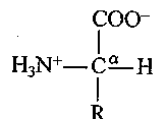


BUDOWA I WŁAŚCIWOŚCI AMINOKWASÓW

1.1. Aminokwasy białkowe

Aminokwasy są związkami organicznymi, zawierającymi co najmniej jedną grupę karboksylową COOH oraz co najmniej jedną grupę aminową NH₂. W zależności od położenia grupy aminowej względem karboksylowej wyróżniamy α-, β-, i γ-aminokwasy. W przyrodzie występuje ponad 300 różnych aminokwasów, ale tylko 20 z nich wchodzi w skład białek. Wszystkie aminokwasy białkowe są α-aminokwasami (tzn. grupa aminowa występuje przy pierwszym atomie węgla oznaczonym jako α). Wyjątek stanowi prolina. Ogólna struktura chemiczna α-aminokwasów została przedstawiona na rys. 1.1.



Rys. 1.1. Wzór ogólny α-aminokwasów

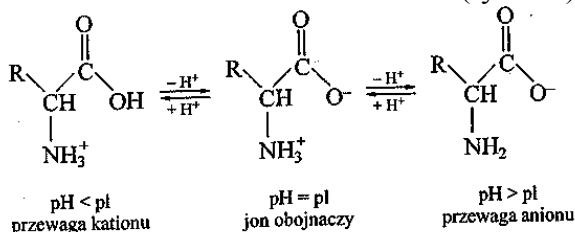
Wśród białkowych aminokwasów tylko glicyna (R = H) jest achiralna. Wszystkie pozostałe aminokwasy mają cztery różne podstawniki przy węglu α (asymetrycznym), są zatem cząsteczkami chiralnymi, mogącymi występować jako enancjomery L i D, które są fizycznie i chemicznie nierozróżnialne, z wyjątkiem różnic w kierunku skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego.

Większość białkowych aminokwasów należy do szeregu aldehydu L-glicerynowego.

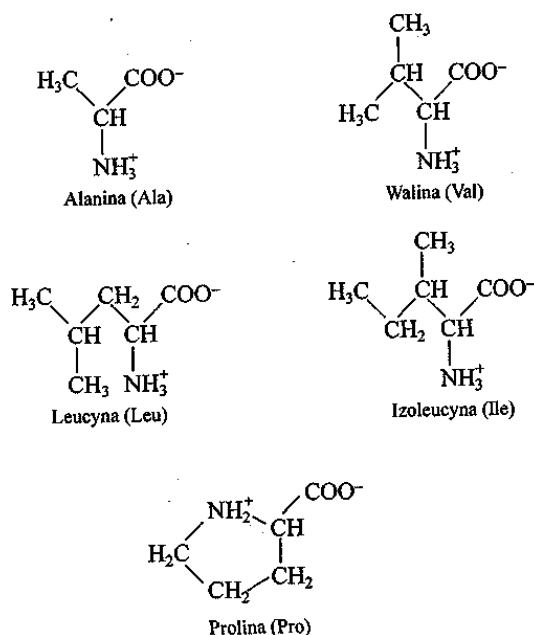
D-aminokwasy (nieprzyswajalne przez organizmy) występują w stanie wolnym w ścianie komórkowej bakterii oraz w antybiotykach peptydowych.

Synteza chemiczna prowadzi do powstawania racematów, czyli mieszanin o jednakowej zawartości stereoisomerów L i D. Mieszanina taka nie skręca płaszczyzny światła spolaryzowanego w wyniku kompensacji obu skręcalności.

α-aminokwasy wykazują właściwości amfoteryczne (zachowują się jak kwasy i jak zasady). W roztworach wodnych występuje równowaga kwasowo-zasadowa aminokwasów (rys. 1.2).



Rys. 1.2. Równowaga kwasowo-zasadowa aminokwasów



Rys. 1.3. Wzory strukturalne aminokwasów alifatycznych obojętnych

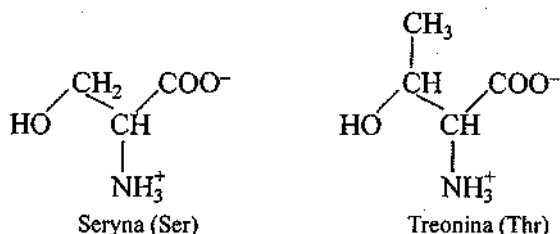
Sumaryczny ładunek cząsteczki aminokwasu zależy od pH środowiska. Wartość pK grup ulegających dysocjacji można wyznaczyć z krzywej miareczkowania. W punkcie izoelektrycznym pI dla danego aminokwasu maksymalna liczba jego cząsteczek występuje w postaci jonów obojnych (sumaryczny ładunek równa się zeru). Wartości pI dla większości aminokwasów białkowych są bliskie 6. Wyższe pI mają aminokwasy zasadowe: arginina — 10,76; histydyna — 7,59 i lizyna — 9,74, natomiast aminokwasy kwasowe charakteryzują się mniejszymi wartościami pI: kwas asparaginowy — 2,77; kwas glutaminowy — 3,22. Stosuje się różne kryteria klasyfikacji aminokwasów. Biorąc pod uwagę budowę łańcuchów bocznych, aminokwasy można podzielić na: alifatyczne obojętne, alifatyczne hydroksyaminokwasy, siarkowe, zasadowe, kwasowe i ich monoamidy oraz aminokwasy z pierścieniem aromatycznym. Poza wymienionymi grupami podziału znajduje się pozbawiona łańcucha bocznego glicyna.

1.1.1. Aminokwasy alifatyczne obojętne

Do tej grupy należą: alanina, walina, leucyna, izoleucyna oraz prolina, których wzory strukturalne przedstawione są na rys. 1.3. Aminokwasy te zawierają alifatyczny, niepolarny, a zatem hydrofobowy łańcuch boczny (R).

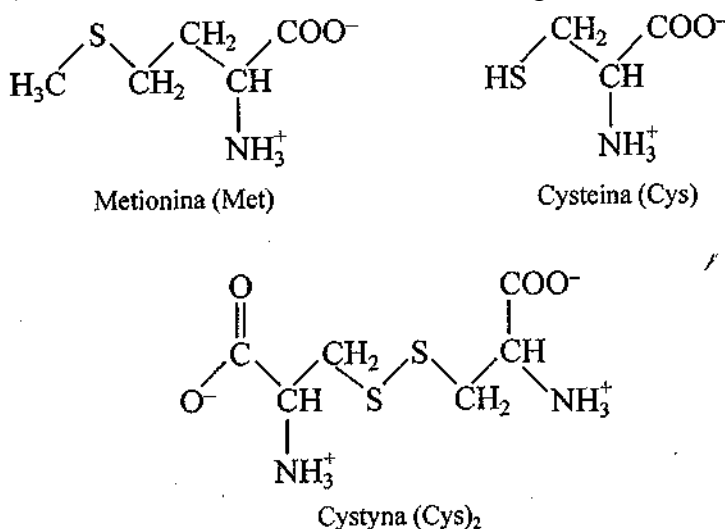
1.1.2. Alifatyczne hydroksyaminokwasy

Alifatyczne hydroksyaminokwasy to seryna i treonina (rys. 1.4). Ich łańcuchy boczne są neutralne (pozbawione ładunku) i polarne dzięki obecności grupy hydroksylowej.



1.1.3. Aminokwasy siarkowe

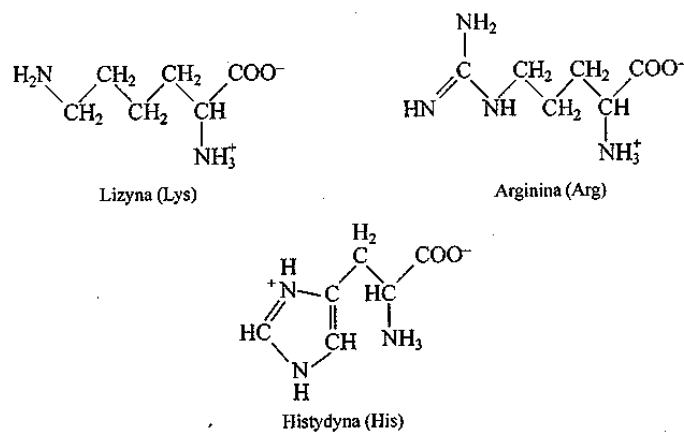
Do aminokwasów siarkowych (rys. 1.5) należą: cysteina (zawierająca grupę tiolową SH) i metionina (zawierająca grupę tiometylową SCH₃). Cysteina pod wpływem łagodnych czynników utleniających dimeryzuje do cystyny (Cys)₂ z utworzeniem wiązania disiarczkowego.



Rys. 1.5. Aminokwasy siarkowe

1.1.4. Aminokwasy zasadowe

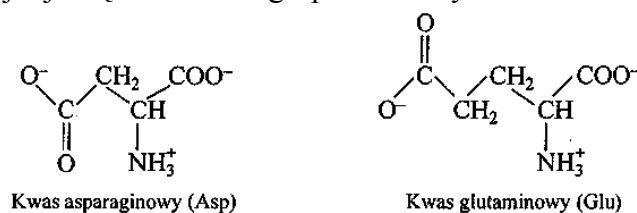
Aminokwasami zasadowymi (rys. 1.6) są: lizyna (zawierająca na końcu łańcucha bocznego grupę aminową), arginina (zawierająca grupę guanidynową) oraz histydyna (mająca silnie zasadowy pierścień imidazolowy).



Rys. 1.6. Aminokwasy zasadowe

1.1.5. Aminokwasy kwasowe

Do aminokwasów kwasowych (rys. 1.7) zalicza się kwas asparaginowy i kwas glutaminowy. W łańcuchach bocznych tych aminokwasów znajduje się dodatkowa grupa karboksylowa.



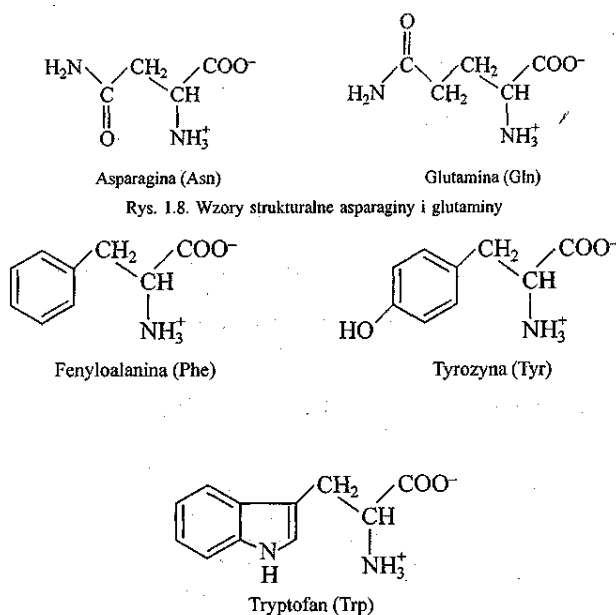
Rys. 1.7. Aminokwasy kwasowe

1.1.6. Monoamidy kwasu asparaginowego i glutaminowego

Amidami kwasów asparaginowego i glutaminowego są asparagina i glutamina.

1.1.7. Aminokwasy z pierścieniem aromatycznym

Do tej grupy należą aminokwasy zawierające podstawnik aromatyczny (rys. 1.9), czyli: fenyloalanina, tyrozyna i tryptofan. Obecność pierścienia aromatycznego warunkuje zdolność do pochłaniania promieniowania UV w zakresie 260-290 nm (właściwość ta jest wykorzystywana w metodach ilościowego oznaczania białka). Tyrozyna zawiera dodatkowo grupę hydroksylową w pierścieniu. Tryptofan jest aminokwasem heteroaromatycznym.



Rys. 1.9. Wzory strukturalne fenyloalaniny, tyrozyny, tryptofanu

1.2. Wykonanie ćwiczenia

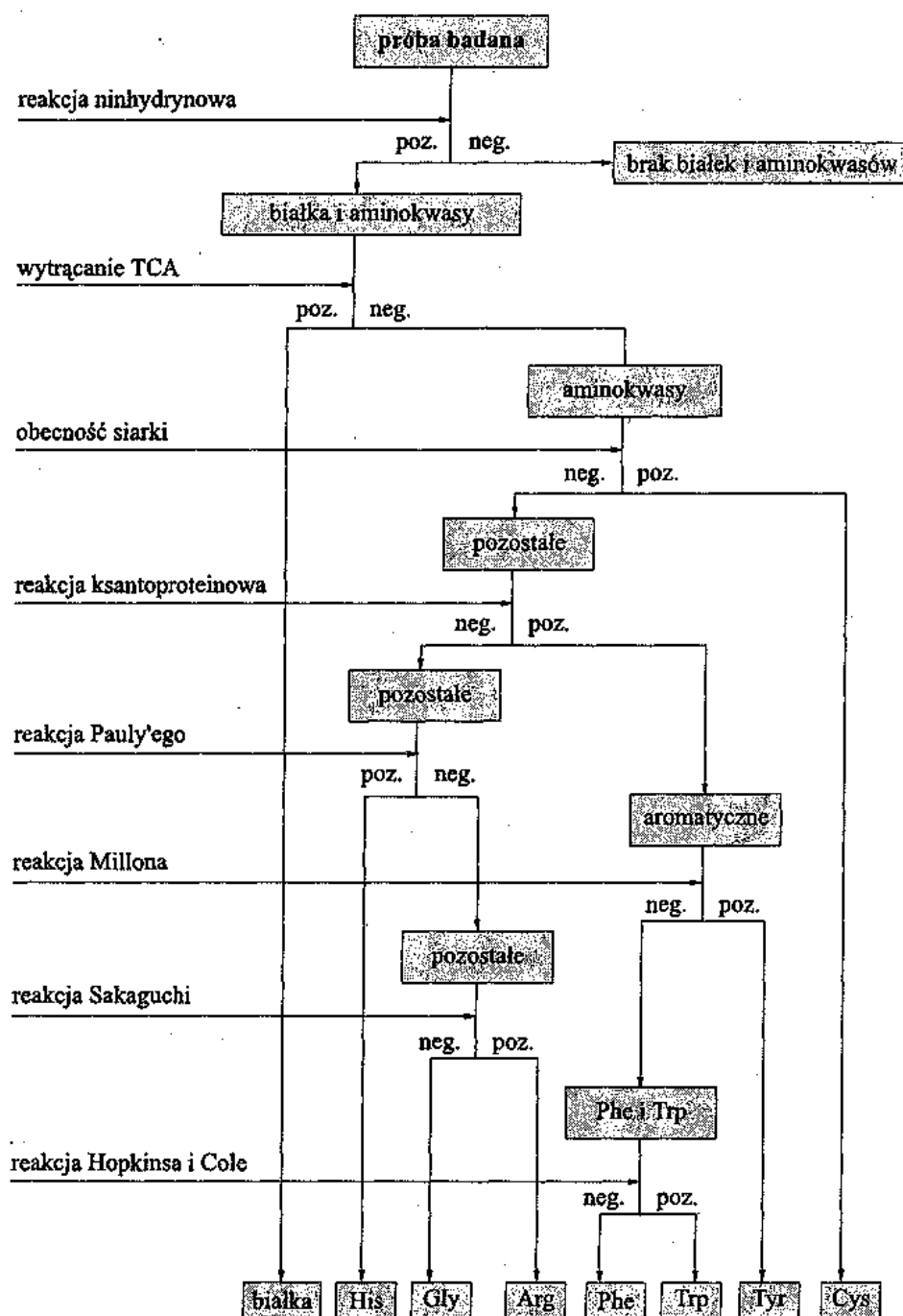
1.2.1. Reakcje ogólne aminokwasów

Najbardziej charakterystyczną reakcją barwną α -aminokwasów jest reakcja z ninhydriną. Jest ona uwarunkowana równoczesną obecnością wolnej grupy aminowej i karboksylowej przy tym samym atomie węgla.

W reakcjach barwnych uwarunkowanych budową łańcucha bocznego aminokwasu, pozytywne wyniki dają również związki nie będące aminokwasami, których cząsteczki zawierają takie same lub podobne grupy funkcyjne.

Białka, zawierające z reguły wszystkie rodzaje aminokwasów, dają również pozytywne odczyny w reakcjach na łańcuchy boczne poszczególnych aminokwasów.

Schemat postępowania w celu identyfikacji aminokwasów przy wykorzystaniu barwnych reakcji wskaźnikowych przedstawiono na rys. 1.10.



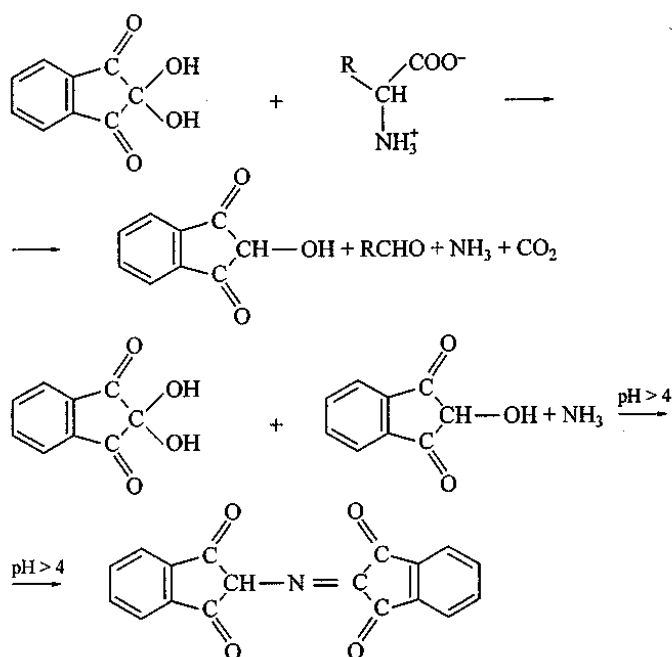
Rys. 1.10. Schemat identyfikacji aminokwasów za pomocą barwnych reakcji wskaźnikowych

Odczynniki i aparatura

- 1) 1% roztwory aminokwasów: glicyny (Gly), cystyny ([Cys]₂), fenyloalaniny (Phe), tyrozyny (Tyr), tryptofanu (Trp), histydyny (His), argininy (Arg);
- 2) 1% roztwór białka (albuminy lub kazeiny);
- 3) 0,2M bufor fosforanowy pH 6,0;
- 4) 6M NaOH;
- 5) 10% NaOH;
- 6) 1% α-naftol w etanolu;
- 7) 1% NaBrO;
- 8) 20% kwas trichlorooctowy (TCA);
- 9) HNO₃ stężony;
- 10) H₂SO₄ stężony;
- 11) 0,5% roztwór CuSO₄;
- 12) 2% roztwór octanu ołowiu(H) (**Uwaga! Silna trucizna!**);
- 13) odczynnik Miliona: 10 g rtęci metalicznej rozpuścić w 14 ml stężonego HNO₃ i rozcieńczyć dwukrotną objętością wody (**Uwaga! Silna trucizna!**);
- 14) roztwór kwasu glioksalowego: roztwór **a** - 1g pyłu magnezowego zalać 20 ml wody; roztwór **b** — 2,5 g kwasu szczawiowego rozpuścić w 25 ml wody; w celu sporządzenia roztworu kwasu glioksalowego należy do roztworu **b** wlać roztwór **a**, po czym ochłodzić, przesączyć, dodać 2,5 ml lodowatego kwasu octowego i dopełnić wodą do 100 ml;
- 15) 5% roztwór NaNO₂;
- 16) 1% roztwór kwasu sulfanilowego w 1 M HCl;
- 17) 10% roztwór Na₂CO₃;
- 18) 1% roztwór ninhydryny w etanolu (96%);
- 19) probówki chemiczne 20 ml (20 szt.);
- 20) pipety serologiczne o pojemności 5 ml (2 szt.);
- 21) łaźnia wodna ze statywem do probówek;
- 22) mikropalnik;
- 23) łapy drewniane (2 szt.).

A. Reakcja z ninhydryną

Ninhydryna (wodzian triketohydryndenu) w reakcji z amoniakiem i aminami (również z białkami) daje produkty barwne (rys. 1.11).



Rys. 1.11. Reakcja aminokwasu z ninhydryną

W przypadku reakcji z α -aminokwasami istotną rolę odgrywa grupa karboksylową. Aminokwasy pod wpływem ninhydryny ulegają utlenieniu do amoniaku, dwutlenku węgla i aldehydu. W roztworach o pH wyższym niż 4, amoniak reaguje dalej z ninhydryną i z utworzoną hydryndantyną, dając związek o barwie fioletowej (purpura Rühemana), której natężenie jest proporcjonalne do zawartości azotu aminowego aminokwasu.

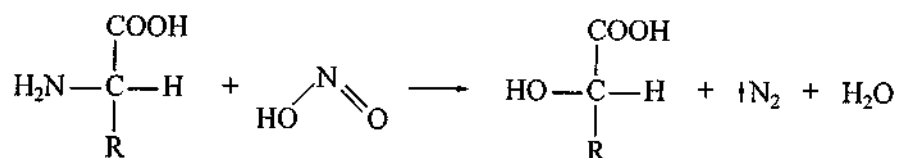
Reakcja ta znalazła liczne zastosowania zarówno w próbach jakościowych jak i w metodach ilościowego oznaczania aminokwasów. Dodatni wynik reakcji z ninhydryną (oprócz aminokwasów, peptydów i białek) dają także sole amonowe, aminocukry i amoniak. Z tego względu oznaczana próba musi być wolna od tych związków.

Wykonanie

Do próbówki należy odpipetować 1 ml buforu fosforanowego o pH 6, dodać 5 kropli roztworu badanego, 2 krople roztworu ninhydryny i ogrzewać przez kilka minut we wrzącej łaźni wodnej. Wykonać próby z roztworem dowolnego aminokwasu, białka i z wodą destylowaną. Zanotować wyniki.

B. Reakcja z kwasem azotowym(III)

Aminokwasy wydzielają azot cząsteczkowy w reakcji z kwasem azotowym(III) w wyniku deaminacji (rys. 1.12). Reakcję tę wykorzystuje się w gazometrycznej metodzie ilościowego oznaczania α -aminokwasów metodą van Slyke'a.



Rys. 1.12. Schemat reakcji aminokwasów z kwasem azotowym(III)

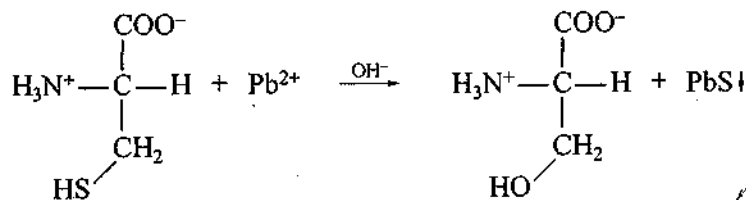
Wykonanie

Do 2 ml 10% roztworu NaNO_2 dodać 2 ml 2 M roztworu CH_3COOH i 0,5 ml 0,5% roztworu glicyny. Wydzielanie się pęcherzyków gazu świadczy o powstawaniu azotu cząsteczkowego.

1.2.2. Reakcje charakterystyczne niektórych aminokwasów

A. Reakcja na obecność aminokwasów siarkowych

Związki posiadające grupy sulfhydrylowe (utlenione lub zredukowane), jak cysteina i cystyna, ogrzewane w środowisku zasadowym ulegają rozkładowi, a powstały anion siarczkowy daje z solami ołowiu(II) czarny lub szary osad siarczku ołowiu(II). Metionina, której atom siarki uczestniczy w utworzeniu wiązania tioeterowego, nie daje tej reakcji. Schematyczny przebieg reakcji cysteiny z jonami ołowiu(II) przedstawiono na rys. 1.13.



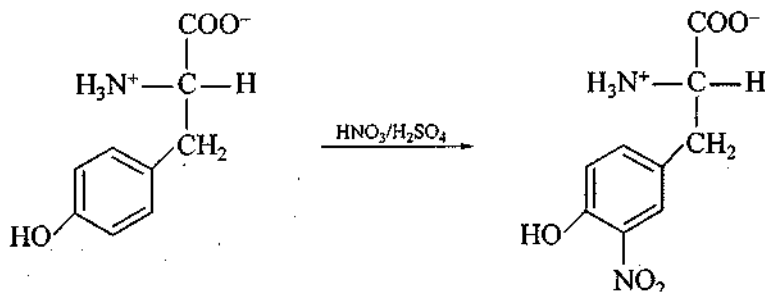
Rys. 1.13. Schemat przebiegu reakcji cysteiny z jonami ołowiu(II)

Wykonanie

Do 2 kropli roztworu badanego dodać 4 krople 6 M NaOH i 1 kroplę roztworu $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$. Próbkę podgrzać. Wykonać próby z roztworami: a) cystyny, b) innego aminokwasu, c) białka. Zanotować wyniki.

B. Reakcja ksantoproteinowa na obecność pierścienia benzenowego

Pierścienie benzenowe różnych związków ulegają nitrowaniu (rys. 1.14) pod wpływem tzw. mieszaniny nitrującej (stężony kwas azotowy i stężony kwas siarkowy w stosunku 1:3). Produkty nitrowania mają barwę od jasnożółtej do brązowej, znacznie intensywniejszą po zalkalizowaniu próby. Reakcja zachodzi z różną szybkością i wydajnością w zależności od budowy związku i warunków reakcji. Tyrozyna, tryptofan i białka zawierające te aminokwasy ulegają łatwo nitrowaniu, natomiast fenyloalanina wymaga intensywnego ogrzewania.



Rys. 1.14. Schemat reakcji ksantoproteinowej z udziałem tyrozyny

Wykonanie

Do około 0,5 ml roztworu badanego dodać 2 krople stężonego kwasu azotowego i 6 kropli stężonego kwasu siarkowego. Mieszaninę ogrzewać przez kilka minut we wrzącej łaźni wodnej, a następnie ostudzić i ostrożnie dodać 2 ml 6 M roztworu NaOH (włot probówki skierować pod wyciąg). Gdyby zabarwienie nie wystąpiło, reakcję powtórzyć, ogrzewając próbę w płomieniu mikropalnika do momentu pojawienia się brązowych par tlenków azotu (kilka minut). Wykonać próby z roztworami: tyrozyny, tryptofanu, glicyny i białka. Zanotować wyniki.

C. Reakcja Miliona na obecność fenoli

Związki zawierające grupy fenolowe tworzą w środowisku kwasu azotowego w temperaturze 40°C czerwone kompleksy nitrofenoli z jonami rtęci(II) i rtęci(I). Jest to reakcja charakterystyczna dla monofenoli, a więc spośród aminokwasów tylko dla tyrozyny. Służy do ilościowego oznaczania tyrozyny metodą fotometryczną.

Wykonanie

Do 4 kropli roztworu badanego dodać 2 krople odczynnika Miliona i ogrzać w łaźni wodnej. Wykonać próby z roztworami: tyrozyny, innego aminokwasu i białka. Zanotować wyniki.

D. Reakcja Hopkinsa i Cole na obecność tryptofanu

Pochodne indolu tworzą w środowisku kwaśnym barwne produkty kondensacji. Hopkins i Cole zastosowali do tej reakcji kwas glioksalowy (OHC—COOH). W obecności kwasu glioksalowego dwa pierścienie indolowe tryptofanu ulegają kondensacji z aldehydem, dając barwny produkt.

Wykonanie

Do 5 kropli badanego roztworu dodać 2 krople roztworu kwasu glioksalowego, a następnie wprowadzić ostrożnie po wewnętrznej ściance probówki około 0,5 ml stężonego kwasu siarkowego w taki sposób, aby nie wymieszać kwasu z roztworem wodnym. W obecności pochodnych indolu na granicy faz powstanie fioletowe zabarwienie. Wykonać próby z roztworami: tryptofanu, innego aminokwasu i białka. Zanotować wyniki.

E. Reakcja Pauly'ego na obecność histydyny

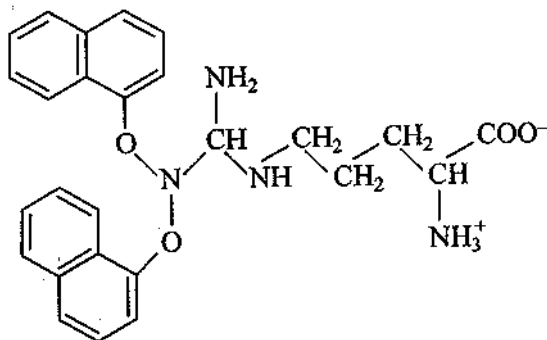
Pochodne imidazolu, jak również fenole i aminy aromatyczne, dają z solami diazoniowymi w środowisku zasadowym barwne produkty sprzęgania. Pauly zastosował w tym celu kwas diazobenzenosulfonowy, który przygotowuje się bezpośrednio przed użyciem przez diazowanie kwasu sulfanilowego kwasem azotowym(III) na zimno. Histydyna, tyrozyna i białka dają w reakcji Pauly'ego jednakowe, krwistoczerwone zabarwienie.

Wykonanie

Zmieszać w probówce równe objętości po około 2 ml roztworów kwasu sulfanilowego i azotynu sodu i zawartość probówki wytrząsać przez kilka minut, chłodząc ją jednocześnie pod bieżącą wodą. Następnie do 2 kropli diazowanego odczynnika (w innej probówce) dodać 2 krople roztworu badanego i 4 krople roztworu Na_2CO_3 . Wykonać próby z roztworami: histydyny, tyrozyny, innego aminokwasu i białka. Zanotować wyniki.

F. Reakcja na obecność argininy (Sakaguchi)

Grupa guanidynowa argininy z α -naftolem i bromianem sodu w zasadowym roztworze daje czerwony kompleks (rys. 1.15).



Rys. 1.15. Budowa kompleksu argininy z α -naftolem

Wykonanie

Do 1 ml badanego roztworu (glicyny, argininy i białka) dodać kolejno: 0,5 ml 10% roztworu NaOH, 2 krople świeżo przygotowanego 1% roztworu α -naftolu w etanolu oraz kroplę roztworu NaBrO i wymieszać zawartość. Zanotować wyniki.

Opracowanie wyników

Uzyskane podczas wykonanych doświadczeń wyniki należy przedstawić w formie zestawienia (tab. 1.1).

Uwaga! Wszystkie reakcje należy wykonywać dla roztworu badanego (otrzymanego od prowadzącego zajęcia) oraz dla odpowiednich roztworów wzorcowych.

Tabela 1.1

Reakcja	Gly (Cys) ₂	Phe	...	...	Próbka badana
1.2.1. z ninhydryną					
1.2.2. ...					
... ..					

1.3. Pytania i zadania

- Dokonaj klasyfikacji aminokwasów na podstawie różnych kryteriów ich podziału (np. białkowe/niebiałkowe, egzogenne/endogenne, budowa łańcucha bocznego, polarność, charakter chemiczny: obojętne/kwasowe/zasadowe).
- Narysuj formę L i D wskazanego aminokwasu.
- Wyjaśnij, co to jest punkt izoelektryczny. Podaj przykłady aminokwasów znacznie różniących się od siebie wartościami pI.
- Narysuj wzory aminokwasów: chiralnego i achiralnego. Podaj ich nazwy i skróty trzyliterowe.
- Opisz reakcję wykorzystywaną w ilościowym oznaczaniu aminokwasów metodą van Slyke'a.
- Na czym polega reakcja Pauly'ego i jakie aminokwasy można przy jej użyciu wykrywać.
- Zaproponuj schemat postępowania służący do wykrycia tryptofanu w próbce badanej.