із залишків амінокислот, об'єднаних кислотоамідними (пептидними) зв'язками (-CO-NH-).

Білки, або протеїни, складаються з **амінокислот**, узагальнена формула яких має вигляд:



Наявність в амінокислотах карбоксильної групи (-COOH) та аміногрупи (-NH₂) надає їм як кислотних, так і основних властивостей, тобто амінокислоти проявляють амфотерність.

До складу білків найчастіше входить 20 *L*- α -амінокислот, а взагалі відомо більше 200 індивідуальних амінокислот, що одержані з природної сировини і синтетичними методами. Деякі амінокислоти в організмі людини не синтезуються і їх поповнення в організмі відбувається лише завдяки надходженню з їжею, тому вони вважаються незамінними (гістидин, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, фенілаланін, треонін, триптофан, валін і аргінін).

Кольорові реакції на білки. Кольорові реакції на білки є якісними на функціональні групи радикалів амінокислот, які входять до складу білків. Ці специфічні реакції часто використовують у лабораторній практиці для ідентифікації та кількісного визначення білків і окремих амінокислот.

Існує два типи кольорових реакцій:

- а) універсальні - біуретова (на всі білки) та нінгідринова (на всі α -амінокислоти);
- б) специфічні - тільки на окремі амінокислоти як у молекулах білків, так і в розчинах окремих амінокислот.

II. Практична частина

Дослід 1. Біуретова реакція на білки.

Принцип методу. Білки та пептиди в лужному середовищі за присутності солей міді дають біуретову реакцію. Реакція дістала свою назву від біурету (похідне від сечовини). Хімічна формула біурету H₂N-CO-NH-CO-NH₂, як видно він, як і молекули білків, містить пептидний зв'язок (-CO-NH-). Біурет синтезується із сечовини і дає у ході цієї реакції те саме забарвлення, що й вона.

За допомогою біуретової реакції виявляють у сполуках пептидний зв'язок, який утворюється з α -амінокислот за рахунок реакції між карбоксильною групою (-COOH) однієї кислоти з аміногрупою (-NH₂) іншої, з виділенням молекули води. Вільні амінокислоти такої реакції не дають.

Біуретова реакція характерна тільки для тих речовин, які містять не менше, ніж 2 пептидні зв'язки. У сильнолужному середовищі білки за присутності купруму сульфату (CuSO₄) утворюють комплексні сполуки купруму з пептидними групами, забарвлені у червоно-фіолетовий або синьо-фіолетовий колір. Забарвлення білково-мідного комплексу залежить від довжини пептидного ланцюга. Дипептиди дають синій комплекс, трипептиди - фіолетовий, а пептиди з довжиною ланцюга від чотирьох амінокислотних залишків і більше дають червоний комплекс. Так, синьо-фіолетове забарвлення дають розчини білків, а

пептони - продукти неповного гідролізу білків - рожеве або червоне забарвлення.

Матеріальне забезпечення: 1% розчин білка, 10% розчин натрію гідроксиду (NaOH), 0,5% розчин купруму сульфату (CuSO₄), пробірки, піпетки.

Хід роботи. До 2-3 мл розчину білка додають стільки ж 10% розчину натрію гідроксиду та декілька крапель 0,5% розчину купруму сульфату. При цьому спочатку утворюється рожеве забарвлення, яке у разі додавання розчину купруму сульфату переходить у червоне, фіолетове і синє.

Цю реакцію використовують у лабораторній практиці для виявлення білків у біологічних рідинах.

Пояснити отримані результати, зробити висновок, результати записати в робочий зошит.

Дослід 2. Ксантопротеїнова реакція.

Принцип методу. Ксантопротеїнова реакція характерна для ароматичних амінокислот, у яких під дією нітратної кислоти бензольне ядро нітрується з утворенням нітросполук жовтого кольору. У разі додавання амоніаку (аміаку) колір переходить в оранжевий. Реакція дуже чутлива.

Матеріальне забезпечення: 1% розчин білка, 20% розчин нітратної кислоти, 20 % розчин натрію гідроксиду, газовий пальник, пробірки, піпетки.

Хід роботи. Цю реакцію дають білки, до складу яких входять амінокислоти з бензольним кільцем (тирозин, фенілаланін, триптофан).

До 2 мл досліджуваного розчину білка додають 0,5 мл 20% розчину нітратної кислоти та кип'ятять протягом 30 с. Утворюється жовтий осад. У разі додавання до розчину 2-3 мл 20% натрію гідроксиду жовте забарвлення переходить в оранжеве.

Пояснити отримані результати, зробити висновок, результати записати в робочий зошит.

Дослід 3. Реакції на амінокислоти, що містять сірку. Реакція Фоля.

Принцип методу. До складу більшості білків входять сірковмісні амінокислоти. Реакція Фоля виявляє в білках амінокислоти цистеїн і цистин, що містять слабозв'язану сірку. Амінокислота метіонін не дає цієї реакції, оскільки в ній сірка зв'язана дуже міцно.

Реакція полягає в тому, що під час кип'ятіння білка з основами останні руйнують цистин і цистеїн, відщеплюючи від них сірку, яка виділяється у вигляді сірководню. Іони плюмбуму утворюють із сірководнем чорний або бурий (залежно від концентрації білка і сірковмісних амінокислот) осад плюмбуму сульфід.

Матеріальне забезпечення: 1% розчин білка, 30% розчин натрію гідроксиду (NaOH), 5% розчин плюмбуму ацетату (C₄H₆O₄Pb•3H₂O), 5% розчин натрію нітропрусиду (Na₂[Fe(CN)₅(NO)]•2H₂O), газовий пальник, пробірки, піпетки.

Хід роботи.

1. Реакція з плюмбуму ацетатом (реакція Фоля).

У пробірку вміщують 5-6 крапель розчину досліджуваного білка, додають 4-5 крапель 30% розчину їдкого натру та обережно нагрівають протягом 2 хв. Після охолодження додають 1 краплю 5% розчину плюмбуму ацетату. Рідина забарвлюється у темно-коричневий колір.

2. Реакція з натрію нітропрусидом.

У пробірку вміщують 5-6 крапель розчину досліджуваного білка, додають 4-5 крапель 30% розчину їдкого натру та обережно нагрівають протягом 1-2 хв. Після охолодження додають у кожен пробірку по 1-2 краплі розчину натрію нітропрусиду. Вміст пробірок забарвлюється у червоно-коричневий колір.

Пояснити отримані результати, зробити висновок, результати записати в робочий зошит.

Дослід 4. Кількісне визначення білку в сироватці крові біуретовим методом.

Принцип методу. Білки в лужному середовищі реагують із купрум(II) сульфатом, при цьому утворюються сполуки, забарвлені у фіолетовий колір (біуретова реакція).

Матеріальне забезпечення: сироватка крові, калій-натрій виннокислий, купрум(II) сульфат, 0,9% розчин натрію хлориду, 10% розчин натрію гідроксиду, мірні пробірки, піпетки на 1, 2 і 10 мл, фотоелектроколориметр (ФЕК), біуретовий реактив (беруть 0,15 г $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,6 г калій-натрію виннокислового (інша назва – сегнетова сіль) і 50 мл води, суміш перемішують, додають 30 мл 10% розчину натрію гідроксиду і 0,1 г калію йодиду, доводять водою до об'єму 100 мл, зберігають у холодильнику в запарафінованому посуді).

Хід роботи. У першу пробірку вміщують 0,1 мл 0,9% розчину хлориду натрію (контроль), у другу - 0,1 мл стандартного розчину білка (50 г/л), у третю, четверту і п'яту пробірки — по 0,1 мл дослідного розчину білка (задачі). В усі пробірки вливають по 5 мл біуретового реактиву, перемішують і через 30 хв визначають екстинкцію (пропускання світла) за допомогою ФЕК у кюветах на 10 мм при зеленому світлофільтрі $\lambda=540\text{-}560$ нм (або при червоному світлофільтрі $\lambda=750$ нм) проти контрольного розчину.

Розрахунок проводять за формулою:

$$X = \frac{(A \times B)}{C},$$

де X — концентрація речовин у дослідній пробі, г/л; A — концентрація речовин у стандартному розчині; B — екстинкція дослідного розчину; C — екстинкція стандартного розчину білка.

Пояснити отримані результати, зробити висновок, результати записати в робочий зошит.

Питання для контролю за виконанням лабораторної роботи

1. Які Ви знаєте основні кольорові реакції на білки?
2. Чому за допомогою біуретової реакції не можна виявити окремі амінокислоти?
3. Якими якісними реакціями виявляють циклічні амінокислоти?
4. Для виявлення яких амінокислот у білковому гідролізаті служить ксантопротеїнова реакція? Чим зумовлене жовте забарвлення?