

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ЕЛЕЦКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. И.А. БУНИНА»

**О. А. ПАХОМОВА, Н. Я. МОКШИНА**

# **ПРАКТИКУМ ПО АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКОВ**

**Учебное пособие**

*Рекомендовано УМО РАЕ по классическому университетскому и техническому образованию в качестве учебного пособия для студентов высшего профессионального образования, обучающихся по направлениям подготовки: 280700 - «Техносферная безопасность», 110800 - «Агроинженерия», 110900 - «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции», 110400 - «Агрономия», 141108 - «Специальные системы жизнеобеспечения», 200106 - «Применение и эксплуатация средств и систем специального мониторинга»*

УДК 543  
ББК 24.4  
П 12

*Печатается по решению редакционно-издательского совета  
Елецкого государственного университета им. И.А. Бунина  
от 16.01.2015, протокол №1*

*Р е ц е н з е н т ы:*

*Нифталиев С.И.* , доктор химических наук, профессор, (ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»,  
*Воржжев В.Ф.*, кандидат технических наук, доцент (ФГБОУ ВПО «Елецкий государственный университет им. И.А. Бунина)

**О.А. Пахомова, Н.Я. Мокшина**

**П 12** Практикум по аналитической химии аминокислот и белков: учебное пособие. – Елец: Елецкий государственный университет им. И.А. Бунина, 2015. – 71 с.  
ISBN 978-5-94809-776-3

Учебное пособие разработано в соответствии с ФГОС для обучающихся по направлениям: 110800 «Агроинженерия», 110900 «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции, 110400» «Агрономия», 280700 «Техносферная безопасность», 141108 «Специальные системы жизнеобеспечения», 200106 «Применение и эксплуатация средств и систем специального мониторинга».

УДК 543  
ББК 24.4

ISBN 978-5-94809-776-3

© Елецкий государственный  
университет им. И.А. Бунина, 2015

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
I.    Теоретическая часть.....	6
1.1.  Классификация аминокислот.....	6
1.2.  Методы разделения и определения аминокислот.....	12
1.3.  Классификация белков.....	18
1.4.  Методы исследования белков.....	23
II.   Практическая часть.....	28
<i>Лабораторная работа 1. Качественные реакции для определения аминокислот.....</i>	<i>28</i>
<i>Лабораторная работа 2. Качественные реакции для определения белков.....</i>	<i>31</i>
<i>Лабораторная работа 3. Кондуктометрическое титрование. Определение глицина методом высокочастотного титрования.....</i>	<i>34</i>
<i>Лабораторная работа 4. Определение смеси аминокислот в среде ледяной уксусной кислоты методом потенциометрического титрования.....</i>	<i>36</i>
<i>Лабораторная работа 5. Вольтамперометрическое определение тирозина на графитовом электроде.....</i>	<i>39</i>
<i>Лабораторная работа 6. Количественное определение аминокислот в белковом гидролизате методом бумажной хроматографии.....</i>	<i>41</i>
<i>Лабораторная работа 7. Количественное определение аспарагиновой, глутаминовой аминокислот и валина в белковом гидролизате методом бумажной хроматографии.....</i>	<i>43</i>
<i>Лабораторная работа 8. Фотометрическое титрование глицина в среде ледяной уксусной кислоты.....</i>	<i>46</i>
<i>Лабораторная работа 9. Раздельное спектрофотометрическое определение ароматических аминокислот в водных растворах.....</i>	<i>49</i>
<i>Лабораторная работа 10. Исследование структуры сывороточного альбумина с помощью ИК спектроскопии.....</i>	<i>52</i>
<i>Лабораторная работа 11. Определение лизина в водном растворе методом потенциометрического титрования.....</i>	<i>54</i>
<i>Лабораторная работа 12. Экстракционно-кондуктометрическое определение валина.....</i>	<i>56</i>
<i>Лабораторная работа 13. Анализ фармацевтического препарата «Метионин».....</i>	<i>58</i>
<i>Лабораторная работа 14. Фотометрическое определение белка с помощью метода Лоури.....</i>	<i>61</i>
Обработка результатов методом математической статистики.....	62
Вопросы для самоконтроля.....	66
Список литературы.....	69

## ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших задач клинической биохимии и медицины является анализ биологически активных компонентов физиологических жидкостей для правильной диагностики заболеваний, контроля хода их лечения, выбора лекарственных препаратов и их дозировки, регулирования биохимических процессов, происходящих в организме. Приоритетное направление развития науки и технологий в современных условиях – создание новых форм лекарственных средств на основе биологически активных веществ.

Получение аминокислот, содержащихся в фармацевтических препаратах, перспективно и востребовано, комплексы аминокислот с витаминами, углеводами и липидами широко применяют при заболеваниях большинства систем организма. Эффективность действия таких препаратов основана на анаболическом и антиоксидантом эффекте, стимуляции энергообеспечения и регенерации. Использование свободных аминокислот, в отличие от белка, не требует энергетических затрат от организма на расщепление при всасывании. Уровень свободных аминокислот в крови возрастает быстрее, чем при использовании белка или декстранов. Создание новых, совершенствование и развитие известных способов концентрирования и разделения аминокислот позволяет расширить возможности аналитических методов в области технологий лекарственных средств.

Часто в качестве биохимических маркеров выступают аминокислоты, пептиды, белки.  $\alpha$ -Аминокислоты относятся к важнейшим биологически активным веществам, которые в живых организмах являются структурными элементами белков и эндогенных соединений. Известно, что большинство  $\alpha$ -аминокислот характеризуются широким спектром биологической активности. В природе найдено около 300 аминокислот, 20 из них являются наиболее важными, так как их можно найти во всех белках. Аминокислоты, которые организм здорового человека не может самостоятельно синтезировать, являются незаменимыми: валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, лизин, метионин, треонин и триптофан. Незаменимые аминокислоты должны постоянно поступать с пищей во избежание нарушения обмена веществ, при этом потребность в этих аминокислотах сильно меняется с возрастом человека. Например, фенилаланин и тирозин – исходные вещества при синтезе антител, гормонов, ферментов, других биоло-

гически активных соединений. Триптофан нормализует дисбаланс в системе центральных моноаминов и нейроактивных аминокислот головного мозга (таурин, 5-окси-L-триптофан, дофамин, серотонин) на фоне субхронической интоксикации фенobarбиталом. Измерение содержания этих компонентов широко применяется в диагностике неврологических и онкологических заболеваний.

Различные патологические состояния сопровождаются накоплением в крови гетерогенных групп соединений в основном белковой природы. Спектр этих веществ является одним из важнейших показателей внутренней среды человека. Знание влияния различных лекарственных веществ и ксенобиотиков на физиологически активные компоненты позволяет выявить механизмы образования биологически активных пептидов и механизм их генерации при патологии.

Это определяет все возрастающий интерес к методам определения различных биологических соединений. Очень важным моментом с точки зрения аналитической химии при выборе методики определения того или иного компонента является экспрессность, предел обнаружения, минимальное количество вводимой пробы, а также стоимость реагентов и растворителей. При работе со сложными биологическими образцами необходимо пользоваться многомерным анализом (объединением результатов, полученных разными качественными и количественными методами).

# I. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

## 1.1. КЛАССИФИКАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ

Аминокислоты – класс органических соединений, содержащих одновременно карбоксильные ( $-\text{COOH}$ ) и аминогруппы ( $-\text{NH}_2$ ). Все аминокислоты в зависимости от структуры разделены на несколько групп. Существуют различные способы классификации аминокислот, основанные на природе и структуре R-групп. Наиболее рациональный способ учитывает различия в полярности R-групп, которые подразделяются на четыре основных класса:

- а) гидрофобные или неполярные;
- б) полярные, но незаряженные;
- в) отрицательно заряженные;
- г) положительно заряженные.

В пределах любого из названных классов R-группы значительно отличаются по форме, размерам и полярности.

Таблица 1. Классификация аминокислот

Аминокислота	Формула
Моноаминомонокарбоновые кислоты	
1. Глицин, аминокусусная кислота, Gly	$\begin{array}{c} \text{H} - \text{CH} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
2. Аланин, $\alpha$ -аминопропионовая кислота, Ala	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
3. Валин, $\alpha$ -аминоизовалериановая кислота, Val	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{CH} - \text{COOH} \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$
4. Лейцин, $\alpha$ -аминоизокапроновая кислота, Leu	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \quad \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$
5. Изолейцин, $\alpha$ -аминоизокапроновая кислота, Ile	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH} - \text{COOH} \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$

6. Серин, α-амино-β-гидроксипропионовая кислота, Ser	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$
7. Треонин, α-амино-β-гидроксимасляная кислота, Thr	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{CH} - \text{COOH} \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$
Диаминомонокарбновые кислоты	
8. Лизин, α,ε,-ди-аминокапроновая кислота, Lys	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
9. Гидроксилизин (модификация лизина), Hyl	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$
10. Аргинин, α-амино-σ-гуанидивалериановая кислота, Arg	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 - \text{C} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\    \quad   \\ \text{N} \quad \text{NH}_2 \end{array}$
Моноаминодикарбновые кислоты и их амиды	
11. Аспарагиновая кислота, α-амино-янтарная кислота, Asp	$\begin{array}{c} \text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
12. Аспарагин, Asn	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 - \text{CO} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
13. Глутаминовая кислота, α-аминоглутаровая кислота, Glu	$\begin{array}{c} \text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
14. Глутамин, Glu	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 - \text{CO} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Серусодержащие аминокислоты	
15. Цистеин, α-амино-β-тиопропионовая кислота, Cys	$\begin{array}{c} \text{HS} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$

16. Цистин (модификация цистеина), Cys   Cys	$  \begin{array}{c}  \text{NH}_2 \\    \\  \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\    \\  \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $
17. Метионин, α-амино-γ-тиометилмасляная кислота, Met	$  \begin{array}{c}  \text{CH}_3 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $
18. Фенилаланин, α-амино-β-фенилпропионовая кислота, Phe	$  \begin{array}{c}  \text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $
19. Тирозин, α-амино-β-оксифенилпропионовая кислота, Tyr	$  \begin{array}{c}  \text{HO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $
20. Триптофан, α-амино-β-индолилпропионовая кислота, Trp, Trp	$  \begin{array}{c}  \text{Indol-3-yl} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $
21. Гистидин, α-амино-β-имидазолилпропионовая кислота, His	$  \begin{array}{c}  \text{Imidazol-2-yl} - \text{CH}_2 - \text{CH} \begin{cases} \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{cases}  \end{array}  $
Иминокислоты	
22. Пролин, Pro	$  \begin{array}{c}  \text{Cyclopentyl} - \text{COOH} \\  \text{NH}  \end{array}  $

*Ациклические. Моноаминомонокарбоновые аминокислоты* имеют в своем составе одну аминную и одну карбоксильную группы, в водном растворе они нейтральны. Некоторые из них имеют общие структурные особенности, что позволяет рассматривать их вместе:



*Глицин и аланин.* Глицин (гликокол или аминоксусная кислота) – оптически неактивная аминокислота, не имеющая энантиомеров. Глицин участвует в образовании нуклеиновых и желчных кислот, гема, необходим для обезвреживания в печени токсичных продуктов. Аланин используется организмом в различных процессах обмена углеводов и энергии. Его изомер β-аланин является составной частью витамина пантотеновой кислоты, коэнзима А (КоА), экстрактивных веществ мышц.

*Серин и треонин* относятся к группе гидрооксикислот, так как имеют гидроксильную группу. Серин входит в состав различных ферментов, основного белка молока – казеина, а также в состав многих липопротеинов. Треонин участвует в биосинтезе белка, являясь незаменимой аминокислотой.

*Цистеин и метионин* имеют в составе атом серы. Значение цистеина определяется наличием в составе этой аминокислоты сульфгидрильной ( $-SH$ ) группы, которая придает ей способность легко окисляться и защищать организм от веществ с высокой окислительной способностью (при лучевом поражении, отравлении фосфором). Метионин характеризуется наличием легко подвижной метильной группы, используемой для синтеза важных соединений в организме (холина, креатина, тимины, адреналина и др.)

*Валин, лейцин и изолейцин* представляют собой разветвленные аминокислоты, которые активно участвуют в обмене веществ и не синтезируются в организме.

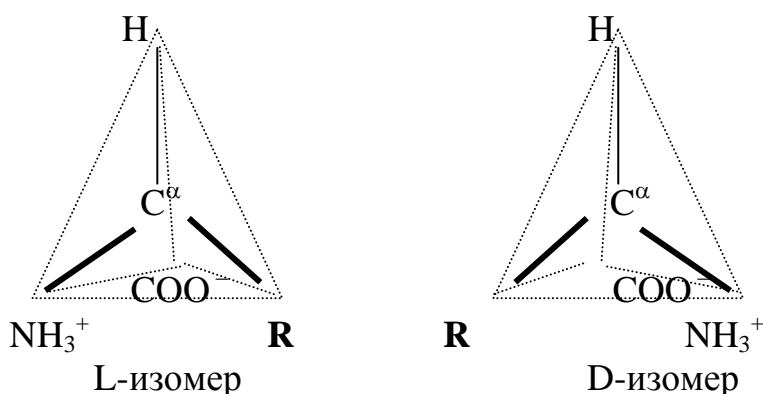
*Моноаминодикарбоновые аминокислоты* имеют одну аминную и две карбоксильные группы и в водном растворе дают кислую реакцию. К ним относятся аспарагиновая и глутаминовая кислоты, аспарагин и глутамин. Они входят в состав тормозных медиаторов нервной системы.

*Диаминомонокарбоновые аминокислоты* в водном растворе имеют щелочную реакцию за счет наличия двух аминных групп. Относящийся к ним лизин необходим для синтеза гистонов, а также ряда ферментов. Аргинин участвует в синтезе мочевины, креатина.

*Циклические.* Данные аминокислоты имеют в своем составе ароматическое или гетероциклическое ядро и, как правило, не синтезируются в организме человека и должны поступать с пищей. Они активно участвуют в разнообразных обменных процессах. Так, фенилаланин служит основным источником синтеза тирозина – предшест-

венника ряда биологически важных веществ: гормонов (тироксина, адреналина), некоторых пигментов. Триптофан помимо участия в синтезе белка, служит компонентом витамина РР, серотонина, триптамина, ряда пигментов. Гистидин необходим для синтеза белков, является предшественником гистамина, влияющего на кровяное давление и секрецию желудочного сока.  $\alpha$ -Фенилаланин относится к аминокислотам с неполярной R- группой. Для соединений этого класса аминокислот характерна низкая растворимость в воде.  $\alpha$ -Тирозин в водных растворах может находиться в виде катиона, биполрного иона, одно- и двухзарядного анионов.  $\alpha$ -Триптофан в процессах протолита может выступать как однозарядный катион, цвиттерион, одно- и двухзарядный анион.

Все аминокислоты, кроме глицина ( $\text{NH}_3^+\text{CH}_2\text{COO}^-$ ) имеют хиральный атом  $\text{C}^\alpha$  и могут существовать в виде двух энантиомеров (оптических изомеров). В состав всех изученных в настоящее время белков входят только аминокислоты L-ряда, у которых, если рассматривать хиральный атом со стороны атома водорода, группы  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{COO}^-$  и радикал R расположены по часовой стрелке.



Необходимость при построении биологически значимой полимерной молекулы создавать ее из строго определенного энантиомера очевидна – из рацемической смеси двух энантиомеров получилась бы сложная смесь дистереоизомеров. Следует отметить, что D-аминокислоты достаточно широко распространены в живой природе и, более того, входят в состав биологически значимых олигопептидов.

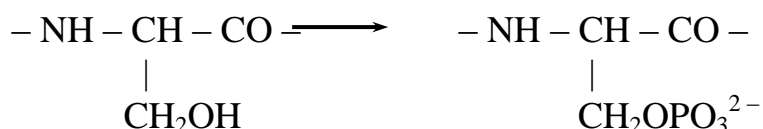
Из двадцати основных  $\alpha$ -аминокислот строятся белки, однако остальные, достаточно разнообразные аминокислоты образуются из этих 20 аминокислотных остатков уже в составе белковой молекулы. Среди

таких превращений следует в первую очередь отметить образование *дисульфидных мостиков* при окислении двух остатков цистеина в составе уже сформированных пептидных цепей. В результате образуется из двух остатков цистеина остаток диаминодикарбоновой кислоты *цистина*. При этом возникает сшивка либо внутри одной полипептидной цепи, либо между двумя различными цепями.

Важным примером модификации аминокислотных остатков является превращение остатков пролина в остатки *гидроксипролина*.

Это превращение происходит, причем в значительном масштабе, при образовании важного белкового компонента соединительной ткани – *коллагена*.

Еще одним весьма важным видом модификации белков является фосфорилирование гидроксогрупп остатков серина, треонина и тирозина, например:



Аминокислоты в водном растворе находятся в ионизированном состоянии за счет диссоциации amino- и карбоксильных групп, входящих в состав радикалов. Другими словами, они являются амфотерными соединениями и могут существовать либо как кислоты (доноры протонов), либо как основания (акцепторы доноров). Физико-химические свойства аминокислот обусловлены одновременным присутствием в молекуле основной аминогруппы и кислотной карбоксильной группы. В водном растворе карбоксильная группа отщепляет ионы водорода, и аминокислота начинает функционировать как кислота. В том же растворе группа  $\text{NH}_2$  является акцептором протона, что определяет основные свойства аминокислоты. Аминокислоты могут реагировать как с основаниями, так и с кислотами с образованием различных солей.

Аминокислоты с незаряженными полярными R- группами образуют водородные связи с молекулами воды, но растворимость их различна и зависит от структуры радикала.

Одной из основных величин, характеризующих электрохимическую активность  $\alpha$ -аминокислот, является изоэлектрическая точка (pI) – значение pH, при котором содержание цвиттер-ионов в растворе максимально. При этом цвиттер-ионы аминокислоты не способны

перемещаться в электрическом поле, их суммарный заряд стремится к нулю.

Изоэлектрическую точку рассчитывают как среднее арифметическое двух последовательных значений  $pK$  обеих стадий ионизации аминокислоты. Растворимость  $\alpha$ -аминокислот в воде зависит от строения углеводородного радикала, она минимальна в изоэлектрической точке и увеличивается при добавлении пептидов и белков. Это объясняется влиянием биполярных ионов на диэлектрическую проницаемость раствора. При растворении аминокислоты в воде  $pH$  раствора приближается к ее изоэлектрической точке. Суммарная электропроводность такого раствора определяется наличием четырех ионов:  $H^+$ ,  $OH^-$ , аниона ( $A^-$ ) и катиона ( $K^+$ ) аминокислоты. Все исследования проводились при  $pH$ , соответствующем изоэлектрической точке определенной аминокислоты.

При изучении термодинамических характеристик водных растворов аминокислот установлено, что их кислотно-основные свойства определяются строением углеводородного радикала. Кроме того, свойства аминокислот вследствие их диполярности зависят от  $pH$  среды. Согласно теории Бренстеда, моноаминомонокарбоновая  $\alpha$ -аминокислота в полностью протонированной форме является двухосновной кислотой.

## **1.2. МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ**

К настоящему времени наиболее широкое распространение получила комплексная схема исследования состава аминокислотных смесей, основанная на их предварительном разделении с последующим определением различными физико-химическими методами, из которых можно выделить следующие:

*Хроматография на бумаге.*

Образцы наносят на бумагу. Затем полоску подвешивают в закрытом сосуде, на дно которого налита смесь растворителей. Для разделения аминокислот используют полярные растворители в виде бинарных, тройных и более сложных смесей воды, спиртов, кислот и оснований. Более полярные компоненты растворителя ассоциируются с целлюлозой и образуют стационарную фазу, а менее полярные составляют подвижную фазу. Это нормальная распределительная хро-

матография. В распределительной хроматографии с обращенной фазой полярная и неполярная фазы меняются местами, для таких полярных соединений, как аминокислоты, она непригодна. Растворитель перемещается по бумаге вверх или вниз. Далее полоску бумаги обрабатывают нингидрином в ацетоне с последующим прогреванием в течение нескольких минут при 90-110°C. Аминокислоты с объемными неполярными боковыми цепями перемещаются быстрее, чем аминокислоты с более короткими неполярными боковыми цепями или с полярными боковыми цепями.

В ряду неполярных аминокислот (глицин, аланин, валин, лейцин) при увеличении длины неполярной боковой цепи, сопровождающемся усилением ее неполярного характера, увеличивается и подвижность аминокислоты. При двумерной хроматографии на бумаге образец наносят на один из углов квадратного листа бумаги и проводят разделение в одной системе растворителей. Затем лист вынимают, высушивают, поворачивают его на 90° и хроматографируют в другом растворителе.

#### *Тонкослойная хроматография*

Имеются два варианта тонкослойной хроматографии: распределительная (РТСХ) и адсорбционная (АТСХ). РТСХ сходна с распределительной хроматографией на бумаге. При ее проведении можно использовать такие же системы растворителей и такие же проявляющие реагенты, как и при хроматографии на бумаге.

#### *Автоматическая ионообменная хроматография*

Применяется для анализа аминокислотного состава полипептида после его гидролиза. Полное разделение аминокислот, их идентификация и количественная оценка занимают менее 3 часов. В методе Мура и Штейна используют короткую и длинную колонки, заполненные смолой из сульфонированного полистирола в Na<sup>+</sup>-форме. Когда кислотный гидролизат при pH 2 наносят на колонку, аминокислоты связываются в результате катионного обмена с Na<sup>+</sup>. Далее колонку элюируют раствором цитрата натрия при заранее запрограммированных значениях pH и температуры. Короткую колонку элюируют одним буфером, длинную - двумя. Элюат обрабатывают нингидрином, измеряя интенсивность окраски с помощью проточного колориметра.

#### *Лигандообменная хроматография*

В 1966г. Сигель и Дедженс впервые продемонстрировали исключительные возможности лигандообменных систем в сорбции амино-

кислот. Для селективного связывания свободных аминокислот из морской воды эти исследователи использовали ионообменник хелекс-100 на основе полистирола, содержащий остатки иминодиацетатных групп в форме комплексов с медью (I). Сорбированные на ионах меди аминокислоты затем вытесняли раствором аммиака и подвергали стандартному аминокислотному анализу. К середине 1960-х годов относятся и первые попытки решить другую практически важную проблему - отделить аминокислоты от пептидов путем использования реакции комплексообразования. Наибольший вклад в решение этой и других задач, а также в развитии лигандообменной хроматографии аминокислот в целом внесли российские ученые во главе с профессором В.А. Даванковым. Ими впервые были предложены методы разделения оптических изомеров аминокислот; смесей аминокислот и пептидов на модифицированных силикагелях и сверхсшитых сорбентах «Стиросорб». Сотрудниками научной школы В.А. Даванкова установлены механизмы взаимодействия разделяемых компонентов с сорбентами и выявлено влияние различных факторов на эффективность разделения.

#### *Высоковольтный электрофорез на инертных носителях*

В биохимии широкое применение нашло разделение аминокислот под действием наложенного постоянного тока. При разделении аминокислот в качестве инертных носителей чаще всего применяют полоски бумаги или тонкие слои целлюлозного порошка. Разделение проводят в течение 0,5-2 ч при напряжении 2000-5000 В в зависимости от суммарных зарядов амфолитов и их молекулярных масс. Среди молекул, несущих одинаковый заряд, более легкие мигрируют быстрее. В электрическом поле молекулы, несущие при данном рН отрицательный заряд, мигрируют к аноду, те, которые несут положительный заряд, - к катоду. Далее высушенную электрофореграмму проявляют нингидрином. Выбор рН определяется значениями рК диссоциирующих групп, входящих в состав молекул смеси. При рН 6,4 глутамат и аспаргат несут заряд -1 и движутся к аноду; разделение их осуществляется благодаря различию в молекулярной массе. Лизин, аргинин и гистидин движутся в противоположном направлении, а все другие аминокислоты остаются вблизи места нанесения.

#### *Мембранная экстракция*

Мембранная экстракция может быть эффективным методом извлечения и концентрирования лизина из водных растворов. Жидкая

мембрана может быть водным раствором и контактировать с двумя органическими фазами, но на практике чаще встречаются системы типа «вода-масло-вода». Для экстракции лизина предложено использовать экстрагирующую эмульсию, в которой в качестве органической мембраны использован раствор ди-2-этилгексилфосфорной кислоты в инертном разбавителе, а принимающей фазой служит раствор соляной кислоты.

Если аминокислоты находятся в растворе в свободном состоянии, то для их определения могут применяться следующие методы:

*Потенциометрическое определение с помощью ионоселективных электродов*

Для определения ряда аминокислот (лейцина, глутаминовой кислоты, аланина, фенилаланина, треонина, валина, аспарагина, серина) используются анион-селективные электроды пленочного типа на основе раствора бромидов тетрадециламмония в дибутилфталате. Все измерения ЭДС проводятся при постоянном значении pH для данной аминокислоты.

*Дифференциальная импульсная вольтамперометрия*

При взаимодействии соответствующей аминокислоты (аланина, фенилаланина и норлейцина) с о-фталевым альдегидом в присутствии меркаптосоединений происходит образование изоиндолов, которые подвергаются окислению на графитовом электроде. С использованием метода дифференциальной импульсной вольтамперометрии при скорости сканирования потенциала 10 мВ/с и амплитуде модуляции 100 мВ на фоне боратного буферного раствора с pH 9,2 были получены четкие вольтамперограммы характерной формы. Процесс окисления являлся необратимым процессом.

*Высокоэффективная жидкостная хроматография*

Серийный анализ смеси аминокислот тирозин-диоксифенилаланин традиционным методом ионообменной хроматографии с использованием нингидринового детектора достаточно длителен, а селективность разделения остается низкой. Предлагается быстрый и удобный метод анализа смеси тирозин-диоксифенилаланин в биологических жидкостях с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением стандартного ультрафиолетового детектора с фиксированной длиной волны на 254 нм. В качестве элюента используются водные растворы изопропилового спирта, подкис-

ленные серной кислотой. В этих условиях первым из колонки элюируется диоксифенилаланин.

#### *Спектрофотометрическое определение аминокислот*

С помощью данного метода можно определять многие аминокислоты в растворе. Усовершенствованный метод определения пролина основан на способности взаимодействия пролина с нингидрином с образованием окрашенного соединения. Определение проводится в кислой среде с нагреванием при регистрации на спектрофотометре. Добавление формалина полностью снимает вклад в спектр поглощения сопутствующих аминокислот, не затрагивая спектр поглощения пролина.

#### *Радиохимические методы*

Радиохимические методы определения аминокислот основаны на реакциях превращения этих соединений в ту или иную форму. Например, в качестве радиореагента часто используется  $^{64}\text{Cu}(\text{OAc})_2$ . В результате реакции образуется медный комплекс, радиоактивность которого затем измеряется.

#### *Метод капиллярного электрофореза*

В основе капиллярного электрофореза лежат электрокинетические явления — электромиграция ионов и других заряженных частиц и электроосмос. Эти явления возникают в растворах при помещении их в электрическое поле, преимущественно, высокого напряжения. Если раствор находится в тонком капилляре, например, в кварцевом, то электрическое поле, наложенное вдоль капилляра, вызывает в нем движение заряженных частиц и пассивный поток жидкости, в результате чего проба разделяется на индивидуальные компоненты, так как параметры электромиграции специфичны для каждого сорта заряженных частиц.

В пробах с высоким и низким содержанием белка возможен прямой анализ технологически важных аминокислот по собственному поглощению аминокруппы. Лизин и аргинин согласно в условиях анализа находятся в форме органических катионов и мигрируют до зоны электроосмотического потока, все другие аминокислоты существуют в форме органических анионов и мигрируют после зоны нейтральных компонентов.

Полное разделение всех 20-ти протеиногенных аминокислот возможно только в форме их производных. Предложены условия разделения аминокислот по их ФТК-производным, при этом в результате



кислотного гидролиза глутамин и аспарагин переходят в форму соответствующих им кислот (глутаминовой и аспарагиновой) и определяются по их пикам. Цистин перед кислотным гидролизом предпочтительно переводить в форму цистеиновой кислоты. Триптофан анализируют в отдельном растворе после проведения щелочного гидролиза.

При анализе свободных форм аминокислот не требуется проведения гидролиза белков. Порядок миграции оптических изомеров всегда одинаков: сначала D-форма, затем сразу же L-форма. Для полного разделения требуется оптимизация условий.

Идентификация и количественное определение цистеина после кислотного гидролиза белков основано на реакции аминокислоты с 9-флуоренилметилхлороформатом. В гидролизатах гель-разделенных белков присутствуют аддукты с акриламидом и иодацетамидом. Изучены условия восстановления аддуктов трибутилфосфином и алкилирования винилпиридином, акриламидом и иодацетамидом.

Разработан способ определения фосфотреонина и фосфотирозина в присутствии аспарагиновой и глутаминовой кислот методом капиллярного электрофореза. Капилляр из кварцевого стекла с полиимидом, УФ-детектирование при 259 нм. Продолжительность разделения 18 мин, предел обнаружения 1 мг/дм<sup>3</sup>. Способ применяют для определения фосфосерина в белках после гидролиза. Результаты коррелируют с данными спектрофотометрического определения.

Для определения аминокислот в смесях применяют капиллярный электрофорез с бесконтактным высокочастотным проводимым детектором. Бромид цетилтриметиламмония ускоряет анализ. Аминокислоты разделяют при 20 кВ в течение 7 мин, пределы обнаружения 0,17 – 0,94 ммоль / дм<sup>3</sup>.

Прямое электрохимическое детектирование аминокислот выполняют на полиметилметакрилатном чипе методом капиллярного электрофореза с интегрированным Cu-микроэлектродом. Оптимизированы условия разделения аргинина и лейцина, пределы обнаружения 10 (аргинин) и 75 (лейцин) моль / дм<sup>3</sup>.

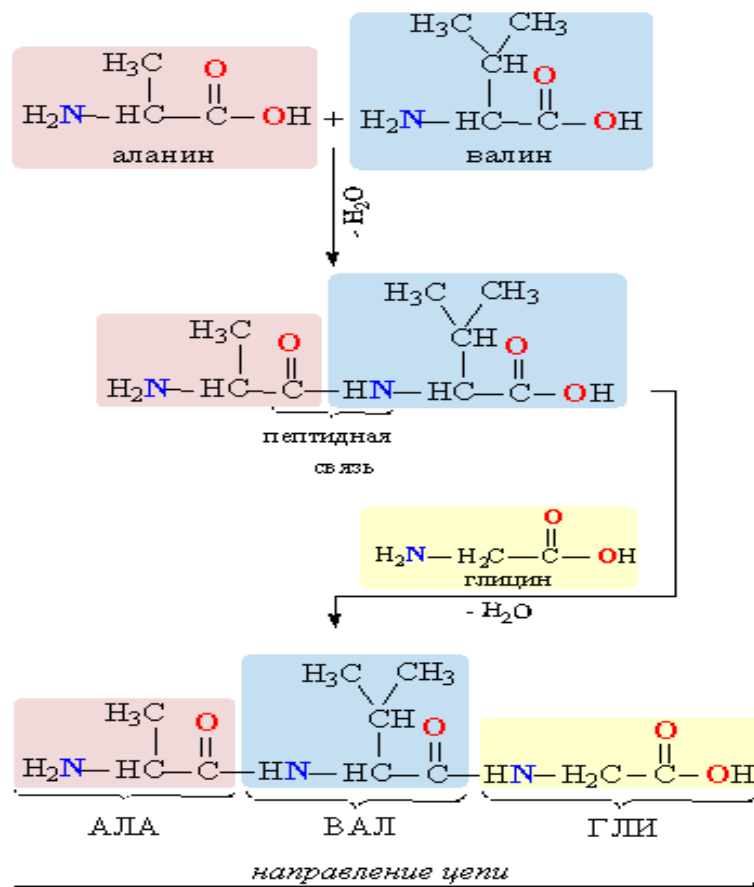
### 1.3. КЛАССИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ

**Белки** – высокомолекулярные органические соединения с молекулярной массой более 5000, построенные из остатков  $\alpha$ -аминокислот, связанных пептидными связями.

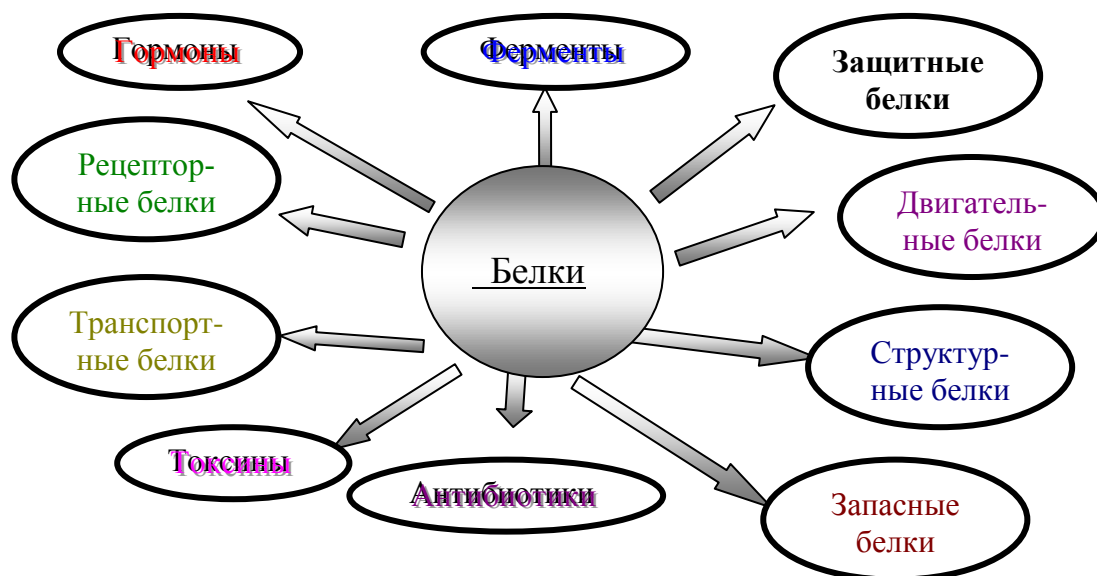
Таблица 2. Открытие аминокислот в составе белков

№	Аминокислота	Год	Источник	Кто впервые выделил
1.	Глицин	1820	Желатина	А.Браконно
2.	Лейцин	1820	Мышечные волокна	А.Браконно
3.	Тирозин	1848	Казеин	Ф.Бопп
4.	Серин	1865	Шелк	Э.Крамер
5.	Глутаминовая кислота	1866	Растительные белки	Г.Риттхаузен
6.	Аспарагиновая кислота	1868	Конглоутин, леугмин	Г.Риттхаузен
7.	Фенилаланин	1881	Ростки люпина	Э.Шульце, Й.Барбьери
8.	Аланин	1888	Фиброин шелка	Т.Вейль
9.	Лизин	1889	Казеин	Э.Дрексель
10.	Аргинин	1895	Вещество рога	С.Хедин
11.	Гистидин	1896	Стурин, гистоны	А.Коссель; С.Хедин
12.	Цистин	1899	Вещество рога	К.Мёрнер
13.	Валин	1901	Казеин	Э.Фишер
14.	Пролин	1901	Казеин	Э.Фишер
15.	Оксипролин	1902	Желатина	Э.Фишер
16.	Триптофан	1902	Казеин	Ф.Гопкинс, Д.Кол
17.	Изолейцин	1904	Фибрин	Ф.Эрлих
18.	Метионин	1922	Казеин	Д. Мёллер
19.	Треонин	1925	Белки овса	С.Шрайвер
20.	Оксилизин	1925	Белки рыб	С.Шрайвер

При последовательном соединении аминокислот при образовании белковой молекулы в качестве основного направления полимерной цепи выбирается путь от концевой аминогруппы  $\text{H}_2\text{N}$  к концевой карбоксильной группе  $\text{COOH}$ :



Функции белков чрезвычайно многообразны. Каждый данный белок как вещество с определенным химическим строением выполняет одну узкоспециализированную функцию и лишь в нескольких отдельных случаях – несколько взаимосвязанных. Например, гормон мозгового слоя надпочечников адреналин, поступая в кровь, повышает потребление кислорода и артериальное давление, содержание сахара в крови, стимулирует обмен веществ, а также является медиатором нервной системы у холоднокровных животных.



В связи с огромным разнообразием белков, различием их физических, химических свойств и биологических функций строго научная классификация белков в настоящее время отсутствует. Наиболее удачной считается классификация по структурным признакам с определенным сочетанием характерных физико-химических свойств белков. Согласно данному подходу класс белковых веществ подразделяется на две большие группы: протеины (простые белки), в состав которых входят только остатки аминокислот, и сложные белки – соединение простого белка с каким-либо веществом небелковой природы – простетической группой (углеводом, нуклеиновой кислотой, гемом и др.). Протеины и сложные белки в свою очередь делятся на ряд подгрупп.

*Протеины.* К простым белкам относятся альбумины, глобулины, проламины, глютелины, гистоны, протамины, протеноиды. Основу классификации протеинов составляют их растворимость в специфическом растворителе и некоторые химические признаки (основность, кислотность). Некоторые из них играют роль запасных белков и служат питательными веществами для растущих тканей; большая группа этих белков наделена биологической активностью и включает в себя ферменты, гормоны, антитела.

*Альбумины и глобулины* встречаются практически во всех животных и растительных клетках и выполняют важные биологические функции. Альбумины участвуют в поддержании осмотического давления крови, транспортируют с кровью различные вещества. Глобулины входят в состав ферментов, составляющих основу иммуноглобулинов, выполняющих функции антител. В сыворотке крови между этими двумя компонентами существует постоянное соотношение – альбумино-глобулиновый коэффициент (А/Г), равный 1,7 – 2,3 и имеющий важное диагностическое значение.

В растительных и животных клетках данные белки всегда встречаются совместно, но отличаются по степени растворимости. Альбумины – водорастворимые белки с высокой гидрофильностью, имеют небольшую молекулярную массу (15 000 – 70 000), характеризуются кислыми свойствами (изоэлектрическая точка (ИЭТ) около 4,7). Типичным представителем подгруппы альбуминов является белок куриного яйца – овальбумин. В молочной сыворотке содержится лактальбумин. Небольшое количество альбуминов находится в зеленых

частях растений: в зародышах пшеничного зерна – лейкозин, в семенах гороха – легумелин.

Глобулины не растворимы в дистиллированной воде, растворимы в слабых солевых растворах. Глобулины – слабокислые или нейтральные белки (ИЭТ находится в интервале рН 6,0-7,3), содержат кислых аминокислот меньше, чем альбумины. Глобулины составляют большую часть белков многих семян, особенно бобовых растений, масличных культур. Так, в семенах гороха и чечевицы содержится легумин; фасоли – фазеолин; конопли – эдестин; соевых бобов – глицинин.

*Проламины и глютелины* (запасные резервные белки) содержатся исключительно в растениях, особенно в семенах злаков (пшеница, рожь, ячмень). Проламины растворимы в 60-70%-м этаноле, при гидролизе образуют большое количество пролина и глутаминовой кислоты. Проламины не являются гомогенными белками и представляют собой смеси различных белков со сходными свойствами, но различной молекулярной массой. Наиболее характерный проламин, содержащийся в эндосперме зерна пшеницы, – глиадин; из зерна ячменя выделен гордеин; из овса – авенин.

Глютелины находятся, как правило, совместно с проламинами, не растворяются в солевых растворах и в спирте, но экстрагируются гидроксидами щелочных металлов. Они также не являются гомогенными белками, а представляют собой смеси разных белков со сходными свойствами. Хорошо исследованными белками являются глютеин пшеницы, резенин риса.

*Протамины и гистоны*. Протамины – низкомолекулярные белки (молекулярная масса 4000 – 12 000), характеризуются ярко выраженными основными свойствами из-за большого содержания аргинина. ИЭТ протаминов находится в щелочной области рН (10,5-13,5), в клетках животных организмов – это поликатионные белки. Помимо аргинина протамины содержат небольшое количество моноаминокислот и пролина, в них отсутствует цистеин и цистин, метионин, триптофан, фенилаланин. В небольших количествах протамины обнаружены в молоках и икре рыб. Наиболее подробно изучены клупеин сельди, сальмин лососевых рыб.

Гистоны – тканевые белки (от греч. histos – ткань) животных организмов с несколько меньшей основностью, чем протамины (ИЭТ 8,5-11,0). Молекулярная масса этих белков несколько выше, чем у

протаминов (11 000 – 24 000). Основные функции гистонов – структурная и регуляторная. Гистоны находятся в ядрах клеток, много гистонов содержится в зубной железе, эритроцитах, растительных тканях.

*Протеноиды* – подгруппа фибриллярных белков, содержащихся в опорных тканях животных. Не растворимы ни в воде, ни в солевых растворах, ни в разбавленных кислотах и щелочах, плохо подвергаются гидролизу протеолитическими ферментами. К наиболее известным протеноидам относятся *коллаген* соединительной ткани, *кератин* волос, шерсти, перьев, *эластин* сухожилий и связок, *фиброин* шелка.

Коллаген относится к самым распространенным белкам организма животных и составляет около одной трети массы всех белков. В коллагене треть аминокислотных остатков приходится на глицин, а около четверти – на пролин и гидроксипролин. Из всех незаменимых аминокислот коллаген не содержит триптофан, в малом количестве имеет метионин, отсутствуют цистин и цистеин. Необычным свойством молекулы коллагена является разветвление пептидной цепи, обусловленное остатками лизина, образующими точки ветвления на участках  $\epsilon$ -аминогрупп лизина.

*Кератины* (от греч. *keras* – рог) являются характерными протеноидами волос, шерсти, рогов, перьев, эпидермиса. Высокая стабильность и нерастворимость кератина обусловлены большим числом дисульфидных связей между пептидными цепями. Кератины содержат большое количество цистиновых остатков (5-12%). Кроме цистина, кератины содержат в достаточно большом количестве кислые и основные аминокислоты; в небольших количествах в его состав входят все незаменимые аминокислоты. Подобно коллагену, молекулы кератина образуют комплексы. Длина волокон зависит от содержания в них молекул воды.

*Эластин* – волокнистый структурный белок. Подобно коллагену, он содержит много глицина и пролина, однако более устойчив к действию протеолитических ферментов, кислот и оснований. Это связано с высоким содержанием неполярных аминокислотных остатков.

*Сложные белки.* В зависимости от природы простетической группы они делятся на гликопротеины, липопротеины, хромопротеины, фосфопротеины, металлопротеины, нуклеопротеины. Многие из этих белков представляют собой комплексы смешанных макромолекул. Наряду с большими различиями указанных протеинов у них есть

общее свойство – стабилизация белкового компонента простетической группой. Большие простетические группы протеинов занимают значительную часть поверхности глобулы белка, препятствуя разворачиванию полипептидных цепей и поддерживая их нативную конформацию.

В соответствии с формой белковой молекулы, обусловленной третичной структурой, выделяют следующие группы белков:

*Глобулярные белки.* Пространственная структура этих белков в грубом приближении может быть представлена в виде шара или не слишком вытянутого эллипсоида - глобулы. Как правило, значительная часть полипептидной цепи таких белков формирует  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -складки. Соотношение между ними может быть самым различным. Например, у миоглобина имеется 5  $\alpha$ -спиральных сегментов и нет ни одной  $\beta$ -складки. У иммуноглобулинов, наоборот, основными элементами вторичной структуры являются  $\beta$ -складки, а  $\alpha$ -спирали вообще отсутствуют. В структуре фосфоглицераткиназы и те и другие типы структур представлены примерно одинаково.

*Фибриллярные белки.* Эти белки имеют вытянутую нитевидную форму и выполняют в организме структурную функцию. В первичной структуре они имеют повторяющиеся участки аминокислот и формируют достаточно однотипную для всей полипептидной цепи вторичную структуру. Так, белок  $\alpha$ -креатин (основной белковый компонент ногтей, волос, кожи) построен из протяженных  $\alpha$ -спиралей. Фиброин шелка состоит из периодически повторяющихся фрагментов Gly – Ala – Gly – Ser, образующими  $\beta$ -складки.

## 1.4. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ

В исследовании конформации белка обязательным условием является получения белка высокой степени чистоты. Среди методов, используемых в биохимии, ключевое значение имеют выделение веществ из биологических источников и, как правило, их очистка с целью получения индивидуальных соединений.

*Методы выделения и очистки белков.* Выделение индивидуальных белков является ступенчатым процессом, т.к. на первых этапах очистки фракции содержат множество примесей. На каждой ступени разделения должна получаться фракция, более богатая необходимым веществом, чем предыдущая. Такой процесс часто называют

*фракционированием*. На каждой стадии разделения белок находится либо в виде раствора, либо в виде осадка.

Предварительная пробоподготовка биоматериала заключается в измельчении и гомогенизации биологического материала. Далее белок переводят в растворимое состояние путем экстракции водой, буферными растворами солей, иногда применяют неполярные растворители. Затем следует фракционное осаждение нейтральными солями, обычно  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , или органическими растворителями (ацетоном, этанолом, пропанолом, изопропанолом). Величина pH должна соответствовать ИЭТ выделяемого белка. Для предотвращения денатурации белка, как правило, создают низкую ионную силу раствора, осаждение проводят при пониженной температуре (около 4°C).

Следующей после высаливания стадией очистки является освобождение белка от низкомолекулярных примесей. Для этого раствор подвергают *гель-фильтрации, ультрафильтрации, диализу (электродиализу)*.

Эффективными методами разделения, выделения и очистки белков являются хроматографические методы и электрофорез. Среди хроматографических методов наиболее часто используют *адсорбционную, ионообменную, распределительную, аффинную и эксклюзионную хроматографию*. В адсорбционной хроматографии в качестве неподвижной фазы чаще всего используют оксид алюминия, цеолиты и силикагели. В качестве ионообменников применяются различные виды катионообменников, анионообменников, амфолитов. Одним из наиболее распространенных методов выделения генно-инженерных белков является аффинная хроматография на Ni-содержащих сорбентах. Неподвижные фазы в эксклюзионной хроматографии выбирают для решения конкретной аналитической задачи. Так, например, разделение водных смесей проводят на сшитых декстранах (сефадекс) или полиакриламиде (биогель Р). С органическими растворителями разделение проводят на гидрофобных полистиролах с различной степенью сшивки (стирогель, поргель, биобид С). Для эксклюзионной хроматографии при высоких давлениях колонки заполняют устойчивыми к давлению неподвижными фазами – модифицированными силикагелями. Разделение белков электрофорезом проводят в различных поддерживающих средах: полиакриламид, крахмал, агар, ацетат целлюлозы, декстран.



**Методы определения белков.** Метод обращенной газовой хроматографии используется для изучения фазовых переходов биополимеров, имеющих аморфно-кристаллическую природу, в частности фиброина шелка. Наиболее распространенным методом разделения и определения белков является обращенно-фазовый вариант высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) при градиентном элюировании с использованием спектрофотометрического, амперометрического или флуориметрического детектирования.

Определение содержания полимеров в инъекционных растворах альбумина является обязательным анализом при контроле их качества. В фармстатье для данного анализа рекомендуется использовать либо препаративную гель-проникающую хроматографию (стеклянная колонка 100 x 5 см, сорбент Sephadex G200, время анализа порядка 8 часов), либо ВЭЖХ с применением колонок с сорбентом на гелевой основе.

Другим вариантов данного анализа стал метод *высокоэффективной мембранной хроматографии*. Для анализа используются ионообменные СИМ – диски с QA и DEAE-сорбентами. Альбумин и фракции элюируются в градиентном режиме. Детектирование проводят с помощью спектрофотометрического или флуориметрического детектора. Время анализа составляет 5 минут.

Также возможно определение альбумина и его полимеров с помощью капиллярного электрофореза. В данном случае используется немодифицированный капилляр (50 см, 75 мкм), спектрофотометрический детектор. В качестве ведущего электролита применяется боратный буфер. При этом время анализа составляет 9 минут, и по сравнению с другими методами значительно сокращается расход реактивов.

Количественное определение белков можно также проводить с помощью *фотометрии, спектрофотометрии, люминесценции, полярографии*, в клинических лабораториях широко используются *иммунохимические методы анализа*.

**Определение первичной структуры белков** сводится к выяснению порядка расположения аминокислот в полипептидной цепочке. Анализ аминокислотного состава белка включает в себя полный гидролиз исследуемого белка и количественное определение всех аминокислот в гидролизате с помощью *аминокислотного анализатора*. В большинстве таких приборов смесь аминокислот разделяют на ионо-

обменных колонках, детектирование аминокислот осуществляют спектрофотометрически.

Для непосредственного анализа первичной структуры белков используют *секвенатор* (от англ. sequence – последовательность) – прибор, осуществляющий последовательное автоматическое отщепление N – концевых остатков аминокислот по методу П.Эрдмана.

### ***Методы и приемы исследования пространственной структуры (конформации) белка***

При исследовании вторичной, третичной и четвертичной структур применяют два подхода: исследование в растворе и кристаллическом состоянии.

*Рентгеноструктурный кристаллографический анализ* является основным методом получения непосредственной информации о пространственном расположении атомов в молекуле белка. Метод основан на дифракции рентгеновских лучей электронами, окружающими ядра атомов в кристалле белка. На фотопленке, помещенной за кристаллом, рентгеновское излучение дает дифракционную картину, характерную для третичной, вторичной структур белка. С использованием информации, полученной с помощью рентгеновской дифракционной картины белковых кристаллов, возможно создание карт электронной плотности, отражающих расположение атомов в белках. Имея такие карты и зная аминокислотную последовательность, можно определить трехмерную структуру белка. Рентгеноструктурный анализ применим только для хорошо кристаллизующихся белков. Однако кристаллизация белков является трудоемкой задачей, и далеко не каждый белок можно получить в кристаллическом состоянии.

В отличие от рентгеноструктурной кристаллографии, *ядерно-магнитная резонансная (ЯМР) спектроскопия* позволяет изучать белки в растворах. ЯМР спектроскопия, основанная на абсорбции электромагнитного излучения молекул в магнитных полях, устанавливает состояние спинов определенных атомных ядер (обычно водородных атомов). С помощью этих данных и зная аминокислотную последовательность белка, можно определить его конформацию.

Исследование *дисперсии оптического вращения (ДОВ)* – один из наиболее важных методов изучения конформации белков в их водных растворах. В данном методе конформационная оптическая активность изменяется с длиной световой волны. Совокупность экспериментальных данных по рентгеноструктурному анализу и методу ДОВ может

дать более исчерпывающую информацию о структуре и функциях белка.

В исследованиях вторичной структуры можно использовать также ультрафиолетовую спектрофотометрию, основанную на гипсохромном эффекте, ИК-спектроскопию, электронную микроскопию, ограниченный протеолиз.

## II. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### Лабораторная работа № 1

#### КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ

Характерной качественной реакцией на  $\alpha$ -аминокислоты является реакция с нингидрином (трикетогидринден). В результате появляется интенсивное сине-фиолетовое окрашивание, свидетельствующее о присутствии в испытуемой пробе  $\alpha$ -аминокислот. Кроме того, существует также ряд специфичных цветных реакций на отдельные аминокислоты.

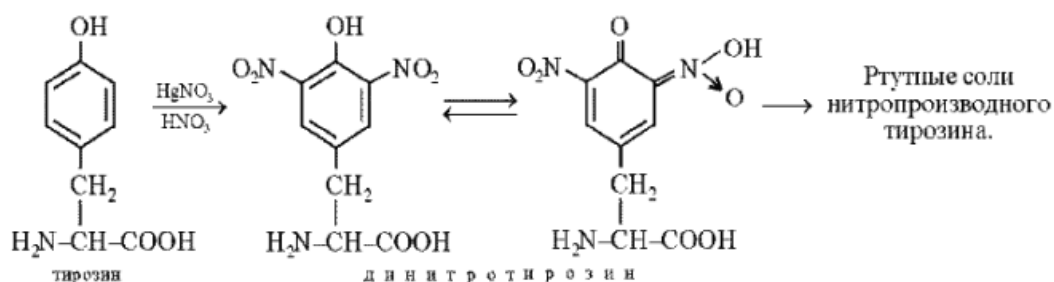
#### Материалы и оборудование

1. Анализируемые аминокислоты (тирозин, гистидин, триптофан).
2. Нингидрин.
3. Серная кислота,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 2,5%-й раствор.
4. Реактив Миллона.
5. Сульфаниловая кислота, 1%-й раствор.
6. Соляная кислота,  $\text{HCl}$ , 5%-й раствор.
7. Нитрит калия,  $\text{KNO}_2$ , 0,5%-й раствор.
8. Карбонат натрия,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 10%-й раствор.
9. Глиоксиловая кислота,  $(\text{HO})_2\text{CHCOOH}$ .
10. Сульфат меди,  $\text{CuSO}_4$ , 0,04 М раствор.
11. Серная кислота,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , концентрированный раствор.

#### Выполнение работы

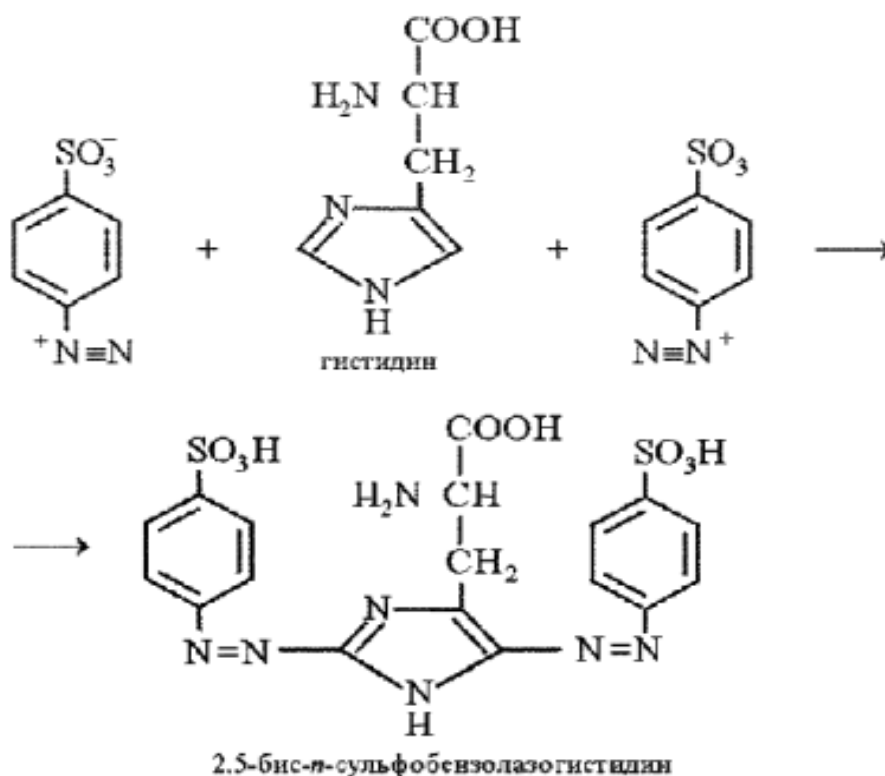
*Определение тирозина с помощью реакции Миллона.*

К нескольким кристаллам тирозина прибавляют 5 мл 2,5 %-го раствора серной кислоты и перемешивают до полного растворения. Приливают 1 мл реактива Миллона (раствор  $\text{HgNO}_3$  и  $\text{Hg}(\text{NO}_2)_2$ ), встряхивают и оставляют при комнатной температуре. Через некоторое время раствор окрашивается в кроваво-красный цвет. Для ускорения появления окраски раствор можно немного подогреть.



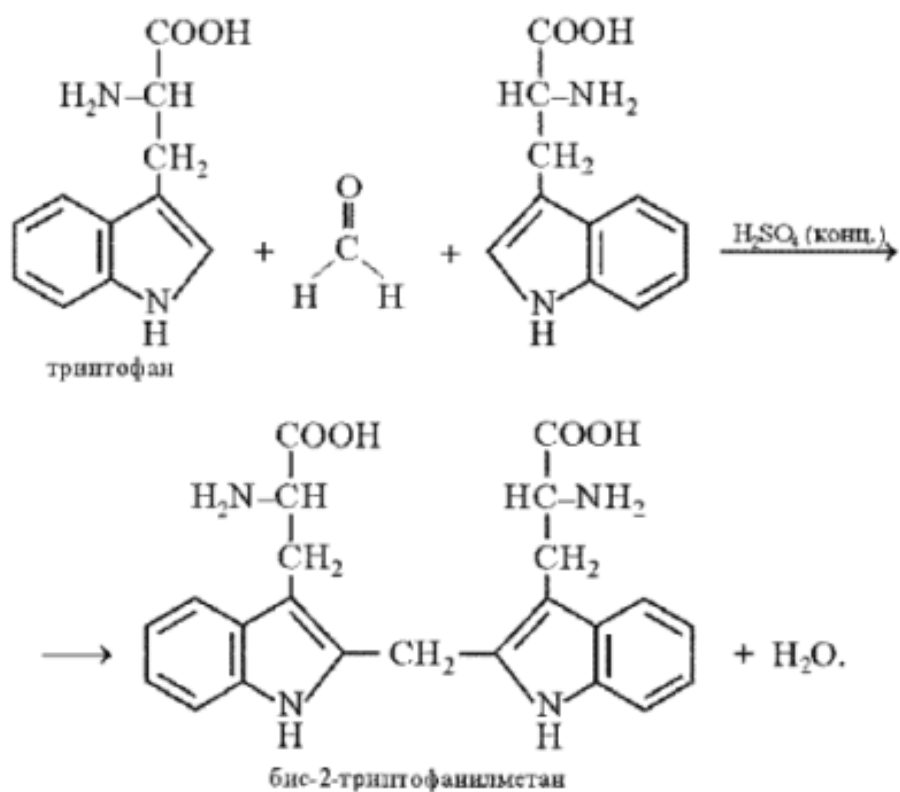
### Определение гистидина с помощью реактива Паули

К 1 мл 1%-го раствора сульфаниловой кислоты в 5%-м растворе HCl прибавляют 2 мл 0,5%-го раствора нитрита калия, энергично встряхивают и немедленно прибавляют 2 мл 0,01%-го раствора гистидина. Далее после перемешивания содержимого пробирки, приливают 6 мл 10%-го раствора карбоната натрия. Развивается интенсивная вишнево-красная окраска.

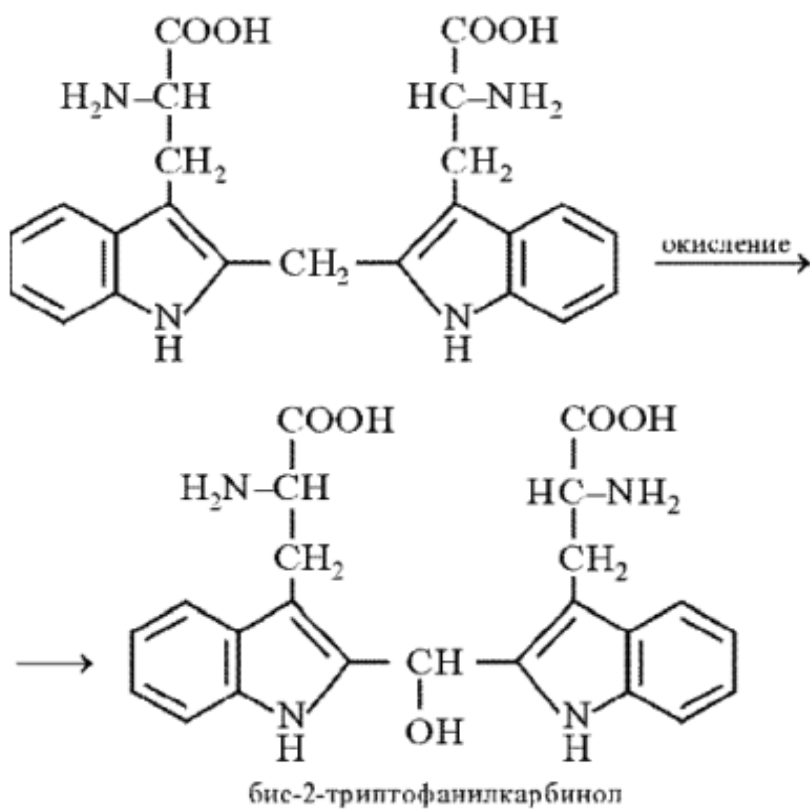


### Определение триптофана с помощью реакции Гопкинса-Коле

К 1 мл 0,005%-го раствора триптофана прибавляют равный объем глиоксиловой кислоты и 10 капель 0,04 М раствора сульфата меди. Затем небольшими порциями приливают 2-3 мл концентрированной серной кислоты, охлаждая пробирку каждый раз.



После этого пробирку оставляют на 10 мин при комнатной температуре, а потом опускают на 5 мин в кипящую водяную баню. Развивается сине-фиолетовое окрашивание.



## Лабораторная работа № 2

### КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ

Цветные реакции применяются для установления белковой природы веществ, идентификации белков и определение их аминокислотного состава в различных биологических жидкостях. В клинической лабораторной практике эти методы используются для определения количества белка в плазме крови, аминокислот в моче и крови, для выявления наследственных и приобретенных патологий обмена у новорожденных.

#### Материалы и оборудование

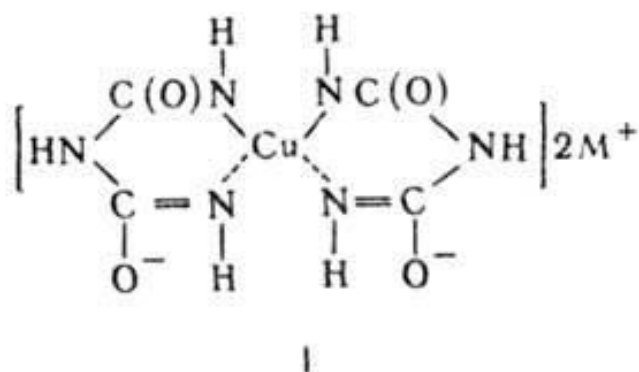
1. Яичный белок, 1%-й раствор.
2. Гидроксид натрия, NaOH, 10%-й раствор.
3. Гидроксид меди,  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ , 1%-й раствор.
4. Нингидрин, 0,5%-й водный раствор.
5. Азотная кислота,  $\text{HNO}_3$ , концентрированный раствор.
6. Гидроксид натрия, NaOH, 10%-й раствор.
7. Уксусная кислота,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , концентрированный раствор.
8. Серная кислота,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , концентрированный раствор.
9. Ацетат свинца,  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , 5%-й раствор.

#### Выполнение работы

##### Биуретовая реакция на пептидную связь

В основе ее лежит способность пептидных связей ( $-\text{CO}-\text{NH}-$ ) образовывать с сульфатом меди в щелочной среде окрашенные комплексные соединения, интенсивность окраски которых зависит от длины полипептидной цепи. Раствор белка дает сине-фиолетовое окрашивание.

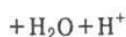
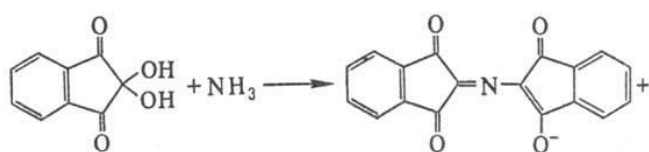
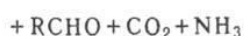
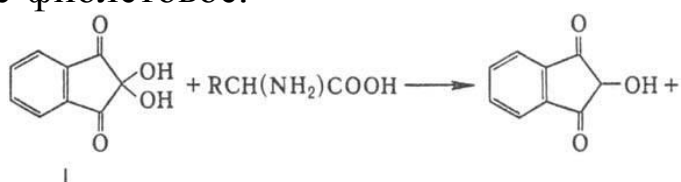
*Ход определения.* В пробирку вносят 5 капель р-ра яичного белка (белок куриного яйца фильтруют через марлю и разводят дистиллированной водой 1:10), 3 капли NaOH, 1 каплю  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ , перемешивают. Содержимое пробирки приобретает сине-фиолетовое окрашивание.



### Нингидриновая реакция

Сущность реакции состоит в образовании соединения, окрашенного в сине-фиолетовый цвет, состоящего из нингидрина и продуктов гидролиза аминокислот. Эта реакция характерна для аминогрупп в  $\alpha$ -положении, присутствующих в природных аминокислотах и белках.

*Ход определения.* В пробирку вносят 5 капель р-ра яичного белка, затем 5 капель нингидрина, нагревают смесь до кипения. Появляется розово-фиолетовое окрашивание, переходящее с течением времени в сине-фиолетовое.



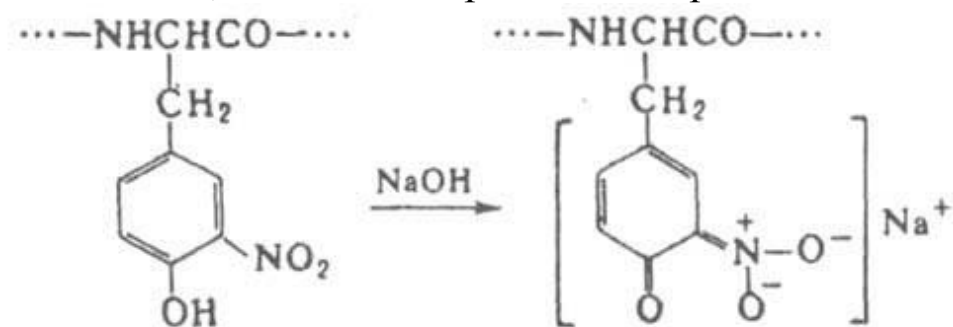
### Ксантопротеиновая реакция

При добавлении к раствору белка концентрированной азотной кислоты и нагревании появляется желтое окрашивание, переходящее в присутствии щелочи в оранжевое. Сущность реакции состоит в нитровании бензольного кольца циклических аминокислот азотной кислотой с образованием нитросоединений, выпадающих в осадок. Реакция выявляет наличие в белке циклических аминокислот.

*Ход определения.* К 5 каплям раствора яичного белка добавляют 3 капли азотной кислоты и (осторожно!) нагревают. Появляется осадок



желтого цвета. После охлаждения добавляют (желательно на осадок) 10 капель NaOH, появляется оранжевое окрашивание.



### Реакция Адамкевича

Аминокислота триптофан в кислой среде, взаимодействуя с альдегидами кислот, образует продукты конденсации красно-фиолетового цвета.

*Ход определения.* К одной капле белка прибавляют 10 капель уксусной кислоты. Наклонив пробирку, осторожно по стенке добавляют по каплям 0,5 мл серной кислоты так, чтобы жидкости не смешивались. При стоянии пробирки на границе жидкостей появляется красно-фиолетовое кольцо.

### Реакция Фоля

Аминокислоты, содержащие сульфгидрильные группы – SH, подвергаются щелочному гидролизу с образованием сульфида натрия Na<sub>2</sub>S. Последний, взаимодействуя с плюмбитом натрия (образуется в ходе реакции между ацетатом свинца и NaOH), образует осадок сульфида свинца PbS черного или бурого цвета.



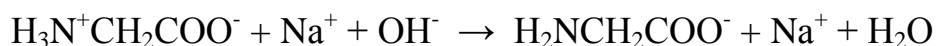
*Ход определения.* К 5 каплям раствора белка прибавляют 5 капель реактива Фоля (к 5%-му раствору ацетата свинца прибавляют равный объем 30% раствора NaOH до растворения образовавшегося осадка) и кипятят 2-3 мин. После отстаивания 1-2 мин появляется черный или бурый осадок.

### Лабораторная работа № 3

## КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИЦИНА МЕТОДОМ ВЫСОКОЧАСТОТНОГО ТИТРОВАНИЯ

### Сущность работы.

Аминоуксусная кислота (глицин) имеет биполярное строение. Кислотные свойства аминокислоты выражены значительно сильнее, чем основные ( $pK_a = 2,35$ ;  $pK_b = 9,88$ ). Определение аминокислоты методом высокочастотного титрования основано на реакции взаимодействия биполярного иона с раствором гидроксида натрия:



В результате реакции электрическая проводимость линейно повышается за счет образования в растворе иона  $H_2NCH_2COO^-$  (соответственно сопротивление раствора уменьшается). После точки эквивалентности избыток гидроксида натрия вызывает резкое возрастание электрической проводимости (понижение сопротивления) вследствие увеличения концентрации высокоподвижных  $OH^-$  ионов.

### Материалы и оборудование

1. Соляная кислота, HCl, 0,5 М.
2. Гидроксид натрия, NaOH, кристаллический.
3. Глицин,  $NH_2CH_2COOH$ , исследуемый раствор.
4. Мерные колбы мерные вместимостью 50,00 и 100,00 мл.
5. Пипетки вместимостью 5,00 и 20,00 мл.
6. Бюретка вместимостью 25,00 мл.
7. Титратор высокочастотный ТВ-6Л1.

### Выполнение работы

*1. Приготовление и стандартизация рабочего раствора гидроксида натрия.*

Подготавливают титратор к работе в соответствии с инструкцией к прибору. Рассчитывают и взвешивают на технических весах навеску NaOH, необходимую для приготовления 100 мл 0,1 М раствора. Растворяют навеску в воде, раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки водой. Точную концентрацию

полученного раствора NaOH устанавливают по титрованному раствору HCl. Для этого 10 мл 0,5 М титрованного раствора HCl помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки водой. Отбирают пипеткой 5 мл полученного раствора в ячейку для титрования, добавляют воду до уровня, на 3-5 мл превышающего уровень верхнего электрода, опускают в ячейку магнит-мешалку и устанавливают стрелку показывающего прибора на 30-40 делений шкалы.

Бюретку заполняют приготовленным раствором гидроксида натрия. Включают мешалку и начинают титрование, приливая титрант порциями по 0,5 мл до тех пор, пока прибор не обнаружит резкого изменения показаний, после чего делают еще 3-4 измерения. По полученным данным строят кривую титрования в координатах показания прибора – объем титранта, находят точку эквивалентности и рассчитывают молярную концентрацию стандартного раствора NaOH.

*2. Анализ исследуемого раствора.* Исследуемый раствор глицина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Пипеткой отбирают 20 мл этого раствора в ячейку, добавляют дистиллированную воду (как при определении концентрации NaOH) и титруют раствором гидроксида натрия. Стрелку прибора перед титрованием устанавливают на 80-90 делений. Титрант приливают порциями по 0,5 мл до тех пор, пока не обнаружат начало резкого уменьшения показаний прибора, после чего добавляют еще несколько порций раствора NaOH. Строят кривую титрования, находят точку эквивалентности и рассчитывают массу глицина в исследуемом растворе в миллиграммах.

Проводят статистическую обработку полученных результатов.

## Лабораторная работа № 4

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ СМЕСИ АМИНОКИСЛОТ В СРЕДЕ ЛЕДЯНОЙ УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДОМ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОГО ТИТРОВАНИЯ

#### Сущность работы.

Определение основано на совместном потенциометрическом титровании двух аминокислот стандартным раствором хлорной кислоты в среде безводной уксусной кислоты. Стандартизацию раствора хлорной кислоты ведут по гидрофталату калия, растворенному в безводной уксусной кислоте. Кроме гидрофталата для этой цели применяют также безводный карбонат натрия и дифенилгуанидин (ДФГ).

В ледяной уксусной кислоте диссоциация карбоксильной группы аминокислот полностью подавляется, что позволяет титровать аминогруппу хлорной кислотой.

Техника неводного титрования и аппаратура, используемая при этом, такие же, как при титровании водных растворов. По экспериментальным данным строят кривые титрования в координатах  $E - V$  ( $\text{HClO}_4$ ), мл,  $\Delta E / \Delta V - V$  ( $\text{HClO}_4$ ), мл (рис. 1). По полученным кривым находят  $V_1$  – объем  $\text{HClO}_4$ , пошедший на титрование смеси аминокислот.

При выполнении работы категорически запрещается засасывать ртом в пипетку ледяную уксусную кислоту!

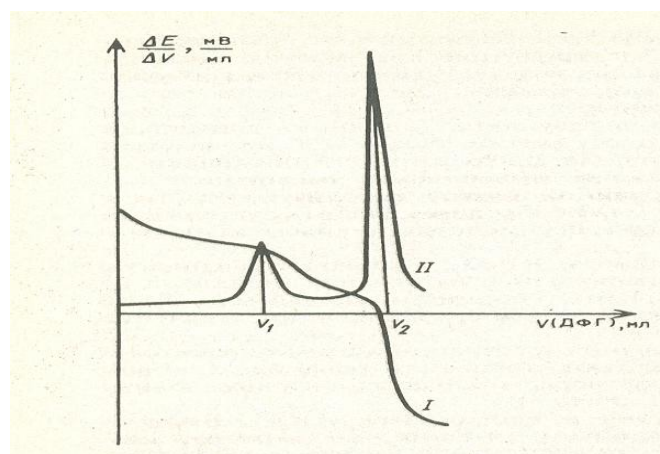


Рис. 1. Кривая потенциометрического титрования смеси серной кислоты с гидросульфатом натрия раствором дифенилгуанидина (I); дифференциальная кривая (II).

### **Материалы и оборудование**

1. Хлорная кислота,  $\text{HClO}_4$ , 72 %-й раствор.
2. Уксусный ангидрид,  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ .
3. Уксусная кислота,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , ледяная.
4. Гидрофталат калия,  $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ , кристаллический.
5. Смесь аминокислот.
6. Мерная колба вместимостью 50,00 мл.
7. Пипетка вместимостью 5,00 мл.
8. Цилиндр вместимостью 10-25 мл.
9. Установка для потенциометрического титрования в комплекте с рН-метром в режиме милливольтметра.

### **Выполнение работы**

1. *Приготовление 0,1 М раствора  $\text{HClO}_4$  в ледяной уксусной кислоте* (под тягой!). Растворяют приблизительно 9 мл 72%-й хлорной кислоты в 100 мл безводной уксусной кислоты. К полученному раствору прибавляют небольшими порциями при постоянном охлаждении около 30 мл уксусного ангидрида. Колбу закрывают пробкой и оставляют в течение суток в темном месте, после чего ледяной уксусной кислотой доводят объем раствора до 500 мл.

*Приготовление раствора гидрофталата калия в ледяной уксусной кислоте* (под тягой!). Рассчитывают навеску гидрофталата калия, необходимую для приготовления 50 мл 0,1 М раствора гидрофталата калия в ледяной уксусной кислоте.

Рассчитанную массу гидрофталата калия взвешивают в стакане вместимостью 50 мл на аналитических весах, растворяют при нагревании в небольшом объеме безводной уксусной кислоты, охлаждают раствор до комнатной температуры, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки ледяной уксусной кислотой.

*Стандартизация раствора  $\text{HClO}_4$  в ледяной уксусной кислоте.* Включают рН-метр и прогревают в течение 15-20 мин. В стакан для титрования отбирают пипеткой (с помощью специальной груши) aliquоту раствора гидрофталата калия (5 мл) и добавляют мерным цилиндром 25 мл ледяной уксусной кислоты.

Затем включают магнитную мешалку, переключатель рода работ ставят в положение «+mV», а переключатель диапазона измерений –

в позицию «-1...14». Оценивают значение потенциала, используя нижнюю шкалу прибора. В зависимости от значения  $E$  (мВ) переключают диапазон измерений в одно из положений «-1...4», «4...9» или «9...14».

Проводят титрование раствора стандартного вещества 0,1 М раствором  $\text{HClO}_4$  в ледяной уксусной кислоте, прибавляя титрант из микробюретки порциями по 0,2 мл. Записывают объем  $V$  ( $\text{HClO}_4$ ) и показания прибора ( $E$ , мВ). По резкому отклонению стрелки на шкале обнаруживают скачок потенциала, отвечающий концу титрования, после чего добавляют еще 2-3 порции.

По полученным данным строят кривые титрования, находят объем титранта в точке эквивалентности и рассчитывают молярную концентрацию раствора хлорной кислоты в ледяной уксусной кислоте. Проводят холостой опыт для внесения поправки на содержание основных примесей в растворителе.

2. *Анализ смеси аминокислот (аланина с фенилаланином).* Точную навеску смеси аминокислот массой около 0,4 г взвешивают на аналитических весах, растворяют при нагревании в небольшом объеме безводной уксусной кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки ледяной уксусной кислотой.

Титрование алиquotы полученного раствора (5 мл) проводят так же, как и при стандартизации  $\text{HClO}_4$ . По кривым титрования находят  $V$  ( $\text{HClO}_4$ ) в точке эквивалентности и рассчитывают массовую долю (%) компонентов смеси.

## Лабораторная работа № 5

### ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИРОЗИНА НА ГРАФИТОВОМ ЭЛЕКТРОДЕ

#### Сущность работы

Одним из методов, позволяющих количественно определять аминокислоты, является вольтамперометрия на твердых индикаторных электродах. Известны лишь несколько природных  $\alpha$ -аминокислот, способных окисляться на графитовом электроде, что обусловлено строением их молекул. На примере двух аминокислот – фенилаланина и тирозина (оксифениламина), отличающихся лишь наличием оксигруппы в молекуле последней, можно проследить влияние строения органической молекулы на электрохимические свойства соединения. Процесс окисления необратим и контролируется диффузией деполяризатора к электроду. Фенилаланин электрохимически неактивен.

#### Материалы и оборудование

1. Тирозин, 0,01 М стандартный раствор.
2. Фенилаланин, 0,01 М стандартный раствор.
3. Анализируемый раствор тирозина.
4. Серная кислота,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0,01 М раствор.
5. Мерные колбы вместимостью 10,00 мл.
6. Полярограф.
7. Ячейка с графитовым индикаторным и хлоридсеребряным электродом сравнения.

#### Выполнение работы

Готовят полярограф к работе в классическом режиме согласно описанию. Зачищают и полируют до блеска фильтровальной бумагой торцевую поверхность графитового электрода (эту операцию необходимо повторять перед регистрацией каждой вольтамперограммы, чтобы получать воспроизводимые результаты).

Предварительно записывают вольтамперограмму фона. Для этого в ячейку помещают 10,0 мл раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Устанавливают начальный потенциал 0,5 В и записывают вольтамперограмму от 0,5 В до потенциала разряда фона.

В двух мерных пробирках (колбах) вместимостью 10,0 мл готовят  $5 \cdot 10^{-4}$  М растворы тирозина и фенилаланина. Для этого в одну пробирку (колбу) вводят 0,50 мл раствора тирозина, в другую – 0,50 мл раствора фенилаланина и разбавляют до метки раствором  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Записывают вольтамперограммы обоих растворов в тех же условиях, что и вольтамперограмму фона. Находят величину  $E_{1/2}$  тирозина и изучают обратимость процесса его окисления. Для этого строят график в координатах  $\lg I/(I_{\text{пр}} - I) - E$ .

Для построения градуировочного графика для определения тирозина в пяти мерных пробирках (колбах) вместимостью 10,00 мл готовят серию растворов тирозина с концентрациями  $2,5 \cdot 10^{-5}$  М,  $5,0 \cdot 10^{-5}$  М,  $1,0 \cdot 10^{-4}$  М,  $2,5 \cdot 10^{-4}$  М и  $5,0 \cdot 10^{-4}$  М. Для этого стандартный раствор тирозина разбавляют раствором серной кислоты. Подбрав диапазон тока для самого концентрированного раствора, записывают вольтамперограммы всех растворов, не меняя условий. Анализируемый раствор тирозина в пробирке (колбе) вместимостью 10,0 мл разбавляют до метки раствором серной кислоты и регистрируют вольтамперограмму.

Обрабатывают полученные вольтамперограммы: измеряют высоту волны и определяют  $E_{1/2}$ . Строят график зависимости  $E_{1/2}$  от концентрации и убеждаются в том, что окисление тирозина протекает необратимо.

Строят график зависимости высоты волны от концентрации тирозина и находят его концентрацию в анализируемом растворе.



## Лабораторная работа № 6

# КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ В БЕЛКОВОМ ГИДРОЛИЗАТЕ МЕТОДОМ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

### Сущность работы

Отходы мясо- и птицекомбинатов, содержащие большое количество протеинов и белковых соединений, подвергаются воздействию перегретого пара в автоклавах. Полученный гидролизат содержит более 15 аминокислот и служит эффективной кормовой добавкой в животноводстве. Продолжительность и технические параметры гидролиза (давление, температура), а также состав, норма и рацион кормовых добавок зависят от аминокислотного состава белкового гидролизата. Установление качественного состава белкового гидролизата основано на различных скоростях перемещения по хроматографической бумаге компонентов анализируемой пробы относительно фронта растворителя.

### Материалы и оборудование

Растворитель: смесь бутилового спирта с уксусной кислотой и дистиллированной водой в объемном соотношении 4:1:5.

Проявитель: 200 мг нингидрина растворяют в 100 мл ацетона.

Аминокислоты: аланин, лизин, валин, тирозин, аспарагиновая и глутаминовая – стандартные растворы с концентрацией 0,01 моль/л.

Анализируемый белковый гидролизат.

Хроматографическая камера

Хроматографическая бумага, ватман №1.

Сушильный шкаф, пульверизатор, пинцет

Микропипетка вместимостью 0,10 мл.

### Выполнение работы

*Подготовка хроматографической бумаги.* Вырезают полоски хроматографической бумаги длиной 30 см и шириной, соответствующей ширине хроматографической камеры. Снизу на расстоянии 4 см карандашом проводят стартовую линию. Отступив от края линии на 2 см, отмечают первую точку. Стандартные растворы аминокислот

и анализируемый белковый гидролизат наносят на линию старта на расстоянии 2-3 см друг от друга.

*Хроматографирование.* Пробы объемом 0,01 мл наносят микропипеткой путем прикосновения к бумаге в два приема по 0,005 мл в одну и ту же точку. Диаметр капли на бумаге не должен превышать 3 мм.

Хроматограммы подсушивают в сушильном шкафу и помещают в хроматографическую камеру с растворителем. При этом нижний край хроматограмм погружают в растворитель на 1-1,5 см. Растворитель пропускают через бумагу в течение 3 ч. Для разделения аминокислот необходимо трехкратное пропускание растворителя с периодическим высушиванием хроматограмм.

Затем хроматограммы извлекают из камеры, отмечают фронт движения растворителя и помещают в сушильный шкаф (70 °С) на 10-15 мин. Хроматограммы проявляют раствором нингидрина в ацетоне (опрыскивают из пульверизатора), нижний край хроматограмм поддерживают пинцетом, чтобы лист бумаги располагался вертикально. После этого хроматограммы подсушивают в сушильном шкафу при 70°С в течение 15 мин. При проявлении хроматограмм появляются пятна сиренево-фиолетового цвета на некотором расстоянии друг от друга.

*Обработка хроматограмм.* Качественный анализ аминокислот проводят путем сопоставления положения пятен стандартных растворов аминокислот и анализируемого гидролизата. Для этого рассчитывают величину  $R_f$  для каждой аминокислоты как отношение пути, пройденного аминокислотой (расстояние от линии старта до центра пятна), к пути, пройденному растворителем (расстояние от линии старта до границы смещения растворителя). Каждая аминокислота при одинаковых условиях эксперимента имеет постоянную величину  $R_f$ . Сравнение этих величин, характеризующих смещение зон аминокислот стандартных растворов и полученных при хроматографировании белкового гидролизата, позволяет сделать вывод о качественном составе исследуемого гидролизата.

## Лабораторная работа № 7

### КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСПАРАГИНОВОЙ, ГЛУТАМИНОВОЙ АМИНОКИСЛОТ И ВАЛИНА В БЕЛКОВОМ ГИДРОЛИЗАТЕ МЕТОДОМ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

#### Сущность работы

При получении аминокислот необходим постоянный и надежный контроль за составом белковых гидролизатов. Анализ основан на разделении компонентов вследствие их различных скоростей перемещения по хроматографической бумаге. Количественно аминокислоты определяют фотометрически после перевода компонентов в этанольный раствор. В качестве фотометрического реактива применяют сульфат меди (II).

#### Материалы и оборудование

1. Этиловый спирт, раствор с массовой долей 96 %.
2. 8-гидроксихиолин: 0,1 г препарата растворяют в 100 мл смеси бутилового спирта с уксусной кислотой и водой (4:1:2).
3. Растворитель: смесь бутилового спирта с уксусной кислотой и водой в объемном соотношении 4:1:5.
4. Проявитель: 200 мг нингидрина растворяют в 100 мл ацетона
5. Элюент: 10 мл раствора сульфата меди с массовой долей 0,005 % в этиловом спирте разбавляют 90 мл этилового спирта, получают раствор сульфата меди с массовой долей  $5 \cdot 10^{-4}$  %.
6. Аминокислоты: аспарагиновая, глутаминовая, валин – стандартные водные растворы с концентрацией 0,01 моль/л.
7. Анализируемый белковый гидролизат.
8. Хроматографическая камера.
9. Хроматографическая бумага, ватман № 2.
10. Фотоэлектроколориметр.
11. Кюветы с толщиной поглощающего слоя 1 см.
12. Аналитические весы.
13. Пульверизатор, сушильный шкаф, ножницы.
14. Микропипетка вместимостью 0,10 мл.
15. Пробирки.

### ***Выполнение работы***

*Подготовка хроматографической бумаги.* Для разделения аминокислот применяют бумагу, предварительно обработанную раствором 8-гидроксихинолина (при этом удаляются следовые количества катионов металлов). Листы бумаги, соответствующие по размеру хроматографической камере, помещают в раствор 8-гидроксихинолина. Через 1-2 мин бумагу подсушивают в сушильном шкафу при 105°C (работают в вытяжном шкафу!), помещают в хроматографическую камеру, закрепляют один конец в кювете с подвижным растворителем (элюентом). Растворитель пропускают по бумаге сверху вниз до полного удаления темноокрашенных гидроксихинолинов в течение 36-48 ч. Промытую бумагу сушат в вытяжном шкафу.

*Построение градуировочного графика.* Готовят водные растворы аминокислот с концентрацией 0,01 моль/л. Навески аминокислот, соответствующие 10 мл раствора этой концентрации, составляют для аспарагиновой кислоты 13,3, валина 11,7, глутаминовой кислоты 14,7 мг. Микропипеткой наносят на бумагу  $(5, 10, 15, 20) \cdot 10^{-3}$  мл стандартных растворов аминокислот порциями объемом по  $5 \cdot 10^{-3}$  мл на расстоянии 5 см от края с таким расчетом, чтобы каждая точка градуировочного графика соответствовала 0,05; 0,10; 0,15 и 0,20 мг аминокислоты. Раствор наносят на бумагу только после высушивания предыдущих капель. Оптимальной для выполнения работы является среда с pH 5,0-6,0, так как при этом устраняется ионизация аминокислот.

*Хроматографирование.* Разделение аминокислот проводят нисходящим методом. Конец бумаги, на котором нанесены капли растворов, помещают в кювету с подвижным растворителем так, чтобы пятна исследуемых растворов не погружались в растворитель. В качестве подвижного растворителя применяют верхний слой смеси бутилового спирта с уксусной кислотой и водой. Нижний слой смеси предназначен для насыщения камеры.

Для развития хроматограммы растворитель пропускают на  $\frac{2}{3}$  длины бумаги, затем хроматограмму высушивают и вторично пропускают через нее подвижный растворитель. Таким образом, хроматограмму обрабатывают 3 раза. Затем полоску бумаги высушивают и проявляют хроматограмму раствором нингидрина (опрыскивают из

пульверизатора). Проявленную хроматограмму нагревают 15-20 мин при 60 °С в сушильном шкафу. Расположение зон аминокислот по направлению движения растворителя (сверху вниз) следующее: аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, валин.

После развития хроматограммы вырезают участки пятен, занимаемые аминокислотами, сбоку хроматограммы вырезают контрольные участки, не содержащие аминокислот и равные по площади зонам определяемых соединений. Вырезанные участки бумаги измельчают ножницами и помещают в пробирки. В каждую пробирку добавляют по 10 мл элюента, объем доводят до 20 мл этиловым спиртом и встряхивают. Элюирование происходит в результате образования комплексного соединения аминокислот с  $\text{Cu (II)}$  оранжевого цвета, растворимого в этиловом спирте. Пробирки с элюатами помещают в затемненное место и оставляют на 1 ч, периодически перемешивая их содержимое.

*Определение концентрации аминокислот в белковом гидролизате.* Оптическую плотность экстрактов измеряют на фотоэлектроколориметре при  $\lambda=530$  нм. Контрольный раствор содержит все необходимые реактивы, кроме аминокислот. Строят градуировочный график в координатах оптическая плотность – концентрация аминокислот, моль/л. По графику находят концентрацию аминокислот в анализируемом белковом гидролизате.

## Лабораторная работа № 8

### ФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ ГЛИЦИНА В СРЕДЕ ЛЕДЯНОЙ УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

#### Сущность работы

В среде ледяной уксусной кислоты карбоксильные группы аминокислот блокируются. В результате становится возможным титрование аминокислот растворами сильных минеральных кислот за счет протонирования аминогруппы. Точку эквивалентности определяют с помощью индикатора тропеолина 00, изменяющего цвет раствора с желтого на фиолетовый. Изменение окраски регистрируют фотометрическим методом по оптической плотности раствора при 620 нм.

#### Материалы и оборудование

1. Уксусная кислота,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , ледяная.
2. Карбонат натрия безводный,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , кристаллический.
3. Хлорная кислота,  $\text{HClO}_4$ , 0,1 М раствор в ледяной уксусной кислоте.
4. Глицин,  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ , кристаллический.
5. Тропеолин 00, 0,1%-й раствор в ледяной уксусной кислоте.
6. Мерные колбы вместимостью 50,00 мл.
7. Пипетки вместимостью 5,00 мл.
8. Микробюретка вместимостью 5,00 мл.
9. Титратор фотоэлектрический.
10. Аналитические весы.

#### Выполнение работы

1. *Приготовление раствора  $\text{HClO}_4$  в ледяной уксусной кислоте.* Титрантом служит 0,1 М раствор  $\text{HClO}_4$  в ледяной уксусной кислоте. Для его приготовления в мерную колбу вместимостью 500 мл вносят 8,8 мл 43%-й  $\text{HClO}_4$ , растворяют в 100 мл безводной уксусной кислоты, приливая ее небольшими порциями при охлаждении. Затем прибавляют 35 мл уксусного ангидрида и оставляют на сутки в темном месте. После этого доводят объем в колбе до метки ледяной уксусной кислотой. Концентрацию раствора устанавливают по безводному карбонату натрия.

*Приготовление раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в ледяной уксусной кислоте.* Точную навеску  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  массой около 0,25 г помещают в фарфоровую чашку, прибавляют несколько капель безводной уксусной кислоты для превращения карбоната в ацетат и выпаривают досуха на водяной бане (под тягой!). Осадок растворяют в небольшом объеме ледяной уксусной кислоты, раствор переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят растворителем до метки.

*Стандартизация раствора титранта.* Пробу 5 мл полученного раствора карбоната натрия пипеткой с помощью резиновой груши переносят в стакан для титрования, служащий кюветой прибора, добавляют ледяную уксусную кислоту в таком количестве, чтобы уровень раствора в стакане был выше уровня окна, через которое проходит свет. Затем вводят 1-2 капли раствора индикатора и титруют из микробюретки раствором  $\text{HClO}_4$ , прибавляя его по 0,20 мл.

Титрование продолжают до тех пор, пока после резкого изменения показания прибора перестанут изменяться значения с добавлением каждой новой порции раствора. Строят кривую титрования в координатах показания прибора – объем титранта. Точку эквивалентности находят (рис. 2, кривая 1) как максимум на дифференциальной кривой, построенной в координатах  $(\Delta A/\Delta V) - V$  мл, где  $A$  – показания регистрирующего прибора в каждой точке титрования (рис. 2, кривая 2). Определяют объем титранта в точке эквивалентности и рассчитывают молярную концентрацию хлорной кислоты, учитывая навеску стандартного вещества и проведенные разбавления.

*2. Анализ исследуемого вещества.* Навеску глицина массой 0,3-0,4 г, взятую на аналитических весах, растворяют в ледяной уксусной кислоте в мерной колбе вместимостью 50 мл. Пробу 5 мл этого раствора помещают в стакан-кювету, добавляют ледяную уксусную кислоту до нужного объема, индикатор и титруют раствором хлорной кислоты так, как это делали при стандартизации титранта (п.1.). Строят кривую титрования, находят точку эквивалентности и рассчитывают массовую долю (%) аминоксусной кислоты в анализируемом препарате глицина. Проводят статистическую обработку полученных результатов.

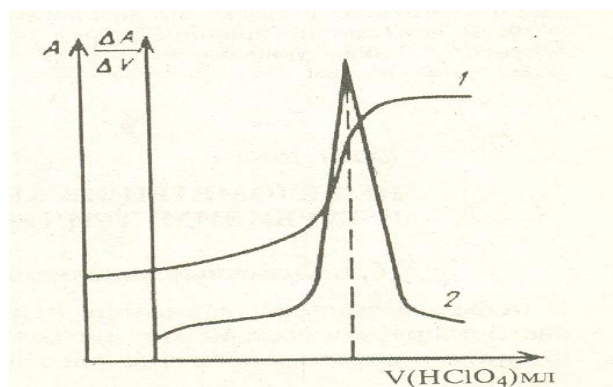


Рис. 2. Кривая фотометрического титрования глицина раствором хлорной кислоты в ледяной уксусной кислоте: 1 – интегральная кривая, 2 – дифференциальная кривая.



## Лабораторная работа № 9

### РАЗДЕЛЬНОЕ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

#### Сущность работы

Создание новых фармацевтических препаратов и пищевых продуктов, содержащих биологически активные вещества, диктует необходимость разработки экспрессных методик селективного определения отдельных их компонентов. Количественное определение фенилаланина, тирозина и триптофана в водных средах при совместном присутствии затруднено тем, что они характеризуются близкими максимумами светопоглощения.

#### Материалы и оборудование

1. Аминокислоты: фенилаланин, тирозин, триптофан.
2. Аналитические весы.
3. Спектрофотометр.
4. Кварцевые кюветы с толщиной поглощающего слоя 1 см.
5. Пипетки вместимостью 5,00 мл.
6. Мерные колбы вместимостью 100,00 мл.

#### Выполнение работы

*Построение градуировочных графиков.* Для выбора аналитической длины волны  $\lambda_{\text{ан}}$  снимают спектры поглощения растворов аминокислот в диапазоне длин волн 200 – 300 нм (строят график зависимости оптической плотности от длины волны). Для обеспечения низких пределов обнаружения и воспроизводимости получаемых результатов необходима максимальная величина молярного коэффициента светопоглощения;  $\lambda_{\text{ан}}$  выбирают на максимуме светопоглощения фотометрируемого раствора ( $l = 1\text{ см}$ ). Градуировочные графики для определения фенилаланина, тирозина и триптофана строят при длинах волн 257, 275 и 279 нм соответственно (рис. 3).

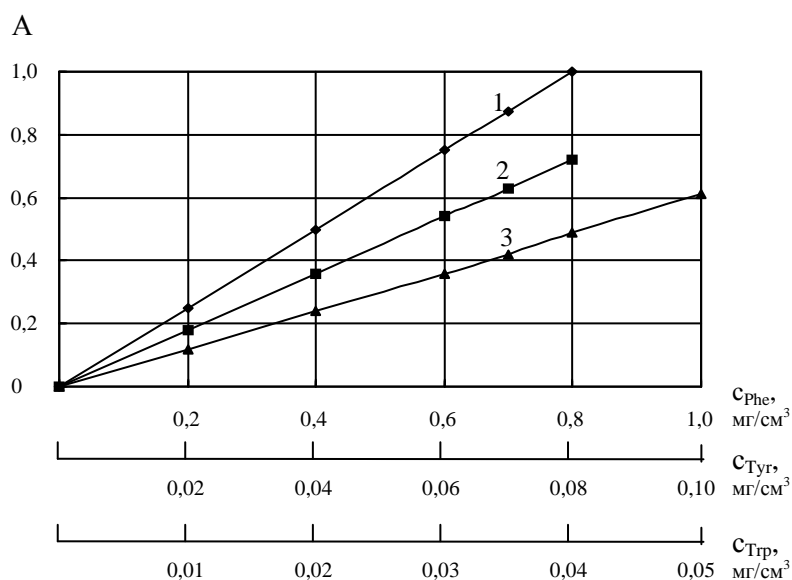


Рис. 3. Градуировочные графики для спектрофотометрического определения фенилаланина (1), тирозина (2) и триптофана (3) в водном растворе

*Определение аминокислот в анализируемых растворах.* В одной мерной колбе вместимостью 100,00 мл готовят раствор, содержащий 1,00 мг/мл фенилаланина и 0,10 мг/мл тирозина; в другой – 1,00 мг/мл фенилаланина и 0,10 мг/мл триптофана.

Фотометрируемые растворы предварительно разбавляют водой таким образом, чтобы оптическая плотность  $A$  находилась в пределах 0,2 – 0,6. Содержание аминокислот при их совместном присутствии определяют графически (рис. 4 и 5).

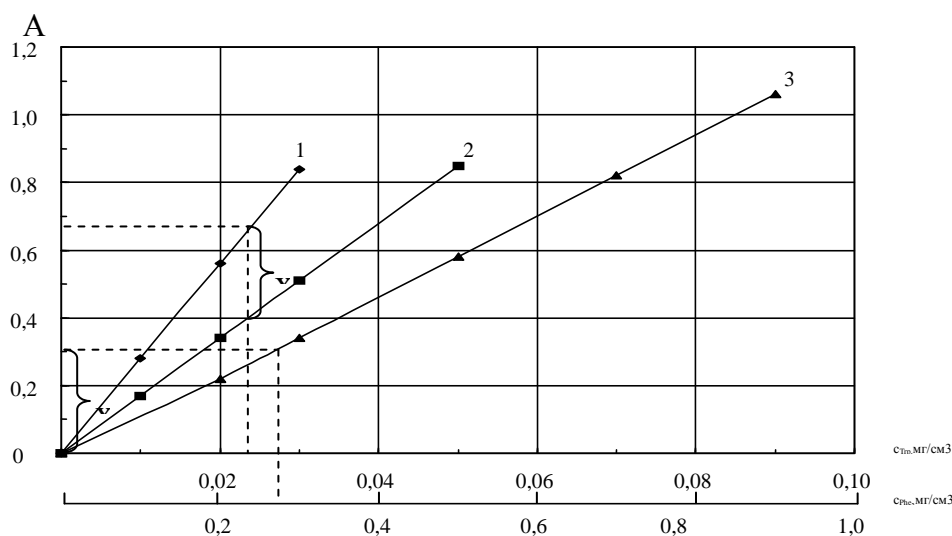


Рис. 4. Градуировочные графики для определения триптофана (1,  $\lambda = 279$  нм; 2,  $\lambda = 257$  нм) и фенилаланина (3,  $\lambda = 257$  нм) при совместном присутствии в водном растворе.

По оптической плотности одной из аминокислот находят ее концентрацию (например, триптофана при длине волны 279 нм на рис. 4), проводят перпендикуляр на градуировочную прямую, соответствующую этой аминокислоте при длине волны второго компонента (триптофана при длине волны 257 нм). Полученный отрезок (x) экстраполируют на ось оптической плотности и находят концентрацию раствора другой аминокислоты (фенилаланина при длине волны 257 нм). Аналогично находят концентрации тирозина и фенилаланина при совместном присутствии.

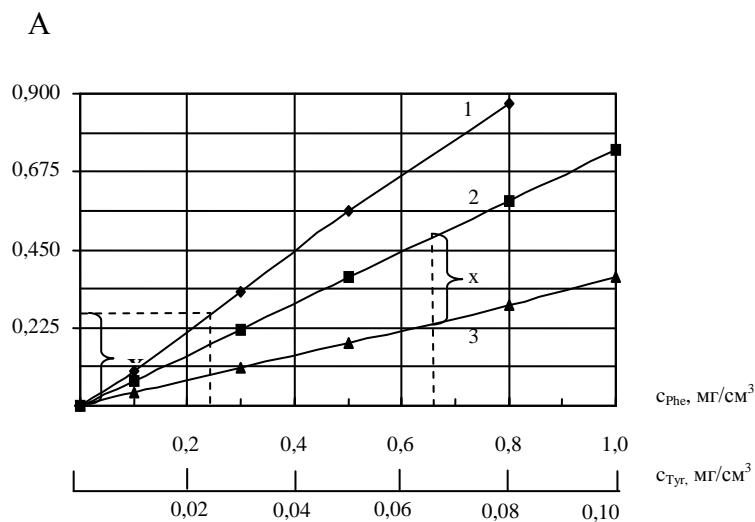


Рис. 5. Градуировочные графики для определения фенилаланина (1,  $\lambda = 257$  нм) и тирозина (2,  $\lambda = 275$  нм; 3,  $\lambda = 257$  нм) при совместном присутствии в водном растворе

## Лабораторная работа № 10

### ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА С ПОМОЩЬЮ ИК СПЕКТРОСКОПИИ

#### Сущность работы

Специфический вид ИК спектров белков определяется наличием в их структуре пептидных групп, собственные колебания которых обуславливают изменение дипольного момента молекулы, так как при этом затрагиваются связи СО и NH с большими дипольными моментами. В ИК спектрах белков наибольший интерес представляет исследование в областях, где расположены полосы колебаний пептидной группы – полосы поглощения Амид I, II, III, V, а также полосы валентных колебаний NH-групп. Характеристическая полоса поглощения Амид I ( $1610-1690\text{ см}^{-1}$ ) обусловлена валентными колебаниями групп C=O пептидной связи. Полоса Амид II ( $1490-1580\text{ см}^{-1}$ ) связана с деформационными колебаниями NH в плоскости пептидной группы. Полосы поглощения Амид III ( $1200 - 1300\text{ см}^{-1}$ ) и Амид V ( $580 - 700\text{ см}^{-1}$ ) обусловлены соответственно плоскими и неплоскими деформационными колебаниями NH – групп.

#### Материалы и оборудование

1. Бромид калия, KBr, кристаллический.
2. Этиловый спирт,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ .
3. Кристаллический альбумин.
4. Агатовая ступка, пестик.
5. Аналитические весы.
6. Пресс-форма, скальпели, пинцет, стеклянная лопатка.
7. Спектрофотометр Specord IR-75.
8. Термостат.

#### Выполнение работы

*Подготовка образцов белка для исследования методом ИК-спектроскопии.*

Монокристаллический бромид калия KBr растирают в агатовой ступке до состояния “пудры” и высушивают в термостате при  $150-160^\circ\text{C}$  до полного удаления следов воды. Проверяют чистоту растертого KBr и степень его высушивания по отсутствию полос поглоще-

ния в области  $4000 - 600 \text{ см}^{-1}$ . Сухой и чистый KBr в этом интервале выписывает прямую линию, колебания молекул гидратной воды проявляются в виде интенсивных полос поглощения в области  $3700-3300$ ,  $1640-1610$  и  $1400 \text{ см}^{-1}$ .

Навеску исследуемого образца в количестве  $1,5 \text{ мг}$  взвешивают со  $150 \text{ мг}$  подготовленного KBr (соотношение  $1:100$ ), тщательно перемешивают в агатовой ступке в течение  $10$  минут. Далее  $100 \text{ мг}$  смеси переносят в пресс-форму, равномерно распределяют по всему каналу с помощью стеклянной лопатки, пресс-форму закрывают и помещают под пресс (давление  $150 \text{ кг/см}^2$ ). Навеску прессуют в течение  $30$  минут, затем разбирают пресс-форму и с помощью пинцета переносят готовую таблетку в таблеткодержатель (правильно спрессованная таблетка абсолютно прозрачна и имеет постоянные размеры  $25 \times 4 \times 0,5 \text{ мм}$ ).

После изготовления таблетки пресс-форму необходимо очистить от следов галогенидов щелочных металлов во избежание коррозии рабочей поверхности: пресс-форму сначала протирают ватным тампоном, смоченным в дистиллированной воде, потом тампоном, смоченным в этиловом спирте, и тщательно протирают салфеткой из байки или хлопчатобумажной ткани для полного удаления следов влаги. Агатовую ступку, скальпели, пинцет и стеклянную лопатку после приготовления каждой таблетки промывают сначала дистиллированной водой, а затем спиртом для удаления следов образца.

#### *Запись и расшифровка спектрограммы.*

Включение, настройку и юстировку прибора проводят строго по инструкции. В рабочий канал спектрофотометра помещают таблеткодержатель с образцом белка, в канал сравнения – таблеткодержатель с таблеткой чистого KBr. Спектрограмму записывают на спектрофотометре Specord IR-75 в интервале частот  $4000 - 400 \text{ см}^{-1}$ , скорость записи –  $4,4 \text{ мин/лист}$ .

Полученные спектрограммы обрабатывают, рассчитывая точное положение максимумов поглощения. Интерпретацию спектров проводят, используя литературу.

## Лабораторная работа № 11

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИЗИНА В ВОДНОМ РАСТВОРЕ МЕТОДОМ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОГО ТИТРОВАНИЯ

#### Сущность работы

Лизин применяется в качестве биологически активной добавки при производстве хлебобулочных изделий. Способ определения лизина в водном растворе включает предварительное экстракционное извлечение бинарной смесью гидрофильных растворителей и потенциометрический анализ экстракта.

#### Материалы и оборудование

1. Лизин, квалификации «х.ч».
2. н. Бутиловый спирт, этилацетат квалификации «х.ч».
3. 0,01 М раствор КОН в этаноле.
4. Сульфат лития квалификации «ч.д.а».
5. Мерные цилиндры со шлифом (ГОСТ 1770-74) вместимостью 100 см<sup>3</sup>;
6. Вибросмеситель.
7. Аналитические весы.
8. Иономер И-130.

#### Выполнение работы

Анализируемый водный раствор лизина с концентрацией в интервале 0,1 – 1,0 мг/ см<sup>3</sup> насыщают сульфатом лития до содержания 25 мас.%. К 50 см<sup>3</sup> водно-солевого раствора лизина добавляют 5 см<sup>3</sup> смеси растворителей, содержащей 55 мас.% н.бутилового спирта и 45 мас.% этилацетата, экстрагируют на вибросмесителе до установления межфазного равновесия ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ). После экстракции органическую фазу отделяют и помещают в ячейку для потенциометрического титрования. Титруют 0,01 моль/дм<sup>3</sup> раствором КОН в безводном этиловом спирте. При кислотно-основном титровании в качестве индикаторного электрода применяют стеклянный, в качестве электрода сравнения – хлоридсеребряный, заполненный насыщенным этанольным раствором KCl. Для получения сопоставимых результатов стек-

лянный электрод в течение 12 ч вымачивают в органическом растворителе, на основе которого приготовлен анализируемый экстракт.

Электродвижущую силу экстракта измеряют на высокоомном потенциометре и строят дифференциальную кривую зависимости изменения ЭДС от объема титранта. По полученным данным рассчитывают содержание лизина в экстракте. Коэффициент распределения и степень извлечения аминокислот вычисляют по уравнениям:

$$D = \frac{C_o}{C_b} \times r, \quad (1)$$

где  $C_o$  и  $C_b$  – концентрации аминокислот в растворе до и после экстракции, моль/дм<sup>3</sup>,  $r$  – соотношение объемов равновесных водной и органической фаз.

$$R = \frac{D}{D + r} \cdot 100\% . \quad (2)$$

## Лабораторная работа № 12

### ЭКСТРАКЦИОННО-КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАЛИНА

#### Сущность работы

Определение валина включает предварительное экстракционное извлечение аминокислоты из водного раствора смесью гидрофильных растворителей в присутствии насыщенного раствора сульфата лития и кондуктометрический анализ концентрата. Способ применим для анализа промывных вод, образующихся после сорбционной очистки валина (ферментационный синтез).

#### Материалы и оборудование

1. Валин, квалификации «х.ч».
2. н. Бутиловый спирт, этилацетат квалификации «х.ч».
3. 0,01 М раствор КОН в этаноле.
4. Сульфат лития квалификации «ч.д.а».
5. Мерные цилиндры со шлифом (ГОСТ 1770-74) вместимостью 100 см<sup>3</sup>;
6. Вибросмеситель.
7. Аналитические весы.
8. Кондуктометр.

#### Выполнение работы

Исходный раствор валина с концентрацией 0,05 мг/см<sup>3</sup> насыщают сульфатом лития (25 мас. %) и добавляют предварительно приготовленную бинарную смесь гидрофильных растворителей, состоящую из 30 мас.% н. бутилового спирта и 70 мас.% этилацетата в соотношении раствор валина – смесь гидрофильных растворителей 10 : 1. После экстракции (10 – 15 мин) и расслаивания фаз экстракт отделяют и титруют 0,01 моль/дм<sup>3</sup> раствором КОН в безводном этиловом спирте. По результатам кондуктометрического титрования строят график зависимости электропроводности экстракта от объема затраченного титранта (пример кривой кондуктометрического титрования приведен на рис. 6).



Содержание валина в экстракте находят по уравнениям (1) и (2). Погрешность нескольких последовательных определений не должна превышать 5 %.

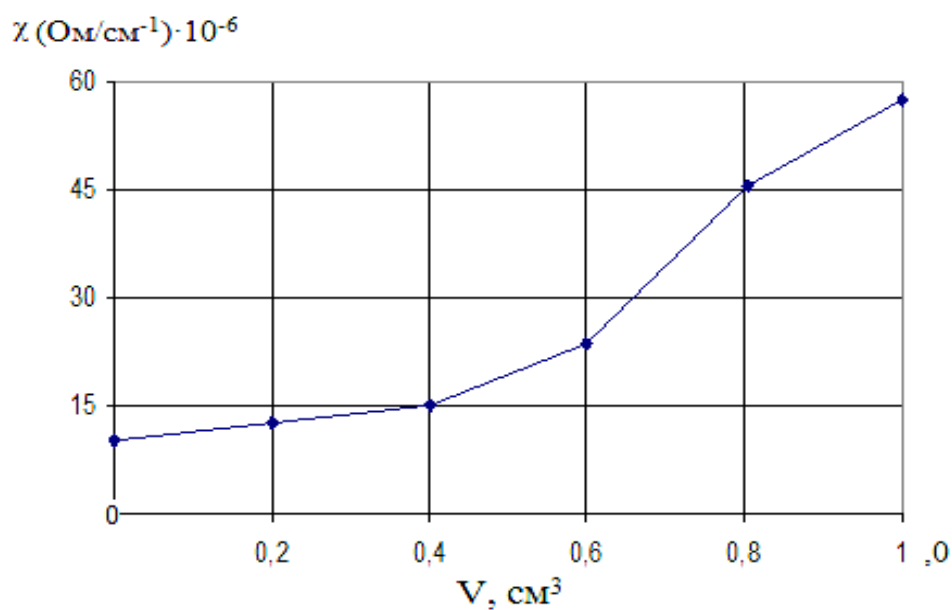


Рис. 6. Кондуктометрическое титрование валина в экстракте на основе н-бутилового спирта и этилацетата

## Лабораторная работа № 13

### АНАЛИЗ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА «МЕТИОНИН»

#### Сущность работы

Аминокислотный дисбаланс является одной из причин возникновения патологических процессов, дисфункций различных органов. Дефицит аминокислот вызывают многие факторы – нерациональное питание, заболевания желудочно-кишечного тракта, инфекции, стресс. Незаменимые аминокислоты не синтезируются в организме человека и поступают с пищей или в составе сбалансированных терапевтических средств (биологически активные добавки, витаминные комплексы, белковые смеси). Современная фармацевтическая промышленность выпускает препараты, содержащие одну или несколько аминокислот. В связи с возросшими объемами фальсификации лекарственных средств актуальность приобретает разработка способов определения аминокислот в составе фармацевтических препаратов.

Анализ включает предварительную подготовку образцов (удаление мешающих веществ, перевод определяемых компонентов в раствор), экстракционное извлечение и определение аминокислот методами потенциометрического титрования или капиллярного электрофореза непосредственно в экстрактах.

#### Материалы и оборудование

1. Таблетка препарата «МЕТИОН».
2. Раствор нингидрина.
3. Раствор гидроксида натрия с конц. 30 %.
4. Фильтр «белая лента».
5. Раствор нитропруссиды натрия с конц. 5%
6. 1 М раствор соляной кислоты.
7. н.бутиловый спирт, этилацетат и ацетон квалификации «х.ч.».
8. Сульфат лития квалификации «ч.д.а».
9. Растворы перекиси водорода с конц. 5 %, муравьиной кислоты с конц. 30 %, изопропанольный раствор фенилизотиоцианата.
10. Пробирки «Эппендорф»
11. Мерная колба вместимостью 30 см<sup>3</sup>;
12. Фарфоровая чашка.

13. Вибросмеситель.
14. Аналитические весы.
15. Прибор «Капель-105М».
16. Водяная баня «Экрос».

### **Выполнение работы**

Подлинность препарата определяют по характерным качественным реакциям согласно соответствующей фармакопейной статье [172].

Препарат (0,05 г) растворяют в 1 см<sup>3</sup> воды при нагревании, прибавляют 5 – 6 капель раствора нингидрина, появляется синефиолетовое окрашивание. Добавляют 5 – 6 капель раствора гидроксида натрия с массовой долей 30 % и нагревают в пробирке до получения сплава. Пробирку закрывают фильтровальной бумагой, смачивают 1 – 2 каплями свежеприготовленного раствора нитропруссид натрия с массовой долей 5%, на фильтровальной бумаге появляется красно-фиолетовое окрашивание.

К охлажденному сплаву препарата добавляют 5 см<sup>3</sup> воды и подкисляют разбавленной серной кислотой; появляется запах сероводорода и меркаптана. Отсутствие характерного окрашивания при реакциях с нингидрином и нитропруссидом натрия, а также запаха сероводорода и меркаптана при реакции с серной кислотой свидетельствуют об отсутствии метионина в анализируемом препарате.

*Подготовка аминокислотного препарата к анализу.* Таблетки взвешивают на аналитических весах и измельчают в ступке, предварительно удалив окрашенную оболочку. Точную навеску 6 измельченных таблеток, эквивалентную содержанию 150 мг действующего вещества (метионин), растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 30 см<sup>3</sup>, интенсивно перемешивают. Раствор фильтруют через фильтр «белая лента». Концентрация полученного раствора 5 мг/см<sup>3</sup>.

Отбирают 25 см<sup>3</sup> приготовленного раствора препарата «МЕТИОНИН», подкисляют HNO<sub>3</sub> до pH = 5,5 – 6,0 и добавляют 20 мас.% высаливателя (кристаллический сульфат лития). Предварительно готовят смесь гидрофильных растворителей, состоящую из 40 мас.% н.бутилового спирта, 10 мас.% этилацетата и 50 мас.% ацетона; 2,5 см<sup>3</sup> смеси добавляют к водно-солевому раствору метионина. Установлено, что при таком составе смеси растворителей достигается практи-

чески полное (98 %-ное) извлечение метионина из насыщенного водно-солевого раствора. Экстрагируют на вибросмесителе 5 мин, после расслаивания фаз (1 – 2 мин) экстракт отделяют, не захватывая водного слоя, анализируют методом капиллярного электрофореза на системе «Капель-105М».

В фарфоровую чашку помещают 3 см<sup>3</sup> экстракта, выпаривают, добавляют смесь окислителей (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : HCOOH = 1 : 9) и вновь выпаривают на водяной бане при 60 °С. Сухой остаток смачивают дистиллированной водой, добавляют раствор карбоната натрия и перемешивают. Затем прибавляют изопропанольный раствор фенилизотиоцианата, перемешивают до растворения осадка и выпаривают в струе теплого воздуха. Полученный после выпаривания сухой остаток растворяют в дистиллированной воде (500 мм<sup>3</sup>) и дозатором отбирают 450 мм<sup>3</sup> полученного раствора в пробирку «Эппендорф».

Анализ проводят на приборе «Капель-105М» с применением источника высокого напряжения положительной полярности со встроенным фотометрическим детектором,  $\lambda = 254$  нм.

Для записи и обработки полученных данных применяют программное обеспечение «Эльфоран». Анализ проводят при напряжении +23 кВ и температуре 30 °С. Для разделения аминокислот в капилляре к фоновому электролиту добавляют боратный буферный раствор (рН = 9,18). При таком рН аминокислоты существуют в виде анионов и таутомеров с биполярной ионизированной структурой, что делает возможным получение электрофореграммы с четким разрешением.

## Лабораторная работа № 14

### ФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ЛОУРИ

#### Сущность работы

Метод основан на реакции белков с реактивом Фолина, дающим синее окрашивание. Предварительно строят градуировочный график по альбумину. Изменение окраски регистрируют фотометрическим методом по оптической плотности раствора при 670 нм.

#### Материалы и оборудование

1. Карбонат натрия,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 2%-й раствор.
2. Гидроксид натрия,  $\text{NaOH}$ , 0,1 М раствор.
3. Сульфат меди,  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , 0,3%-й раствор.
4.  $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{Na}$
5. Реактив Фолина.
2. Кристаллический альбумин.
3. Мерные колбы вместимостью 1,00 л и 100, мл.
4. Пипетки градуированные вместимостью 10,00 мл.
5. Фотоэлектроколориметр КФК-2.
6. Кюветы с толщиной поглощающего слоя 10 мм.

#### Выполнение работы

*Приготовление растворов, необходимых для фотометрического определения белка.*

Раствор А. 2% -й раствор  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в 0,1 М растворе  $\text{NaOH}$ .

Раствор В. 0,3%-й раствор  $\text{CuSO}_4$  в 1%-м растворе двузамещенного виннокислого натрия ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{Na}$ ).

Раствор С. Опытный раствор, готовят в день определения (годен в течение одного дня), смешивая 50 мл раствора А и 1 мл раствора В.

*Реактив Фолина.* 100 мг вольфрамата натрия ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) растворяют в 700 мл воды, добавляют 50 мл 80% -го раствора ортофосфорной и 100 мл соляной кислот. Смесь кипятят в течение 10 часов с обратным холодильником в вытяжном шкафу. После этого в колбу добавляют 150 г сульфата лития, 50 мл дистиллированной воды и 5 капель бромной воды. Смесь кипятят 15 мин в вытяжном шкафу для удаления избытка брома, охлаждают и доводят до 1

л. Реактив фильтруют и хранят в темной склянке с притертой пробкой.

Раствор D. Реактив Фолина, разбавленный водой в соотношении 1:1.

Контрольная проба. 2,0 мл раствора С + 0,4 мл  $\text{H}_2\text{O}$ .

*Построение градуировочного графика.*

100 мг чистого белка (кристаллический альбумин) растворяют в 100 мл 0,1 М раствора NaOH (1 мл содержит 1 мг белка). В 9 мерных колб на 100 мл приливают раствор белка в возрастающих количествах: 0,5 мл, а затем от 1,0 до 8,0 мл. Раствор в колбах доводят водой до метки, перемешивают и из каждой колбы отбирают по 0,4 мл для определения концентрации белка. По полученным данным строят градуировочный график.

*Определение белка в анализируемом растворе.*

К 0,4 мл раствора белка добавляют 2 мл раствора С. Смесь перемешивают и через 10 мин приливают к ней 0,2 мл рабочего раствора Фолина. Интенсивность окраски определяют на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром, в кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм при длине волны 670 нм через 30 мин. Количество белка находят по градуировочному графику.

## **ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ МЕТОДОМ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ СТАТИСТИКИ**

Реальное число ( $n < 20$ ) результатов эксперимента называют выборочной совокупностью, где  $n$  – варианта.

Перед обработкой данных с применением математической статистики выявляют промахи и исключают их из числа полученных результатов выборочной совокупности, для чего используют простой метод с применением Q-критерия. Суть метода заключается в расчете величины  $Q_{\text{эксп.}}$ , равной отношению разности выпадающего и ближайшего к нему результата к размаху варьирования (разности наибольшего и наименьшего из результатов выборочной совокупности) и в сравнении  $Q_{\text{эксп}}$  с критическим значением  $Q_{\text{крит}}$  при доверительной вероятности  $P=0,90$ . Если  $Q_{\text{эксп.}} > Q_{\text{крит}}$ , выпадающий результат является промахом и его отбрасывают; при  $Q_{\text{эксп.}} < Q_{\text{крит}}$  результат не отбрасывают.

Таблица 2.

Значения Q-критерия (доверительная вероятность  $P=0,90$ ).

n	Q <sub>крит</sub>	n	Q <sub>крит</sub>
3	0,94	7	0,51
4	0,76	8	0,47
5	0,64	9	0,44
6	0,56	10	0,41

При обработке данных рассчитывают следующие основные характеристики выборочной совокупности.

*Среднее* для выборки из n результатов

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}.$$

*Дисперсию*, характеризующую рассеяние результатов относительно среднего

$$V = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}.$$

В знаменателе последней формулы стоит число, равное n-1. Оно представляет собой число степеней свободы и в общем случае обозначается как f. f – это число независимых данных (n) в выборочной совокупности минус число связей между ними ( $f = n-1$ ).

*Стандартное отклонение*

$$S = \sqrt{V} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}.$$

*Относительное стандартное отклонение*

$$S_r = \frac{S}{\bar{x}}$$

Дисперсия, стандартное отклонение и относительное стандартное отклонение характеризуют *воспроизводимость* (случайные ошибки) результатов химического анализа.

При обработке данных химического анализа обычно определяют также величину *доверительного интервала* измеряемой величины ( $\varepsilon$ ) для заданной доверительной вероятности (при отсутствии систематических погрешностей в этом интервале с соответствующей вероятностью).

стью находится истинное значение  $x_{\text{ист}}$ ). Этот интервал рассчитывают, используя выражение

$$\varepsilon = \bar{x} - x_i = \pm \frac{t_{p,f} S}{\sqrt{n}},$$

где  $t_{p,f}$  – коэффициент распределения Стьюдента;

$S$  – стандартное отклонение, рассчитанное для выборочной совокупности из  $n$  данных.

Доверительную вероятность  $P$  обычно принимают равной 0,95, хотя в зависимости от характера решаемой задачи она может быть равной 0,90 или 0,99. Если известно истинное значение  $x_{\text{ист}}$ , то доверительный интервал характеризует как воспроизводимость результатов химического анализа, так и их правильность. Если  $x_{\text{ист}}$  неизвестно, то доверительный интервал  $\varepsilon$  характеризует только воспроизводимость результатов, причем

$$\varepsilon_r = \frac{\varepsilon}{x}.$$

Таблица 3.

Значения  $t$  для доверительной вероятности  $P=0,95$ .

Число степеней свободы, $f$	$t_{0,95,f}$	Число степеней свободы, $f$	$t_{0,95,f}$
1	12,70	6	2,45
2	4,30	7	2,37
3	3,18	8	2,31
4	2,78	9	2,26
5	2,57	10	2,23

По формулам, приведенным выше, рассчитывают величины стандартного отклонения  $S$ , относительного стандартного отклонения  $S_r$  и дисперсии  $V$ . Затем по таблице 3 находят величину  $t_{0,95,f}$  для  $n$  вариантов и рассчитывают доверительный интервал

$$\varepsilon = t_{0,95,f} \frac{S}{\sqrt{n}}.$$



4. Результаты математической обработки данных заносят в таблицу

Таблица 4.

N	$\bar{x}$	S	V	$S_r$	$\varepsilon$	$\bar{x} \pm \varepsilon$

Формулы справедливы только при выполнении трех условий: а) методика измерений не дает систематических погрешностей; б) результаты измерений в генеральной совокупности подчиняются нормальному распределению, независимы друг от друга и равноточны; в) отсутствуют грубые промахи.

## Вопросы для самоконтроля

1. Каково происхождение аналитического сигнала в электрохимических методах анализа?
2. На чем основаны потенциометрические методы анализа?
3. Что такое равновесный потенциал? Как нужно проводить измерение потенциала индикаторного электрода, чтобы его величину можно было принять равной равновесному?
4. Какая зависимость выражается уравнением Нернста?
5. Какие функции выполняют индикаторные электроды и какие – электроды сравнения? Назовите основные требования к индикаторному электроду и электроду сравнения.
6. Как устроен стеклянный электрод? Какие достоинства и недостатки он имеет?
7. В каких координатах строят кривые потенциометрического титрования?
8. В чем сущность метода вольтамперометрии?
9. Почему вещество, участвующее в электродной реакции, называют деполяризатором?
10. Почему величина  $E_{1/2}$  характеризует природу деполяризатора?
11. Как взаимосвязаны потенциал полуволны и предельный (диффузионный) ток?
12. Как рассчитать потенциал полуволны на основании вольтамперной кривой?
13. От чего зависит величина предельного тока?
14. Какие аналитические приемы используют в количественном вольтамперометрическом анализе?
15. Каковы характерные особенности ячейки для вольтамперометрических измерений и чем они обусловлены?
16. В чем сущность кондуктометрического анализа?
17. Как влияет на электрическую проводимость: природа электролита и растворителя; концентрация электролита (сильного, слабого); температура?
18. В каких случаях применяют метод прямой кондуктометрии? Каковы особенности кондуктометрического титрования? Каков метод более селективен? Почему?
19. Каковы достоинства и недостатки кондуктометрического метода анализа?

20. Каковы особенности ячейки для измерения электрической проводимости?
21. Какими уравнениями выражается основной закон светопоглощения Бугера-Ламберта-Бера?
22. Каков физический смысл молярного коэффициента поглощения? Какие факторы на него влияют?
23. Что называют спектром поглощения вещества и в каких координатах его можно представить?
24. Какова природа светопоглощения в ультрафиолетовом, видимом участках спектра?
25. При каких оптимальных значениях оптической плотности обеспечивается наименьшая относительная погрешность измерения?
26. В чем сущность метода градуировочного графика и каковы его особенности?
27. Как снизить предел обнаружения фотометрическими методами?
28. Каковы особенности инфракрасных спектров? Какова природа светопоглощения в инфракрасном участке спектра?
29. Приведите схему ИК спектрофотометра.
30. Что такое характеристическая частота? Приведите примеры.
31. Какие колебания называются валентными, деформационными?
32. Чем отличаются симметричные колебания от асимметричных?
33. В чем сущность метода бумажной хроматографии? Каковы преимущества данного метода?
34. Какие требования предъявляются к бумаге, используемой в качестве носителя?
35. Какие требования предъявляются к растворителям, применяемым в БХ?
36. Почему пятно пробы на стартовой линии в бумажной хроматографии должно иметь минимальные размеры?
37. Как проводится качественный анализ в методе бумажной хроматографии?
38. В чем заключаются особенности количественной обработки хроматограмм в методе БХ?
39. На чем основано определение аминокислот в методе капиллярного электрофореза?

40.Перечислите основные варианты капиллярного электрофореза.

41.Какой буферный раствор применяют для разделения аминокислот в кварцевом капилляре?

42.Какие требования к ведущему электролиту предъявляют в методе капиллярного электрофореза?

## Список литературы

1. Васильев В.П. Практикум по аналитической химии: учеб. пособие для вузов / В.П.Васильев, Р.П.Морозова, Л.А.Кочергина. – М.: Химия, 2000. 328 с.
2. Основы аналитической химии. Практическое руководство: учеб. пособие для вузов / Под ред. Ю.А.Золотова. – М.: Высш.шк., 2001. 463 с.
3. Коренман Я.И. Практикум по аналитической химии. Анализ пищевых продуктов. Кн. 3. Электрохимические методы анализа. – М.: КолосС, 2005. – 232 с.
4. Коренман Я.И. Практикум по аналитической химии. Анализ пищевых продуктов. Кн. 4. Хроматографические методы анализа. – М.: КолосС, 2005. – 296 с.
5. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. – М.: Химия, 1979. – 480 с.
6. Вершинин В.И. Планирование и математическая обработка результатов химического эксперимента / В.И. Вершинин, Н.В.Перцев. – Омск: Изд-во ОмГУ. – 2005. – 216 с.
7. Дэвени Т. Аминокислоты, пептиды и белки: пер. с англ. / Т. Дэвени, Я. Гергей – М., 1976. – 256 с.
8. Жеребцов Н.А. Биохимия / Н.А. Жеребцов, Т.Н. Попова, В.Г. Артюхов. – Воронеж: Изд-во Воронежского госуниверситета, 2002. – 296 с.
9. Чиргадзе Ю.Н. Инфракрасные спектры и структура полипептидов и белков / Ю.Н. Чиргадзе. – М.: Наука, 1965. – 136 с.
10. Казицына Л.А. Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии / Л.А. Казицына, Н.Б. Куплетская. – М.: Высшая школа, 1971. – 264 с.
11. Комарова Н. В., Каменцев Я. С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ» – СПб.: ООО «Веда», 2006. – 212 с.
12. О введении в действие отраслевого стандарта [электронный ресурс] / ОСТ 91500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения». [www.stroy.h11.ru/str/law/doc00304.html](http://www.stroy.h11.ru/str/law/doc00304.html)

13. Мокшина, Н.Я. Экстракция аминокислот и витаминов [Текст] / Н.Я. Мокшина. – Воронеж: Воронеж. гос. технол. акад., 2007. – 246 с.
14. Сарафанова, Л. А. Пищевые добавки: Энциклопедия [Текст] / Л. А. Сарафанова. – СПб: ГИОРД, 2003. – 688 с.
15. Березов Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 2004. – 703 с.
16. Комов В.П., Шведова В.Н. Биохимия. – М.: Дрофа, 2004. – 638 с.
17. Цыплухина Ю.В. Экстракция  $\alpha$ -аминокислот с ароматическими заместителями синергетическими водорастворимыми полимерами [Текст]: автореф. дис...канд. хим. наук / Ю.В. Цыплухина. – Воронеж: ВГУ, 2006. – 20 с.
18. Ворохобина Н.В. Новые возможности метаболической терапии у пациентов с сахарным диабетом 1 и 2 типа [Текст] / Н.В. Ворохобина, А.В. Кузнецова // Рус. мед. журнал. Эндокринология. – 2010. – Т. 18, № 28. – С. 1 – 2.
19. Ивашев М.Н. Биологическая активность соединений из растительных источников [Текст] / М.Н. Ивашев // Фундаментальные исследования. – 2013. – №10. Ч.7. – С. 1482 – 1484.
20. Быковский Д.В. Экстракция метионина в двухфазных водно-солевых системах с циклическими поли-N-виниламидами [Текст] / Д.В. Быковский, Н.Я. Мокшина, В.А. Кузнецов, Т.Н. Пояркова, Г.В. Шаталов // Изв. вузов. Химия и химич. технология. – 2014. – Т.57, № 7. – С.73 – 77.
21. Шкинев В.М. Экстракция биологически активных веществ в двухфазных водных системах на основе поли-N-винил-пирролидона [Текст] / В.М. Шкинев, Н.Я. Мокшина, В.Ю. Хохлов, Б.Я. Спиваков // Докл. акад. наук. – 2013. – Т.448, № 4. – С.427 – 429.
22. Мокшина Н.Я. Общая методология межфазного распределения аминокислот и водорастворимых витаминов в разнохарактерных экстракционных системах [Текст] / Н.Я. Мокшина, Д.В. Быковский, Г.В. Шаталов, О.А. Пахомова // Конденсир. среды и межфазн. границы. – 2013. – Т.15, № 4. – С. 423 – 427.
- 23.11. Кирш Ю.Э. Поли-N-винилпирролидон и другие поли-N-виниламиды [Текст] / Ю.Э. Кирш. – М.: Наука, 1998. – 254 с.
- 24.12. Зыков А.В. Экстракционное разделение витаминов группы В синтетическими водорастворимыми полимерами [Текст] / А.В. Зыков,

Я.И. Коренман, Н.Я. Мокшина // Аналитика и контроль. –2011. – Т.15, № 1. – С. 96 – 101.

25.Дорос Р. Справочник биохимика [Текст] / Р. Дорос, Д. Элиот, К. Джонс. – М.: Мир, 1991. – 544 с.

26.Пахомова О.А. Новые экстракционные системы для определения  $\alpha$ -аминокислот в водных средах: дис...канд. хим. наук. – Саратов: Саратов. гос. ун-т. – 2007. – 151 с.

27.Коренман И. М. Экстракция в анализе органических веществ [Текст] / И. М. Коренман. – М.: Химия, 1979. – 200 с.

Учебное пособие

Пахомова Оксана Анатольевна,  
Мокшина Надежда Яковлевна

# **ПРАКТИКУМ ПО АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКОВ**

Учебное пособие

*Технический редактор – О. А. Ядыкина  
Техническое исполнение - В. М. Гришин*

Лицензия на издательскую деятельность  
ИД № 06146. Дата выдачи 26.10.01.  
Формат 60 x 84 /16. Гарнитура Times. Печать трафаретная.  
Печ.л. 4,5 Уч.-изд.л. 4,2  
Тираж 500 экз. (1-й завод 1-50 экз.). Заказ 94

Отпечатано с готового оригинал-макета на участке оперативной полиграфии  
Елецкого государственного университета им. И.А.Бунина

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Елецкий государственный университет им. И.А. Бунина»  
399770, г. Елец, ул. Коммунаров, 28,1