

Zajęcia nr 9 Analiza jakościowa związków organicznych (cz.3)

Analiza związków zawierających azot: amin, aminokwasów, białek, nitrozwiązków

1. Zakres materiału:

1. Budowa, nazewnictwo i podstawowe właściwości chemiczne:
 - a) amin alifatycznych i aromatycznych: rzędowność, zasadowość, reaktywność (charakter nukleofilowy), tworzenie soli diazoniowych, właściwości soli diazoniowych,
 - b) związków nitrowych – struktury rezonansowe, redukcja wodorem,
 - c) aminokwasów – podział oraz wzory strukturalne α-aminokwasów, stosowane zapisy skrótowe, jon obojnaczy, punkt izoelektryczny,
 - d) białek – struktura wiązania peptydowego, struktury białek, wysalanie, denaturacja – czynniki powodujące denaturację.
2. Wykrywanie grup funkcyjnych na podstawie reakcji charakterystycznych:
 - a) aminy – badanie odczynu (zasadowość amin), tworzenie soli amoniowych, rozróżnianie rzędowności (reakcje z kwasem azotowym(III) i ninhydryną, działanie odczynnikami Okhumi), reakcje zagotowania i sprzęgania soli diazoniowych,
 - b) aminokwasy i białka – reakcje z NaHCO_3 i kwasem azotowym(III), reakcja ninhydrynowa, próby na wykrywanie aminokwasów (ksantoproteinowa, cystynowa, Sakaguchi, Pauly'ego, Adamkiewicza-Hopkinsa), reakcje strąceniowe białek (wysalanie, działanie soli metali ciężkich, denaturacja), tworzenie związków kompleksowych aminokwasów i białek z jonami miedzi(II) – reakcja biuretowa Piotrowskiego,
 - c) związki nitrowe – reakcje z: ługiem sodowym, aldehydami, aminami aromatycznymi; rozróżnianie rzędowności alifatycznych nitrozwiązków

2. Literatura:

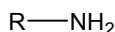
- John McMurry, *Chemia organiczna*, (Wydawnictwo Naukowe PWN, 2005),
- Harold Hart, *Chemia organiczna. Krótki kurs*, (Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2008).

3. Teoria

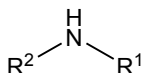
Aminy

Aminy można uważać za pochodne amoniaku, w którym jeden lub kilka atomów wodoru zostało zastąpionych resztami alkilowymi lub aryłowymi. Aminy są klasyfikowane na podstawie liczby podstawników alkilowych lub arylowych związanych z atomem azotu:

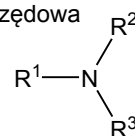
AMINY: I-rzędowa



II-rzędowa



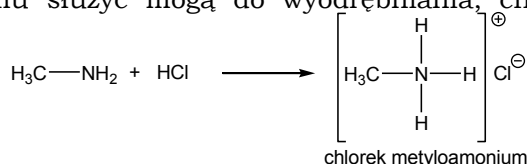
III-rzędowa



Aminy mogą występować w postaci gazowej, ciekłej lub stałej. Aminy odznaczają się charakterystycznymi zapachami, często podobnymi do zapachu amoniaku lub ryb. Niskocząsteczkowe aminy alifatyczne podobnie jak amoniak rozpuszczają się dobrze w wodzie, źle zaś w organicznych rozpuszczalnikach niepolarnych. Aminy zawierające łańcuchy alifatyczne o długim łańcuchu węglowym lub aromatyczne o większej masie cząsteczkowej są w wodzie praktycznie nierozpuszczalne.

Aminy wykazują charakter zasadowy i to – w przypadku amin alifatycznych – nieco silniejszy niżeli ich substancja macierzysta, jaką jest amoniak. Ten silniejszy od amoniaku charakter zasadowy wynika z obecności grup alkilowych (dodatni efekt indukcyjny) przy atomie azotu. Wolna para elektronowa atomu azotu w aminach warunkuje jej elektronodonorowe właściwości i określa zdolności do wiązania protonów odszczepionych od cząsteczek kwasów, co świadczy o zasadowych właściwościach związku.

Aminy tworzą z kwasami sole. Większość soli odznacza się wyraźną formą krystaliczną, dzięki czemu służyć mogą do wyodrębniania, charakterystyki i identyfikowania amin.

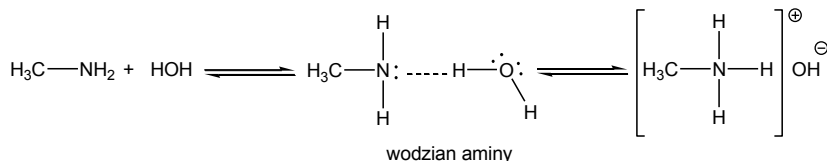


Projekt „Przedmioty przyrodnicze – kluczem do zawodów przyszłości”. Wyższa jakość kształcenia przedmiotów chemiczno-biologicznych w I LO w Białymstoku dzięki nauczaniu poprzez eksperyment i współpracy z jednostką naukowo-badawczą”

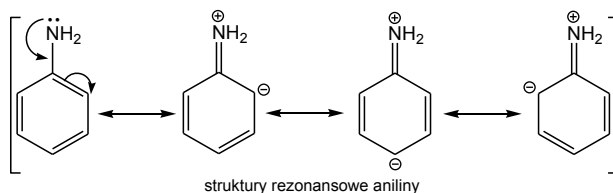
współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Podlaskiego na lata 2014-2020

2 | Strona

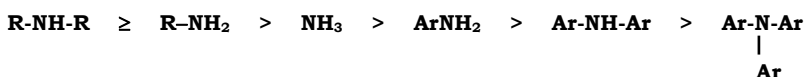
Aminy alifatyczne reagują nie tylko z protonami powstałymi z dysocjacji kwasów, lecz również „wymuszają” dysocjację wody. Wytworzony jon OH^- powoduje, że roztwory amin posiadają odczyn alkaliczny. Powstający wodzian aminy $\text{CH}_3\text{NH}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ jest analogiczny do wodzianu amoniaku $\text{NH}_3 \times \text{H}_2\text{O}$.



Aminy aromatyczne mogą przyłączać protony wytworzone w wyniku dysocjacji kwasów, nie powodują natomiast dysocjacji wody. Mają dużo słabsze właściwości zasadowe niż amoniak, nie barwią papierka lakmusowego. Powodem tego jest obecność pierścienia aromatycznego i zachodzący efekt rezonansowy w cząsteczce z udziałem wolnej pary elektronowej atomu azotu, w efekcie na atomie azotu pojawia się ładunek dodatni.



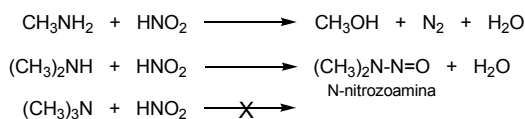
Zasadowy charakter amin jest najwyraźniejszy w przypadku drugorzędowych amin alifatycznych, a najsłabszy w przypadku trzeciorzędowych amin aromatycznych.



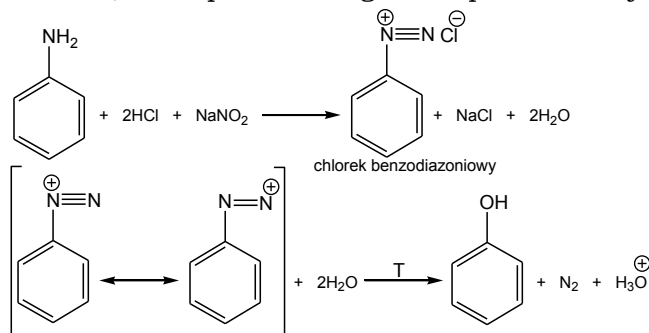
Badanie rzędowości amin

1. Reakcja z kwasem azotowym(III)

Kwas azotowy(III) (HNO_2) działa na aminy w sposób bardzo charakterystyczny, dzięki czemu możemy określić ich rzędowość. Aminy alifatyczne I-rzędowe pod jego wpływem tworzą, nawet w niskich temperaturach, alkohole i wydzielają azot oraz wodę. Drugorzędowe aminy alifatyczne tworzą N-nitrozoaminy (substancje nierozpuszczalne w wodzie, o charakterze oleistych cieczy), natomiast alifatyczne aminy III-rzędowe nie reagują z kwasem azotowym(III).



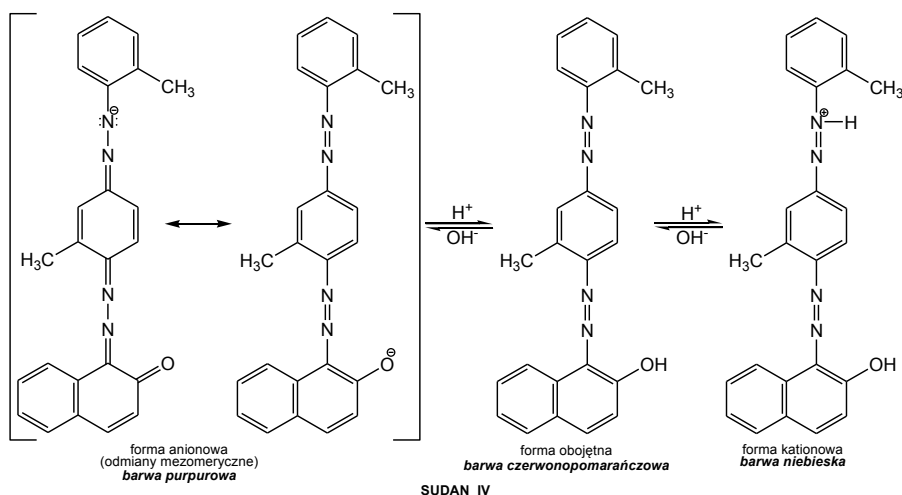
Kwas azotowy(III) działa również specyficznie na aminy aromatyczne, zwłaszcza na I-rzędowe, dając sole diazoniowe, które po lekkim ogrzaniu przekształcają się w fenole wydzielając wolny azot.



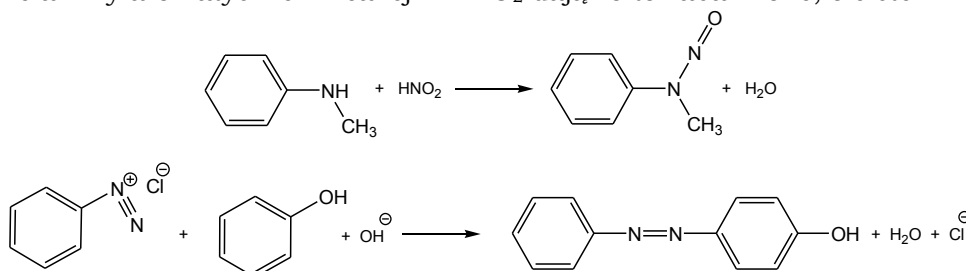
3 | Strona

Te same sole diazoniowe w obniżonej temperaturze (0°C) i zasadowym środowisku ulegają reakcji sprzęgania z fenolami lub aminami aromatycznymi tworząc barwne związki azowe.

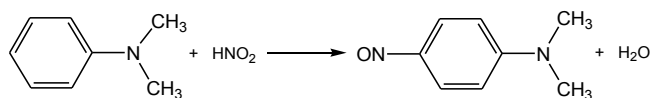
Uwaga: Grupa azowa jest silnym chromoforem, a połączona z dwoma rodnikami arylowymi tworzy trwałe azozwiązki charakteryzujące się bogatą paletą barw (od żółtej do czarnej). Większość barwników azowych posiada zabarwienie czerwone lub zbliżone do czerwonego (żółtopomarańczowe, pomarańczowe, czerwone, purpurowe, bordowe). Jest to ważna cecha rozpoznawcza barwników azowych. Odpowiednią barwę otrzymuje się stosując różne kombinacje soli diazoniowych, amin oraz fenoli o różnej budowie. Barwniki azowe zawierają również inne polarne grupy, pogłębiające barwę, zapewniające rozpuszczalność w wodzie i poprawiające wiązanie się barwnika z barwionym materiałem. **Barwniki azowe pod wpływem kwasów i zasad zmieniają barwę i niektóre z nich mogą być wykorzystywane jako wskaźniki kwasowo-zasadowe:**



Drugorzędowe aminy aromatyczne w reakcji z HNO_2 dają żółto zabarwione, oleiste N-nitrozoaminy.



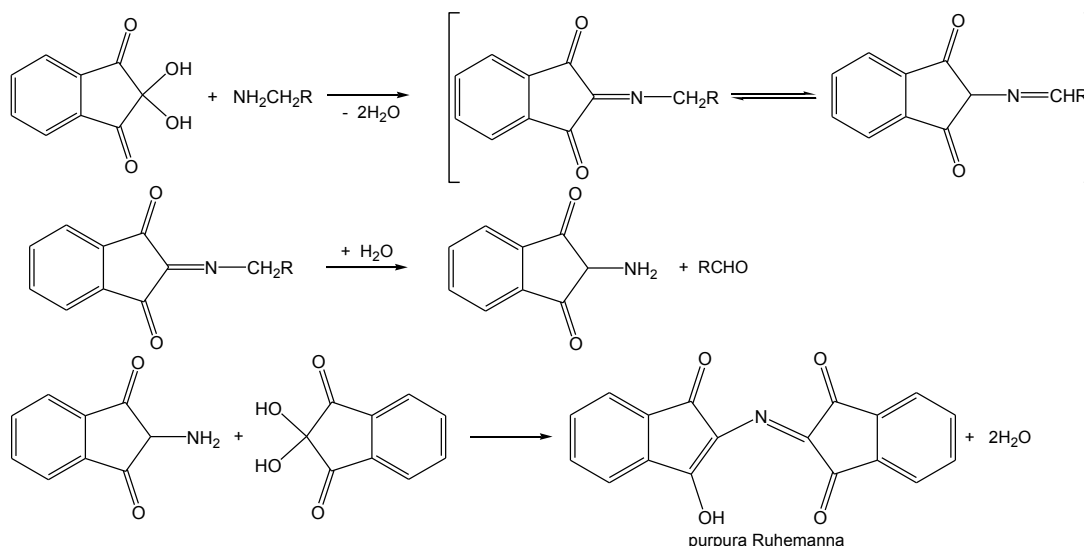
Natomiast III-rzędowe aminy aromatyczne w reakcji z kwasem azotowym(III) tworzą barwne pochodne p-nitrozowe.



Kwas azotowy(III) nie działa na heterocykliczne zasady III-rzędowe (pirydyna, pirymidyna itp.).

2. Reakcja z ninhydryną

Inną reakcją, która pozwala na rozróżnienie rzędowości amin jest reakcja z ninhydryną. Ninhydryna (wodzian triketoindanu) reaguje na zimno z I-rzędowymi aminami alifatycznymi z wytworzeniem fioletowego barwnika tzw. purpury Ruhemanna. Jest to bardzo czuła reakcja, stosowana do wykrywania minimalnych ilości amin i aminokwasów.



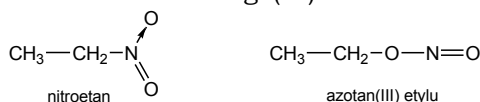
Drugorzędowe aminy alifatyczne reagują z ninhydryną po ogrzaniu z wytworzeniem związków o zabarwieniu żółtym, brązowym lub bordowym. Budowa większości tych związków nie jest znana. Trzeciorzędowe aminy alifatyczne nie reagują z ninhydryną, nie reagują z nią też żadne aminy aromatyczne.

3. Reakcja z odczynnikiem Okhuma

Reakcja Okhuma jest reakcją charakterystyczną trzeciorzędowych amin alifatycznych. Odczynnik Okhuma otrzymywany jest przez rozpuszczenie na gorąco 1 g kwasu cytrynowego w 100 cm³ bezwodnika octowego. Chemizm reakcji nie jest znany, powstają połączenia o barwie czerwonej.

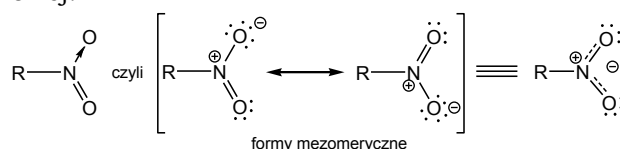
Związki nitrowe

Związki nitrowe są to pochodne związków organicznych, które posiadają grupę -NO₂ połączoną z atomem węgla łańcucha alifatycznego lub aromatycznego. Związki nitrowe są izomerami strukturalnymi estrów kwasu azotowego(III).



W zależności od charakteru fragmentu węglowodorowego, z jakim jest związana grupa nitrowa, związki nitrowe dzielimy na alifatyczne i aromatyczne. Ze względu na rzędowość atomu węgla odróżniamy związki nitrowe I-rzędowe, II-rzędowe oraz III-rzędowe. Aromatyczne nitrozwiązki mogą być tylko III-rzędowe.

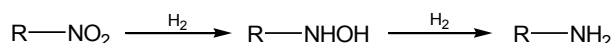
Strukturę grupy nitrowej można przedstawić za pomocą wzorów granicznych struktur mezomerycznych. Rysując wzory związków nitrowych należy stosować właśnie te formy w celu przedstawienia grupy nitrowej.



Związki nitrowe alkanów otrzymuje się stosunkowo trudno. Reaktywność atomów węgla alkanów w bezpośrednim nitrowaniu jest zależna od rzędowości i zmienia się następująco: III-rzędowy > II-rzędowy > I-rzędowy.

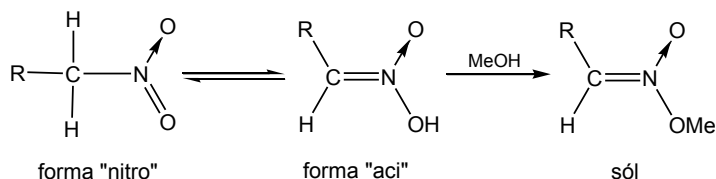
Alifatyczne nitrozwiązki ulegają następującym reakcjom chemicznym:

1. Redukcji wodorem *in statu nascendi* w środowisku kwaśnym dając początkowo hydroksyloaminy, a następnie odpowiednie aminy.

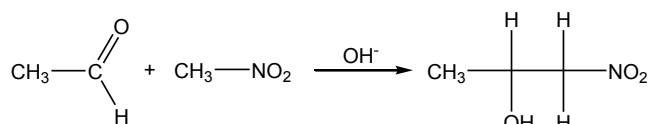


5 | Strona

2. Z mocnymi zasadami tworząc sole rozpuszczalne w wodzie; właściwość ta jest wykorzystywana w celu ustalenia rzędowości związków nitrowych. Alifatyczne związki nitrowe I- i II-rzędowe są obojętne, jednak można je zaliczyć do mocnych kwasów. Są zdolne do tautomerii i mogą występować w formie „nitro” oraz „aci”. Związki nitrowe III-rzędowe (w tym aromatyczne) nie tworzą soli z metalami.

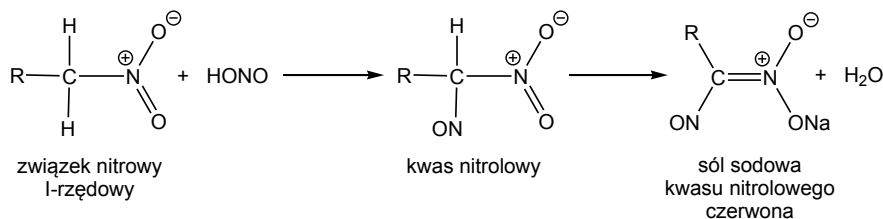


3. Kondensacji typu aldolowego z połączeniami karbonyłowymi, szczególnie z aldehydami; nitroalkany I- i II-rzędowe przekształcają się w odpowiednie nitroalkohole.



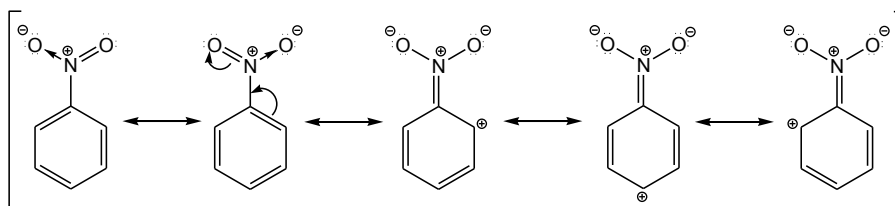
4. Z kwasem azotowym(III), co pozwala ustalić rzędowość nitrozwiązku. I-rzędowe nitroalkany pod wpływem HNO_2 dają kwasy nitrolowe o barwie błękitnej, która pod wpływem zasad ulega zmianie na czerwoną. Związki II-rzędowe pod wpływem HNO_2 tworzą pseudonitrole nierozpuszczalne w alkaliach, posiadające barwę błękitną lub błękitnozieloną.

5.



6. Chlorowaniu w łańcuchu bocznym; uprzywilejowaną pozycją jest pozycja α względem grupy nitrowej.

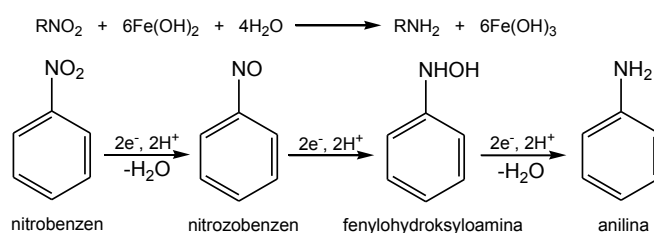
Aromatyczne związki nitrowe otrzymuje się głównie w wyniku bezpośredniego nitrowania. Reakcja zachodzi łatwo, co jest charakterystyczną cechą związków aromatycznych. Do nitrowania używa się zazwyczaj mieszaniny H_2SO_4 i HNO_3 (tzw. mieszanina nitrująca). Podstawienie grupy nitrowej zachodzi w pierścieniu aromatycznym według mechanizmu substytucji elektrofilowej. Grupa nitrowa jest podstawnikiem drugiego rodzaju (silnie elektronegatywna), silnie dezaktywuje pierścień benzenowy na dalsze podstawienie elektrofilowe. Jeżeli dalsza substytucja pierścienia benzenowego zachodzi, to następny podstawnik jest kierowany przez grupę nitrową w pozycję *meta*, co wynika z rozkładu ładunku w aromatycznym związku nitrowym.



Obecność grup nitrowych obok innych grup funkcyjnych w cząsteczkach innych związków wpływa modyfikująco na ich właściwości chemiczne. W chlorowconitrozwiązkach atom chlorowca łatwo ulega odsczepieniu i wymianie na azot lub siarkę. Fenolowa grupa –OH nitrofenolach zwiększa swoją stałą dysocjacji (nitrofenole są dość mocnymi kwasami). Grupa –SO₃H w pochodnych sulfonowych, podobnie jak chlorowiec, łatwo ulega odsczepieniu.

Mononitrozwiązki alifatyczne są bezbarwnymi lub jasnożółtymi cieczami. Nitrozwiązki aromatyczne, z małymi wyjątkami (nitrobenzen, o- i m-nitrotoluen, nitroksyleny) są ciałami stałymi nierozpuszczalnymi w wodzie, o dość charakterystycznym zapachu. Polinitrozwiązki aromatyczne są intensywnie zabarwionymi na żółto ciałami krystalicznymi. Ciekłe nitrozwiązki silnie załamują światło.

Wykrycie grupy nitrowej w związkach aromatycznych polega na jej redukcji. W zależności od warunków reakcji mogą powstać N-arylohydroksylaminy lub aminy aromatyczne. Ze względu na łatwość wprowadzenia grup –NO₂ do układów aromatycznych redukcja nitrozwiązków znalazła szerokie zastosowanie do laboratoryjnego i przemysłowego otrzymywania amin aromatycznych. Do najczęściej stosowanych środków redukujących należą metale (zwłaszcza żelazo metaliczne oraz na +2 stopniu utlenienia), SnCl₂ oraz wodór w obecności katalizatorów (Pt, Pd, Ni).

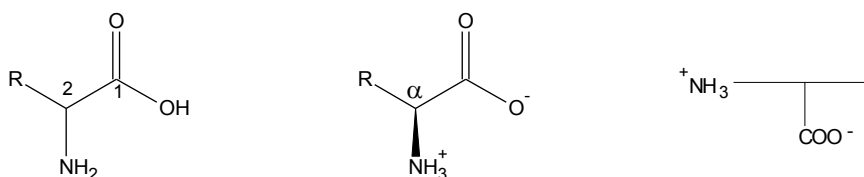


Nitrozwiązki w reakcji z aminami aromatycznymi tworzą połączenia kompleksowe o zabarwieniu żółtopomarańczowym.

Aminokwasy

Aminokwasy są to związki, które w łańcuchu węglowym zawierają zarówno grupę aminową jak i grupę karboksylową. Grupa aminowa w stosunku do grupy karboksylowej może zajmować dowolną pozycję: α, β, γ itd. W aminokwasach naturalnych, otrzymanych przez hydrolizę białek, grupa aminowa występuje zawsze w pozycji α.

Wzory ogólne naturalnych aminokwasów występujących w białkach



Aminokwasy zaliczane są do amfolitów, gdyż zachowują się jak kwasy i zasady. W stanie stałym występują one w formie jonów obojnych mających charakter soli wewnętrznych.

Ze względu na budowę chemiczną α-aminokwasy można podzielić na:

1. Aminokwasy z ugrupowaniem niepolarnym lub hydrofobowym (alkilowym lub arylowym): glicyna, alanina, walina, leucyna, izoleucyna, fenyloalanina, prolina.
2. Aminokwasy z ugrupowaniem polarnym, ale niezjonizowanym zawierającym grupy funkcyjne: OH, SH, SCH₃, S-S oraz heterocykliczne. Są to seryna, cysteina, treonina, tyrozyna, metionina, cystyna, tryptofan.
3. Aminokwasy kwaśne, zawierające dodatkową grupę karboksylową: kwas asparaginowy, kwas glutaminowy oraz ich amidy (asparagina, glutamina).
4. Aminokwasy zasadowe, zawierające dodatkową grupę zasadową: aminową – lizyna, ornityna; guanidynową – arginina; pierścień imidazolowy – histydyna.

Obecność dwóch reaktywnych grup funkcyjnych wpływa na właściwości chemiczne aminokwasów. Reakcje, którym ulegają aminokwasy można podzielić na niżej wymienione grupy:

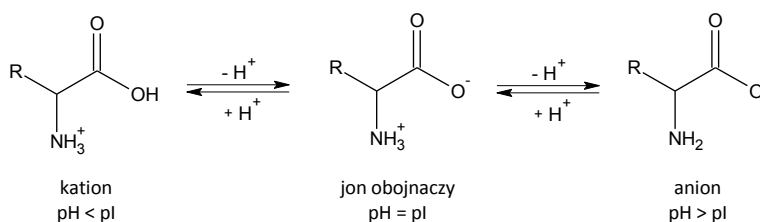
Projekt „Przedmioty przyrodnicze – kluczem do zawodów przyszłości”. Wyższa jakość kształcenia przedmiotów chemiczno-biologicznych w I LO w Białymstoku dzięki nauczaniu poprzez eksperyment i współpracy z jednostką naukowo-badawczą”

współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Podlaskiego na lata 2014-2020

1. Wzajemne oddziaływanie grupy aminowej i karboksylowej

Grupa karboksylowa ma zdolność do odszczepiania protonu, natomiast grupa aminowa, jako zasadowa, może przyłączać proton. Obie grupy sprawiają, że aminokwasy są związkami amfoterycznymi, gdyż mogą reagować zarówno z zasadami jak i z kwasami. Ponadto grupy oddziałują na siebie wzajemnie powodując powstawanie soli wewnętrznej aminokwasu. Jest to powodem wysokich temperatur topnienia poszczególnych aminokwasów oraz ich dobrej rozpuszczalności w wodzie i słabej w rozpuszczalnikach organicznych (w przeciwieństwie do kwasów i amin, które z reguły trudno rozpuszczają się w wodzie, a bardzo dobrze w rozpuszczalnikach organicznych). Całkowity ładunek cząsteczki aminokwasu zależy od pH środowiska. Wartość pH, przy której aminokwas istnieje w postaci jonu obojnego określany jest punktem izoelektrycznym (pI).

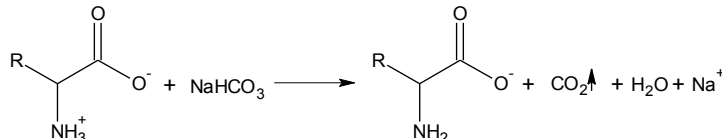
Równowaga kwasowo - zasadowa w roztworze aminokwasu



Wartość pI większości aminokwasów wynosi ok. 6, obecność w cząsteczce dodatkowych grup funkcyjnych aminowych albo karboksylowych powoduje przesunięcie punktu izoelektrycznego w kierunku, odpowiednio, większych albo mniejszych wartości.

2. Reakcje grupy karboksylowej

Aminokwasy są mocniejszymi kwasami od kwasu węglowego, rozpuszczają się, podobnie jak kwasy karboksylowe, w 5% NaHCO₃. Reakcji towarzyszy wydzielanie CO₂, czyli zjawisko perlenia, które daje się zauważyć zazwyczaj dopiero po około 3 minutach.



Typową reakcją grupy karboksylowej aminokwasów jest kondensacja z grupą aminową innego aminokwasu z utworzeniem wiązania peptydowego. Obie grupy nie łatwo reagują ze sobą i w praktyce wymagane jest uaktywnienie grupy karboksylowej w jednym z reagentów, np. poprzez utworzenie tzw. aktywnego estru. Jednocześnie, aby uniknąć niepożądanych połączeń aminokwasów, drugi z reagentów, tzw. komponent aminowy, musi mieć „zablokowaną” grupę karboksylową. Niejednokrotnie dokonuje się tego poprzez utworzenie estrów etylowych lub metylowych.

3. Reakcje grupy aminowej

Grupa aminowa w aminokwasach ulega typowym reakcjom alifatycznych amin I-rzędowych z wyjątkiem proliny i hydroksyproliny, które w pozycji α zawierają II-rzędową grupę aminową. Najważniejszą reakcją grupy aminowej jest acylowanie prowadzące do powstania amidu. Reakcja tego typu z udziałem innego aminokwasu, tzw. komponentu kwasowego, jest wykorzystywana do tworzenia peptydów. Z oczywistych względów komponent kwasowy musi mieć zabezpieczoną grupę aminową. W tym celu często przeprowadza się reakcje acylowania lub alkilowania grupy aminowej odpowiednimi pochodnymi chlorowcowymi (chlorki kwasowe, chlorki alkilowe).

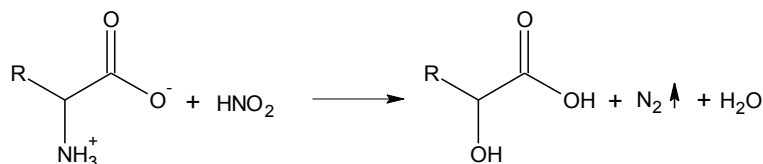
Reakcjami charakterystycznymi grupy aminowej w aminokwasach jest działanie kwasu azotowego(III) oraz ninhydryny:

a. Reakcja van Slyke'a z kwasem azotowym(III)

Wolne aminokwasy w wyniku działania HNO₂ ulegają deaminacji z wydzieleniem azotu i utworzeniem α-hydroksykwasu (patrz: reakcje amin alifatycznych z HNO₂).

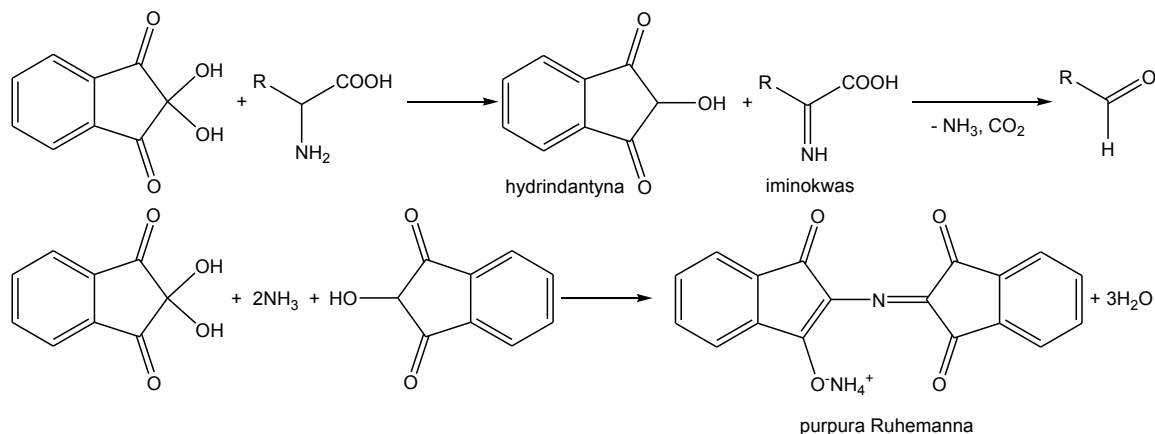
Projekt „Przedmioty przyrodnicze – kluczem do zawodów przyszłości”. Wyższa jakość kształcenia przedmiotów chemiczno-biologicznych w I LO w Białymstoku dzięki nauczaniu poprzez eksperyment i współpracy z jednostką naukowo-badawczą”

współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Podlaskiego na lata 2014-2020



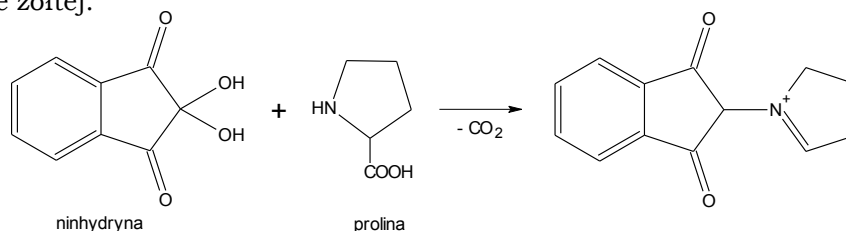
b. Reakcja ninhydrynowa

Aminokwasy, peptydy oraz białka dają charakterystyczną reakcję z roztworem ninhydryny, podobnie jak amoniak i alifatyczne aminy I-rzędowe. Aminokwasy z wolną grupą aminową pod wpływem ninhydryny (wodzianu triketohydrindenu) ulegają dekarboksylacji i oksydatywnej deaminacji. Początkowo powstaje iminokwas oraz zredukowana forma ninhydryny, tzw. hydrindantyna. Następnie iminokwas przechodzi w aldehyd krótszy o jeden atom węgla niż wyjściowy aminokwas, uwalnia się dwutlenek węgla oraz amoniak, który bierze udział w kondensacji z cząsteczką ninhydryny oraz hydrindantyny. W efekcie powstaje purpura Ruhemanna o barwie niebieskofioletowej.



Reakcja ninhydrynowa jest reakcją grupową aminokwasów, a jej dokładność i czułość sprawiła, że jest ona wykorzystywana nie tylko do wykrywania aminokwasów, ale także do ilościowego oznaczania wolnych α-aminokwasów metodą kolorymetryczną. Intensywność i odcień powstającego zabarwienia jest różna w zależności od rodzaju aminokwasu, jednakże natężenie zabarwienia jest proporcjonalne do stężenia aminokwasu w roztworze.

Prolina i hydroksyprolina, aminokwasy z grupą aminową II-rzędową, w reakcji z ninhydryną dają produkt o barwie żółtej.



4. Reakcje specyficzne związane z obecnością grup funkcyjnych

(np. SH, S-S, SCH₃, OH, układy aromatyczne)

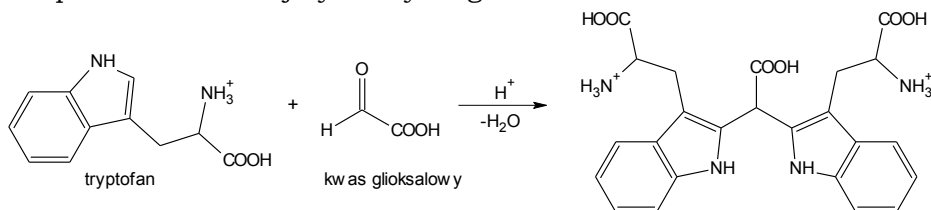
Grupa funkcyjna inna niż aminowa czy kwasowa w cząsteczce aminokwasu w oczywisty sposób wpływa na właściwości i reaktywność tego aminokwasu, gdyż ulega typowym reakcjom charakterystycznym dla danej klasy związków. Układy aromatyczne mogą ulegać reakcjom substytucji elektrofilowej, grupy hydroksylowe mogą zostać poddane reakcjom utleniania lub acylowania (z utworzeniem odpowiednich estrów). Dodatkowe grupy aminowe, będą odpowiadały za zwiększoną zasadowość aminokwasu oraz charakterystyczne reakcje amin.

Dość ważną właściwość wykazuje cysteina zawierająca grupę tiolową. Dzięki niej w cząsteczkach białek powstają mostki disulfidowe (-S-S-).

Charakterystyczne próby dla poszczególnych aminokwasów polegają na specyficznych reakcjach konkretnych grup funkcyjnych:

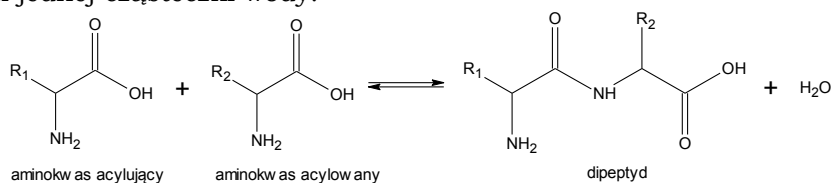
e. Reakcja Adamkiewicza-Hopkinsa – wykrywanie układu indolowego

Indol, który wchodzi w skład cząsteczki tryptofanu, w środowisku stężonych kwasów nieorganicznych ulega kondensacji z aldehydami (kwas gliksalowy, aldehyd mrówkowy) dając barwniki arylometanowe o zabarwieniu czerwono-fioletowym (patrz: reakcje związków heterocyklicznych). W kwaśnych hydrolizatach białek lub peptydów wynik tej próby jest ujemny, gdyż tryptofan podczas kwasowej hydrolizy ulega rozkładowi.



Białka

Białka są to związki zbudowane z więcej niż 100 reszt α -aminokwasów o masie cząsteczkowej powyżej 10 tys. Związki o niższej masie to polipeptydy. W białkach wiązanie peptydowe (zwane również wiązaniem amidowym) łączy grupę karboksylową jednego aminokwasu z grupą aminową drugiego aminokwasu. Powstanie dipeptydu z dwu wolnych aminokwasów wiąże się z uwolnieniem jednej cząsteczki wody.



Przemysłana synteza peptydów wymaga odpowiedniego przygotowania aminokwasów do reakcji kondensacji. Przede wszystkim należy zabezpieczyć wszystkie grupy funkcyjne, które w warunkach reakcji mogłyby dawać produkty uboczne. Najważniejsze jest jednak zabezpieczenie grupy aminowej w aminokwasie acylującym (komponent kwasowy) oraz grupy kwasowej w aminokwasie acylowanym (komponente aminowy).

Białka ze względu na swoją strukturę dzielą się na białka proste i białka złożone. Spośród wszystkich polimerów syntetycznych i naturalnych białka są substancjami najbardziej skomplikowanymi i posiadającymi najbardziej różnorodne właściwości. Właściwości białek zależą od budowy i kolejności ułożenia wielu reszt aminokwasowych (R) rozmieszczonych wzdłuż łańcucha polipeptydowego. Substancje białkowe pełnią w przyrodzie funkcje strukturalne (np. skóra, włosy, ścięgna, włókna mięśniowe), katalityczne (enzymy), transportowe (hemoglobina). Białkami są również substancje odpornościowe, które z jednej strony chronią organizm przed zakażeniem, a z drugiej uniemożliwiają przeszczepianie narządów. Wszystkie indywidualne cechy wszystkich organizmów sprowadzają się do białek, z których te organizmy są zbudowane według instrukcji zawartych w cząsteczkach DNA.

Substancje białkowe niezależnie od pochodzenia dają wspólne reakcje charakterystyczne.

1. Wysalanie białek

Białka, jako związki wielkocząsteczkowe posiadające zjonizowane grupy aminowe i karboksylowe, wykazują zdolność wiązania dipolarnych cząsteczek wody. Dzięki temu białka w środowisku wodnym ulegają hydratacji, pęcznieją, a następnie rozpuszczają się. Podobnie jak inne jony, otaczają się płaszczem wodnym i w tej postaci, jako osobne cząsteczki, tworzą roztwory koloidalne. Na rozpuszczalność białek w wodzie wpływa obecność soli nieorganicznych oraz pH roztworu (wartość nieco inna niż punktu izoelektrycznego sprzyja rozpuszczaniu). Wzrost stężenia soli w roztworze może jednakże doprowadzić do strącenia białka z roztworu. Jony soli tworzą własną powłokę solwacyjną, przy wysokim stężeniu soli w roztworze woda hydratacyjna cząsteczek białka zostaje od nich odciągnięta. „Obnażone” w ten sposób cząsteczki białka ulegają koagulacji na skutek wysolenia. Proces ten jest odwracalny, wystarczy odbudować płaszcz wodny białka poprzez dodanie wody. Podczas wysalania białko nie traci w sposób trwały swojej przestrzennej struktury oraz funkcji biologicznych. Wysalanie białek przeprowadza się za pomocą nasyconych roztworów $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , MgSO_4 .

2. Denaturacja

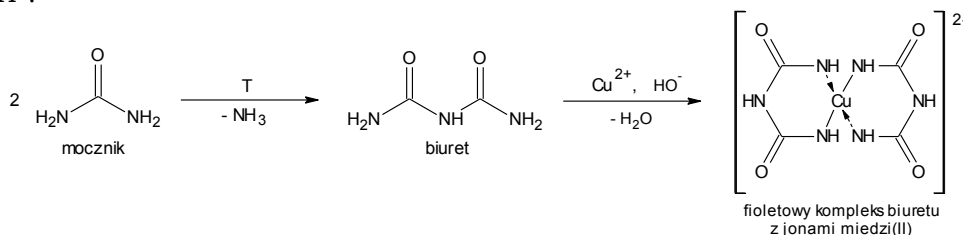
Pod wpływem soli metali ciężkich, mocnych kwasów lub mocnych zasad, podwyższonej temperatury oraz niektórych czynników chemicznych (96% etanol, aceton, fenol) dochodzi do

denaturacji i trwałego wytrącenia białek z roztworów. Denaturacja jest zjawiskiem polegającym na nieodwracalnej zmianie przestrzennej struktury białek (II- i III- i IV-rzędowej).

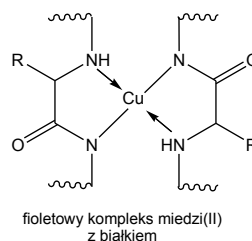
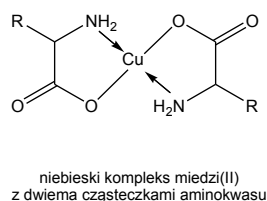
3. Reakcja biuretowa Piotrowskiego

Peptydy zawierające co najmniej dwa wiązania peptydowe (a więc tripeptydy i dłuższe) oraz białka tworzą z jonami miedzi(II) w środowisku zasadowym połączenia kompleksowe o barwie fioletowej. Nazwa reakcji pochodzi od biuretu, który powstaje przy ogrzewaniu mocznika i jest najprostszym związkiem dającym pozytywny wynik w tej próbie.

Próba biuretowa jest reakcją grupową na białka, ujemny wynik tej próby eliminuje obecność białka, chociaż pozytywny – nie w pełni ją potwierdza. Oprócz biuretu, podobny wynik reakcji dają związki nie posiadające wiązań peptydowych, a zawierające ugrupowania $-CS-NH-$ oraz $=CH-NH-$.



Aminokwasy, w odróżnieniu od białek, tworzą z jonami miedzi(II) połączenia kompleksowe o barwie niebieskiej (poza histydyną, która ze względu na budowę łańcucha bocznego, tworzy kompleks o barwie fioletowoniebieskiej).



Pytania sprawdzające

1. W trzech probówkach znajdują się metyloamina, etylo(metylo)amina i etylo(dimetylo)amina. Jak odróżnić je od siebie? Co zaobserwujesz?
2. Na czym polega próba ninhydrynowa? Jakie związki dają w tej próbie pozytywny wynik?
3. Dlaczego zwilżony papierek uniwersalny barwi się pod wpływem metyloaminy? Wyjaśnij podając odpowiednie równanie reakcji.
4. U szereguj następujące aminy według rosnącego charakteru zasadowego: trietyloamina, etyloamina, dietyloamina, anilina, difenyloamina.
5. Dlaczego anilina wykazuje bardzo słabe właściwości zasadowe?
6. Jak odróżnić od siebie aminy aromatyczne o różnej rzędowości? Podaj odpowiednie równania reakcji.
7. Jak odróżnić od siebie benzen, aminobenzen i nitrobenzen? Podaj odpowiednie równania reakcji i obserwacje.
8. Jakie reakcje należy przeprowadzić, aby wykryć obecność alaniny w roztworze? Podaj odpowiednie równania reakcji i spostrzeżenia.
9. Omów reakcje charakterystyczne pozwalające na wykrycie szczególnych aminokwasów zawierających dodatkowe grupy funkcyjne lub układy aromatyczne.
10. Na czym polega próba biuretowa? Jakie związki pozwala wykryć?
11. Jakie reakcje należy przeprowadzić, aby odróżnić od siebie cysteinę, alaninę i prolinę? Co zaobserwujesz?
12. Jaka jest przyczyna żółknięcia skóry po zetknięciu się ze stężonym roztworem kwasu azotowego(V)?
13. Jakie zmiany zaobserwujesz po działaniu na roztwór białka: etanolem, chlorkiem sodu, azotanem(V) srebra, chlorkiem amonowym? Które zmiany można cofnąć po silnym rozcieńczeniu wodą?

Instrukcja wykonania ćwiczenia
Analiza jakościowa związków organicznych (cz.3)

AMINY I ZWIĄZKI NITROWE

1. Badanie odczynu

Na uniwersalne papierki wskaźnikowe zwilżone wodą nanieść po 1 kropli: trietyloaminy, piperazyny, aniliny. Z różnicy zabarwienia wskaźnika wyciągnąć wniosek o charakterze badanych związków.

2. Badanie rzędowości amin

a. Reakcja aminy I-rzędowej z HNO_2

3 cm³ roztworu (zawierającego 2% n-propyloaminę i 1 kroplę stężonego HCl) ochłodzić w lodzie, po czym dodać powoli, kroplami 1.5 cm³ 10% roztworu NaNO₂ (również ochłodzonego). Mieszaninę następnie ogrzać ostrożnie na łaźni wodnej i zaobserwować wydzielanie się pęcherzyków gazu. **Reakcję powtórzyć dla piperazyny**, zaobserwować zachodzące zmiany.

b. Reakcja aniliny z HNO_2

Do kolbki stożkowej z korkiem odmierzyć 1.5 cm³ roztworu aniliny w stężonym kwasie solnym, rozcieńczyć 2.5 cm³ wody i ochłodzić do 0°C (łaźnia lodowa). Następnie dodać około 2-3 cm³ 20% roztworu azotanu(III) sodu. Podczas wkraplania NaNO₂ mieszać, aż do uzyskania pozytywnej reakcji z papierkiem jodoskrobiowym - papiererek powinien zabarwić się na kolor fioletowobrunatny, trwała barwa papierka wskazuje na obecność nadmiaru kwasu azotowego(III).

Otrzymany roztwór soli diazoniowej wykorzystujemy do kolejnych reakcji:

- Reakcja zagotowania: 2 cm³ otrzymanego roztworu odmierzyć do probówki i ogrzać na łaźni wodnej. Zaobserwować wydzielanie się gazu.
- Reakcja sprzęgania: 2 cm³ otrzymanego roztworu soli diazoniowej dodać do oziębionej mieszaniny składającej się z 5 cm³ wody destylowanej, kilku grudek lodu i 2 cm³ 5% roztworu β-naftolu w 10% NaOH. Powstaje pomarańczowoczerwony barwnik azowy.

c. Reakcja N,N-dietyloaniliny z HNO_2

1 cm³ roztworu N,N-dietyloaniliny w stężonym kwasie solnym rozcieńczyć 2 cm³ wody destylowanej i ochłodzić do 0°C (łaźnia lodowa). Następnie dodać około 2 cm³ 20% roztworu NaNO₂, aż do uzyskania pozytywnej reakcji z papierkiem jodoskrobiowym. Mieszaninę poreakcyjną ostrożnie zalkalizować 20% roztworem NaOH. Zaobserwować zachodzące zmiany.

d. Reakcja amin o różnej rzędowości z ninhydryną

Na kawałki bibuły chromatograficznej Whatman-1 nanieść po 1 kropli 2% roztworów propyloaminy i piperazyny. Bibułę, trzymając pęsetą lub szczypcami, wysuszyć

w strumieniu ciepłego powietrza. Następnie na każdy pasek bibuły nanieść 0.5% acetonowy roztwór ninhydryny i ponownie wysuszyć w strumieniu ciepłego powietrza. Porównać zmiany na obu paskach bibuły.

UWAGA! *Bibuły nie dotykać palcami! Niekiedy na bibule po reakcji z ninhydryną pojawiają się barwne odciski palców pochodzące od aminokwasów zawartych w ludzkim pocie.*

3. Reakcja nitrozwiązków z aminami aromatycznymi

W stożkowej probówce wirówkowej umieścić kryształek orto-dinitrobenzenu, dodać 1 kroplę 5% roztworu difenyloaminy i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej do odparowania rozpuszczalnika. Zaobserwować żółtopomarańczową obrączkę stopu.

Projekt „Przedmioty przyrodnicze – kluczem do zawodów przyszłości”. Wyższa jakość kształcenia przedmiotów chemiczno-biologicznych w I LO w Białymstoku dzięki nauczaniu poprzez eksperyment i współpracy z jednostką naukowo-badawczą”

współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Podlaskiego na lata 2014-2020

AMINOKWASY

4. Reakcja grupy -COOH

Szczyptę glicyny umieścić w probówce i dodać ok. 1 cm³ 5% NaHCO₃. Po 2-3 min. wydzielają się pęcherzyki CO₂.

5. Reakcja grupy -NH₂ z HNO₂

Szczyptę NaNO₂ rozpuścić w 1 cm³ 1 M H₂SO₄. Z roztworu wydzielają się pęcherzyki gazu. Po chwili, gdy ustanie wydzielanie się pęcherzyków, dodać kilka kropli 1% roztworu glicyny. Roztwór ponownie się burzy – wydzielają się pęcherzyki azotu.

Reakcję powtórzyć dla roztworu proliny.

Reakcje specyficzne dla α-aminokwasów

6. Próba ninhydrynowa

Do trzech probówek zawierających odpowiednio po 1 cm³: 1% roztworu glicyny, 2% roztworu proliny i wodnego roztworu białka jaja kurzego, dodać 2-4 krople 0.2% roztworu ninhydryny. Charakterystyczne zabarwienie pojawia się przeważnie natychmiast, czasem jednak niezbędne jest ogrzanie mieszaniny. Wyniki porównać z wynikami próby ninhydrynowej przeprowadzonej dla amin.

7. Próba ksantoproteinowa

Do 1 cm³ tyrozyny oraz 1 cm³ roztworu białka jaja kurzego dodać po 5 kropli stęż. HNO₃. Zaobserwować zachodzące zmiany. Probówki ogrzać, porównać zmiany, oziębć i zalkalizować (NaOH) i ponownie zaobserwować zmiany. Po zalkalizowaniu powinno nastąpić pogłębienie żółtej barwy lub wystąpienie zabarwienia pomarańczowego.

8. Próba cystynowa

Do 1 cm³ roztworu cysteiny oraz 1 cm³ roztworu białka jaja kurzego dodać po 1 cm³ 30% wodorotlenku sodowego. Ogrzać w gorącej łaźni wodnej przez 5 minut, a następnie dodać kroplami roztwór (CH₃COO)₂Pb. Zaobserwować zachodzące zmiany.

BIAŁKA

9. Reakcje strącaniowe

a. Wysalanie substancji białkowych

Do probówki zawierającej ok. 1 cm³ roztworu białka dodać 1 cm³ nasyconego roztworu MgSO₄. Wytrąca się biały osad. Dodać 5 cm³ wody i zaobserwować zachodzące zmiany.

b. Denaturacja

Do probówki zawierającej ok. 1 cm³ roztworu białka dodać 2 cm³ 96% etanolu i wymieszać. Wytrąca się biały osad. Dodać 5 cm³ wody, wynik próby porównać z wynikiem próby poprzedniej.

10. Wykazywanie wiązania peptydowego – reakcja biuretowa Piotrowskiego

Do roztworu białka jaja kurzego dodać 0.5 cm³ 10% NaOH i 1-2 krople 1% CuSO₄. Roztwór barwi się na kolor czerwono-fioletowy. **Próbie tę wykonać również dla glicyny lub innego aminokwasu.**

UWAGA! Należy unikać nadmiaru CuSO₄, który przeszkadza w reakcji, gdyż tworzy się galaretowaty Cu(OH)₂, maskujący wynik próby. Fioletowa barwa próby biuretowej łatwo znika po dodaniu 20% roztworu CH₃COOH. W tych warunkach białka wypadają w postaci osadu.