

# Laboratorium z biochemii

## DLA STUDENTÓW BIOLOGII, BIOTECHNOLOGII I OCHRONY ŚRODOWISKA

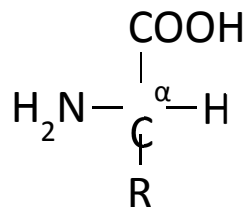
Praca zbiorowa pod redakcją *Antoniego Polanowskiego*  
Poprawki do wydania III wprowadzone pod redakcją  
*Justyny Ciuraszkiewicz i Elżbiety Gocek*

### 2. AMINOKWASY

Autorzy: Jolanta Kowalska, Irena Lorenc-Kubis, Dorota Nowak, Antoni Polanowski,  
Agata Sokołowska, Damian Stachowiak, Agata Szalewicz, Anna Wilimowska-Pelc,  
(ed. Justyna Ciuraszkiewicz)

<b>2.1</b>	<b>Właściwości optyczne aminokwasów</b>	<b>2</b>
<b>2.2</b>	<b>Nazewnictwo i podział aminokwasów</b>	<b>3</b>
<b>2.3</b>	<b>Właściwości fizykochemiczne aminokwasów</b>	<b>7</b>
<b>2.4</b>	<b>Aminokwasy nietypowe i zmodyfikowane</b>	<b>8</b>
<b>2.5</b>	<b>Reakcje charakterystyczne aminokwasów</b>	<b>9</b>
2.5.1	Reakcje barwne aminokwasów	10
2.5.1.1	Wykrywanie aminokwasów aromatycznych w reakcji ksantoproteinowej	10
<b>2.6</b>	<b>Jakościowe i ilościowe metody oznaczania aminokwasów</b>	<b>11</b>
2.6.1	Reakcja z ninhydriną – ogólny odczyn na aminokwasy	11
2.6.2	Ilościowe oznaczanie aminokwasów z ninhydriną	12
2.6.3	Oznaczanie wolnych grup aminowych za pomocą aldehydu o-ftalowego	13
2.6.4	Jednokierunkowa wstępująca chromatografia cienkowarstwowa (TLC)	14

Peptydy i białka zbudowane są najczęściej z 20 różnych  $\alpha$ -aminokwasów, zwanych aminokwasami standardowymi. Wszystkie aminokwasy zbudowane są wg tego samego schematu: posiadają grupę aminową ( $-\text{NH}_2$ ), grupę karboksylową ( $-\text{COOH}$ ), atom wodoru oraz łańcuch boczny  $-\text{R}$ , połączone z tetraedrycznym węglem, nazywanym węglem  $\alpha$  (Rys. 2.1, Tab. 2.1). Najprostszym aminokwasem jest glicyna, która zamiast łańcucha bocznego posiada atom wodoru. Poza glicyną od powyższego schematu budowy odbiega także prolina, będąca cyklicznym iminokwasem (alifatyczny łańcuch boczny łączy się zarówno z węglem  $\alpha$  jak również z grupą aminową).



Zasadniczą funkcją aminokwasów jest udział w budowie peptydów i białek, jednak mogą one występować także w stanie wolnym lub formie zasocjowanej z peptydami albo białkami.

**Rys. 2.1. Ogólny schemat budowy  $\alpha$ -aminokwasu**

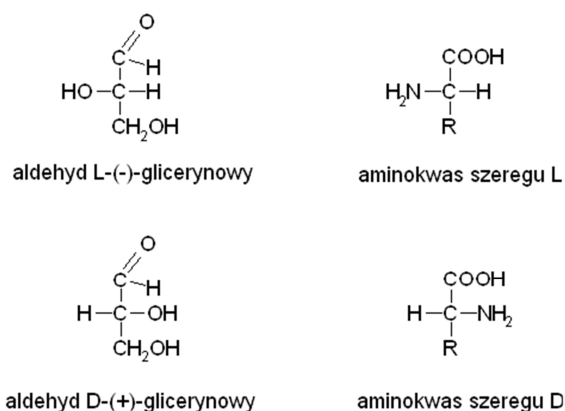
R – rodnik organiczny zwany łańcuchem bocznym

## 2.1. WŁAŚCIWOŚCI OPTYCZNE AMINOKWASÓW

Wszystkie aminokwasy, z wyjątkiem glicyny, posiadają co najmniej jedno centrum chiralności, co powoduje, że są optycznie czynne. O tym, czy cząsteczkę aminokwasu zaliczymy do szeregu D lub L, decyduje położenie grupy aminowej  $-\text{NH}_2$ , która przy określaniu izomerii optycznej jest odpowiednikiem grupy  $-\text{OH}$  aldehydu glicerynowego. Jeśli grupa aminowa w cząsteczce aminokwasu jest położona tak jak grupa  $-\text{OH}$  w cząsteczce aldehydu L(-)-glicerynowego, to zaliczamy ją do szeregu L. Jeśli zaś grupa aminowa jest położona jak grupa  $-\text{OH}$  w cząsteczce aldehydu D-(+)-glicerynowego, to zaliczamy ją do szeregu D (Rys. 2.2).

Prawie wszystkie aminokwasy budujące białka występują w formie L. Jedyne nieliczne mikroorganizmy są zdolne do syntezy izomerów D. Wchodzą one np. w skład ścian komórkowych bakterii oraz niektórych antybiotyków wytwarzanych przez grzyby (walinomycyna, aktynomycyna, gramicydyna S).

W obrębie grupy aminokwasów nie ma zależności między konfiguracją a czynnością optyczną. Niektóre aminokwasy białkowe są lewoskrętne, inne prawoskrętne, mimo że wszystkie mają konfigurację L.

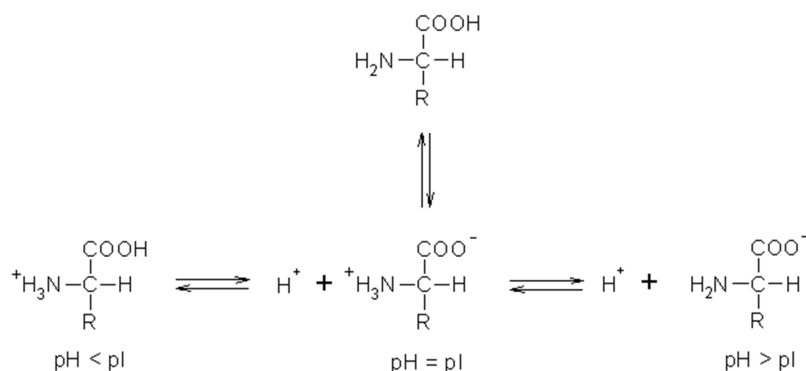


**Rys. 2.2. Izomeria optyczna aminokwasów**

## 2.2. NAZEWNICTWO I PODZIAŁ AMINOKWASÓW

W przypadku aminokwasów, mimo że posiadają nazwy systematyczne, zwykle posługujemy się ich nazwami zwyczajowymi. Ponadto aminokwasy określane są za pomocą trzy- i jednoliterowych skrótów (Tab. 2.1) ułatwiających np. zapis sekwencji aminokwasowej białka (Rys. 3.3).

Aminokwasy ze względu na obecność dwóch grup funkcyjnych zdolnych do jonizacji: aminowej ( $-NH_2$ ) oraz karboksylowej ( $-COOH$ ) posiadają charakter amfoteryczny (Rys. 2.3). W roztworach wodnych występują w formie zjonizowanej. Stopień dysocjacji i sumaryczny ładunek, jaki wykazuje cząsteczka aminokwasu, zależą od pH środowiska i charakteru łańcucha bocznego cząsteczki. pH, w którym cząsteczka występuje w formie jonu obojnego (zwitterionu), gdzie ilość ładunków dodatnich jest równa ilości ładunków ujemnych, nazywa się **punktem izoelektrycznym (pI)**. Wartość pH, która odpowiada punktowi izoelektrycznemu zależy od wartości pK grup funkcyjnych aminokwasu (Tab. 2.1). W przypadku aminokwasów posiadających jedną grupę karboksylową i jedną grupę aminową wartość punktu izoelektrycznego jest równa średniej arytmetycznej z wartości pK<sub>1</sub> i pK<sub>2</sub>. W pH poniżej pI aminokwasy posiadają wypadkowy ładunek dodatni, natomiast w pH powyżej pI – ładunek ujemny.



Rys. 2.3. Amfoteryczny charakter aminokwasów

Aminokwasy stanowią grupę związków o zróżnicowanej budowie, właściwościach i funkcji. Z tego powodu, stosując różne kryteria, związki te możemy podzielić na szereg grup. Poniżej przedstawiono niektóre z nich, częściowo uwzględniając je w Tab. 2.1.

### Podział aminokwasów ze względu na występowanie i funkcję:

- aminokwasy białkowe – będące podstawową jednostką budującą peptydy i białka
- aminokwasy niebiałkowe – występujące w stanie wolnym aminokwasy nietypowe
- aminokwasy cukrotwórcze – będące prekursorami węglowodanów
- aminokwasy tłuszczotwórcze – będące prekursorami lipidów

### Podział aminokwasów białkowych ze względu na możliwość syntezy przez organizm żywy:

- aminokwasy endogenne – syntetyzowane przez określony organizm
- aminokwasy egzogenne – nie syntetyzowane przez określony organizm

Bakterie i rośliny, poza nielicznymi wyjątkami, syntetyzują wszystkie niezbędne aminokwasy, w przeciwieństwie do człowieka i zwierząt, które pewne aminokwasy muszą pobierać z pożywienia.

### Podział aminokwasów ze względu na strukturę łańcucha bocznego:

- alifatyczne
- aromatyczne

**Podział aminokwasów ze względu na polarność łańcucha bocznego:**

- aminokwasy niepolarne
- aminokwasy polarne

**Podział aminokwasów ze względu na obecność w łańcuchu bocznym dodatkowych grup aminowych lub karboksylowych:**

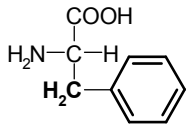
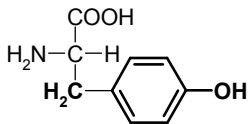
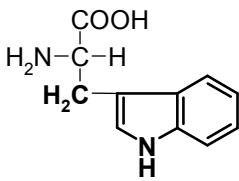
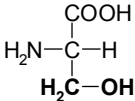
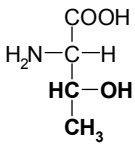
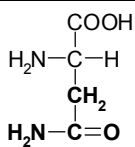
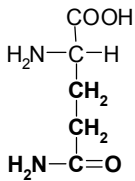
- kwasowe
- zasadowe
- obojętne

Podział, wzory chemiczne, podstawowe właściwości oraz stosowane skróty nazw aminokwasów podano w Tab. 2.1.

*Tab. 2.1. Podział i właściwości kwasowo-zasadowe aminokwasów*

	Aminokwas skrót	wzór	M. cz. [Da]	pI	pK <sub>1</sub> α-COOH	pK <sub>2</sub> α-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	pK <sub>R</sub> (łańcuch boczny)
<b>AMINOKWASY ALIFATYCZNE</b>	<b>glicyna</b> (kwas aminooctowy) <b>Gly (G)</b>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{H} \end{array}$	75,01	5,97	2,34	9,60	
	<b>Alanina</b> (kwas 2- aminopropionowy) <b>Ala (A)</b>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	89,09	6,01	2,34	9,69	
	<b>Walina</b> (kwas 2-amino-3- metylomastłowy) <b>Val (V)</b>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$	117,15	5,97	2,32	9,62	
	<b>Leucyna</b> (kwas 2-amino-4- metylowalerianowy) <b>Leu (L)</b>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$	131,18	5,98	2,36	9,60	
	<b>Izoleucyna*</b> (kwas 2-amino-3- metylowalerianowy) <b>Ile (I)</b>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	131,18	6,02	2,36	9,68	
	<b>Prolina</b> (kwas pirolidyno-2- karboksylowy) <b>Pro (P)</b>	$\begin{array}{c} \text{H}_2 \\   \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH} \\   \quad \quad   \\ \text{C} \quad \quad \text{NH} \\   \\ \text{H}_2 \end{array} \quad \begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{CH} \end{array}$	115,13	6,48	1,99	10,96	

c.d. Tab. 2.1.

	Aminokwas skrót	wzór	M. cz. [Da]	pI	pK <sub>1</sub> α-COOH	pK <sub>2</sub> α-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	pK <sub>R</sub> (łańcuch boczny)
AMINOKWASY AROMATYCZNE	<b>fenyloalanina*</b> (kwas 2-amino-3-fenylpropionowy) <b>Phe (F)</b>		165,19	5,48	1,83	9,13	
	<b>tyrozyna</b> (kwas 2-amino-3-(4-hydroksyfenyl)-propionowy) <b>Tyr (Y)</b>		181,19	5,66	2,20	9,11	10,07
	<b>tryptofan*</b> (kwas 2-amino-3-indolylpropionowy) <b>Trp (W)</b>		204,23	5,89	2,38	9,39	
AMINOKWASY POLARNE	<b>seryna</b> (kwas 2-amino-3-hydroksypropionowy) <b>Ser (S)</b>		105,09	5,68	2,21	9,15	
	<b>treonina*</b> (kwas 2-amino-3-hydroksymasłowy) <b>Thr (T)</b>		119,12	5,87	2,11	9,62	
	<b>asparagina</b> (kwas 2,4-diaminobursztynowy) <b>Asn (N)</b>		132,12	5,41	2,02	8,80	
	<b>glutamina</b> (kwas 2,5-diaminoglutarowy) <b>Gln (Q)</b>		146,15	5,65	2,17	9,13	

c.d. Tab. 2.1.

	Aminokwas skrót	wzór	M. cz. [Da]	pI	pK <sub>1</sub> α-COOH	pK <sub>2</sub> α-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	pK <sub>R</sub> (łańcuch boczny)
AMINOKWASY SIARKOWE	<b>metionina*</b> (kwas 2-amino-4-metylotiomasłowy) <b>Met (M)</b>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{H}_2\text{C}-\text{S}-\text{CH}_3 \end{array}$	149,21	5,74	2,28	9,21	
	<b>cysteina</b> (kwas 2-amino-3-tiopropionowy) <b>Cys (C)</b>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{H}_2\text{C}-\text{SH} \end{array}$	121,16	5,07	1,96	10,28	8,18
AMINOKWASY ZASADOWE	<b>histydyna</b> (kwas 2-amino-3-imidazolo-propionowy) <b>His (H)</b>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{H}_2\text{C} \\   \\ \text{N} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{NH} \end{array}$	155,16	7,59	1,82	9,17	6,00
	<b>lizyna*</b> (kwas 2,6-diaminokapronowy) <b>Lys (K)</b>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2 \end{array}$	146,19	9,74	2,18	8,95	10,53
	<b>arginina</b> (kwas 2-amino-5-guanidyno-walerianowy) <b>Arg (R)</b>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{H}_2\text{C}-\text{NH}-\text{C}=\text{NH}_2 \\ \quad \quad \quad   \\ \quad \quad \quad \text{NH} \end{array}$	174,20	10,76	2,17	9,04	12,48
AMINOKWASY KWAŚNE	<b>kwas asparaginowy</b> (kwas aminobursztynowy) <b>Asp (D)</b>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{COOH} \end{array}$	133,10	2,77	1,88	9,60	3,65
	<b>kwas glutaminowy</b> (kwas aminoglutarowy) <b>Glu (E)</b>	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{COOH} \end{array}$	147,13	3,22	2,19	9,67	4,25

\* aminokwasy egzogenne dla człowieka

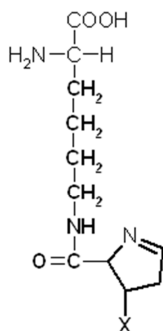
W przypadkach niejednoznacznych stosowane są również oznaczenia:

Asx (B) – kwas asparaginowy lub asparagina,

Glx (Z) – kwas glutaminowy lub glutamina,

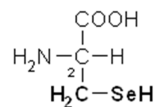
Xaa (X) – aminokwas nieznan lub nietypowy.

Poza 20 aminokwasami standardowymi przedstawionymi w Tab. 2.1 istnieją jeszcze dwa rzadziej występujące aminokwasy kodowane genetycznie: selenocysteina i pirolizyna (Rys. 2.5 i 2.4). Selenocysteina powstaje w wyniku chemicznej modyfikacji seryny połączonej z tRNA w rybosomie i jest włączana do białek przy użyciu kodonu UGA (kodon stop). Aminokwas ten występuje np. w peroksydazie glutationowej, zapobiegającej oksydacyjnemu działaniu nadtlenu wodoru w komórkach zwierzęcych. Drugi z aminokwasów – pirolizyna również powstaje w wyniku modyfikacji chemicznej aminokwasu połączonego z tRNA i również jest włączana do białek z wykorzystaniem kodonu stop – w tym przypadku UAG. W przeciwieństwie do selenocysteiny kodowanej we wszystkich organizmach żywych, pirolizyna jest spotykana w białkach syntetyzowanych przez bakterie właściwe i archeany np. w enzymach uczestniczących w produkcji metanu przez te organizmy.



X - prawdopodobnie CH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub> lub OH

Rys. 2.4. Pirolizyna



Rys. 2.5. Selenocysteina

### 2.3. WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE AMINOKWASÓW

Aminokwasy są krystalicznymi substancjami o wysokich temperaturach topnienia (ponad 200°C), w których dochodzi do ich rozkładu. Na ogół dobrze rozpuszczają się w wodzie i innych rozpuszczalnikach polarnych, chociaż ich rozpuszczalność w wodzie mieści się w szerokich granicach (Tab. 2.2). W rozpuszczalnikach niepolarnych lub w mniej polarnych (np. etanol, aceton) są słabo rozpuszczalne. Rozpuszczalność aminokwasów bardzo silnie zależy od pH roztworu i jest najmniejsza w punkcie izoelektrycznym (pI). W silnie kwaśnych lub silnie zasadowych roztworach wodnych aminokwasy rozpuszczają się bardzo dobrze.

O właściwościach hydrofobowych aminokwasów decyduje budowa łańcucha bocznego. Aminokwasy hydrofobowe, wchodzące w skład łańcuchów białkowych, wykazują tendencje do występowania wewnątrz ich struktur, w tak zwanym rdzeniu cząsteczki, w odróżnieniu od aminokwasów hydrofilowych występujących na powierzchni. Stosuje się kilka skal hydrofobowości aminokwasów, odzwierciedlających wspomnianą wyżej tendencję do występowania wewnątrz lub na powierzchni cząsteczki białka, bądź też właściwości fizykochemiczne łańcuchów bocznych aminokwasów. W Tab. 2.2 przedstawiono indeksy hydrofobowości, służące do wyrażenia tendencji aminokwasów do poszukiwania środowiska wodnego (wartości ujemne) lub środowiska hydrofobowego (wartości dodatnie).

**Tab. 2.2. Rozpuszczalność i właściwości hydrofobowe aminokwasów**

aminokwas	rozpuszczalność w temp. 25°C [g/100 ml wody]*	indeks hydrofobowości**
alanina	16,65	1,8
arginina	15 <sup>5)</sup>	-4,5
asparagina	3,53 <sup>3)</sup>	-3,5
cysteina	b.d. <sup>2)</sup>	2,5
fenyloalanina	2,96	2,8
glicyna	25	-0,4
glutamina	4,81 <sup>4)</sup>	-3,5
histydyna	4,19	-3,2
izoleucyna	4,12	4,5
kw. asparaginowy	0,45 <sup>6)</sup>	-3,5
kw. glutaminowy	0,864	-3,5
leucyna	2,426	3,8
lizyna	b.d. <sup>2)</sup>	-3,9
metionina	3,381 <sup>1)</sup>	1,9
prolina	162	1,6
seryna	5,023 <sup>1)</sup>	-0,8
treonina	b.d. <sup>2)</sup>	-0,7
tryptofan	1,14	-0,9
tyrozyna	0,0453	-1,3
walina	8,85	4,2

\* wg *The Merck Index. An Encyclopedia of chemicals and drugs* (1976), \*\* wg Kyte i Doolittle (1982);  
<sup>1)</sup> wartość dla mieszaniny racemicznej, <sup>2)</sup> b.d. – rozpuszczalność bardzo dobra, <sup>3)</sup> rozpuszczalność w 28°C dla uwodnionej formy aminokwasu, <sup>4)</sup> rozpuszczalność w 30°C, <sup>5)</sup> rozpuszczalność w 21°C, <sup>6)</sup> rozpuszczalność w 20°C.

Z występowaniem pierścieni aromatycznych w łańcuchach bocznych niektórych aminokwasów wiąże się zdolność pochłaniania światła w zakresie UV (Tab. 2.3). Właściwość ta jest powszechnie wykorzystywana do pomiaru stężenia białka (rozdział 3.10.1).

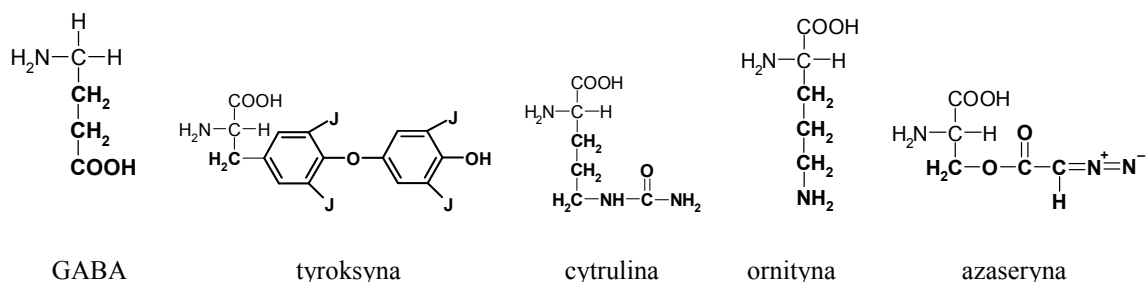
**Tab. 2.3. Właściwości spektralne aminokwasów aromatycznych**

aminokwas	molowy współczynnik absorpcji $\epsilon$ [ $M^{-1}cm^{-1}$ ] ( $\lambda$ [nm])
tryptofan	5 500 (280 nm)
tyrozyna	1 490 (274 nm)
fenyloalanina	220 57 nm)

## 2.4. AMINOKWASY NIETYPOWE I ZMODYFIKOWANE

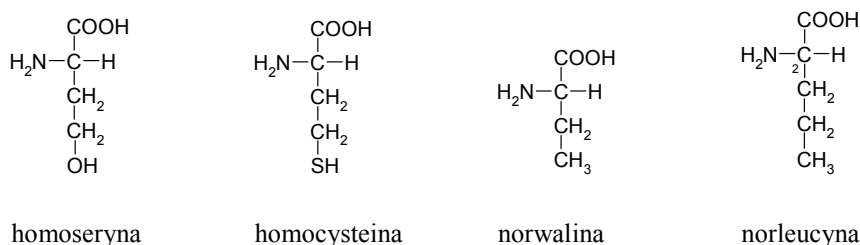
Poza omówionymi wcześniej aminokwasami kodowanymi przez sekwencję nukleotydów DNA (rozdział 2.2) w białkach występują również aminokwasy niekodowane genetycznie, lecz powstające wskutek modyfikacji potranslacyjnych (rozdział 3.4). Ponadto w przyrodzie występuje ogromna liczba aminokwasów nietypowych (Rys. 2.6). Niektóre z nich pełnią rolę neurotransmiterów (GABA – kwas  $\gamma$ -aminomasłowy – produkt dekarboksylacji kwasu glutaminowego), czy hormonów (tyroksyna, powstająca z tyrozyny m.in. poprzez przyłączenie jodu). Niektóre aminokwasy są istotnymi intermediami w różnych procesach metabolicznych, np. cytrulina i ornityna uczestniczą w biosyntezie mocznika. Inne prawdopodobnie pełnią funkcje ochronne jak azaseryna, wykorzystywana jako antybiotyk.





Rys. 2.6. Aminokwasy nietypowe niewystępujące w białkach

Kolejną grupą aminokwasów nietypowych są homologi aminokwasów, charakteryzujące się brakiem lub obecnością dodatkowej grupy metylenowej w łańcuchu bocznym. W nomenklaturze tej grupy aminokwasów przedrostek *homo-* stosuje się w przypadku cząsteczek, posiadających dodatkową grupę metylenową w łańcuchu węglowym np. homoseryna, homocysteina, natomiast przedrostek *nor-* oznacza homolog niższego rzędu, posiadający jedną grupę metylenową mniej od aminokwasu wyjściowego np. norwalina, norleucyna. W obu przypadkach stosowanie nazw zwyczajowych jest niezalecane i lepiej używać nazw systematycznych.



Rys. 2.7. Homologi aminokwasów

## 2.5. REAKCJE CHARAKTERYSTYCZNE AMINOKWASÓW

Obecność grupy  $\alpha$ -karboksylowej,  $\alpha$ -aminowej oraz grup reaktywnych w łańcuchu bocznym warunkuje różne właściwości chemiczne aminokwasów oraz umożliwia szereg modyfikacji, wśród których na szczególną uwagę zasługują:

- dekarboksylacja, w wyniku której powstają odpowiednie aminy
- estryfikacja, produktem której są odpowiednie estry, np. połączenia z nukleozydami lub nukleotydami; w wyniku tych reakcji mogą powstawać zarówno niektóre antybiotyki, jak i np. aminoacylo-tRNA
- transaminacja, w wyniku której mogą powstawać nowe aminokwasy
- dezaminacja, w wyniku czego powstają związki karbonylowe i amoniak
- *N*-acylacja, prowadząca m.in. do syntezy niektórych składników błon komórkowych (polisacharydy czy glikolipidy)
- modyfikacje łańcuchów bocznych aminokwasów w cząsteczkach białka (rozdział 3.4).

## 2.5.1. Reakcje barwne aminokwasów

Reakcje, których produkty posiadają zabarwienie, są często wykorzystywane w analizie jakościowej oraz ilościowej aminokwasów i białek. Poniżej wymieniono najbardziej charakterystyczne reakcje barwne dla aminokwasów (Tab. 2.5).

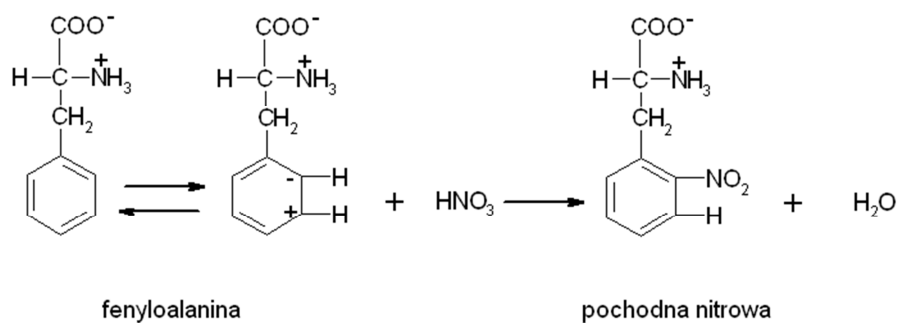
Tab. 2.5. Odczyny barwne aminokwasów i białek

próba	odczynniki	aminokwasy dające pozytywny odczyn	barwa
Millona	HgNO <sub>3</sub> w HNO <sub>3</sub> z HNO <sub>2</sub>	Tyr	czerwona
ksantoproteinowa	gorący HNO <sub>3</sub>	Tyr, Trp, Phe	żółta
Adamkiewicza-Hopkinsa	kwas glioksalowy w stężonym H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Trp	purpurowa
Ehrlicha	p-dimetylo-aminobenzaldehyd w stężonym HCl	Trp	niebieska
Sakaguchi	α-naftol, bromian (I) sodu	Arg	czerwona
nitroprusydkowa	nitroprusydek w stężonym amoniaku	Cys	czerwona
Pauly'ego	diazowany kwas sulfanilowy w środowisku zasadowym	His, Tyr	czerwona
Folina-Ciocalteu	fosforo-molibdeno-wolframian	Tyr	niebieska

### 2.5.1.1. Wykrywanie aminokwasów aromatycznych w reakcji ksantoproteinowej

#### Zasada metody

Stężony kwas azotowy (V) wytrąca białka i nitruje pierścień benzenowy aminokwasów aromatycznych (Rys. 2.8). Produkty reakcji ksantoproteinowej (gr. *xanthos* – żółty) dają barwę od jasnożółtej do brązowej, znacznie intensywniejszą po zalkalizowaniu próby. Najtrudniej reakcji nitrowania ulega fenyloalanina.



Rys. 2.8. Odczyn ksantoproteinowy na aminokwasy aromatyczne

#### Postępowanie

- Do 2 ml roztworu aminokwasu lub białka dodać kroplami (**Ostrożnie!**) ok. 0,5 ml stężonego kwasu azotowego (V) i jedną do dwóch kropli stężonego kwasu siarkowego (VI).
- Całość ogrzewać 30 sekund we wrzącej łaźni wodnej. Opisać uzyskane wyniki.

#### Materiały i odczynniki

- 0,1% roztwory tyrozyny, fenyloalaniny, tryptofanu oraz 1% roztwór albuminy
- stężony kwas azotowy (V)
- stężony kwas siarkowy (VI)

## 2.6. JAKOŚCIOWE I ILOŚCIOWE METODY OZNACZANIA AMINOKWASÓW

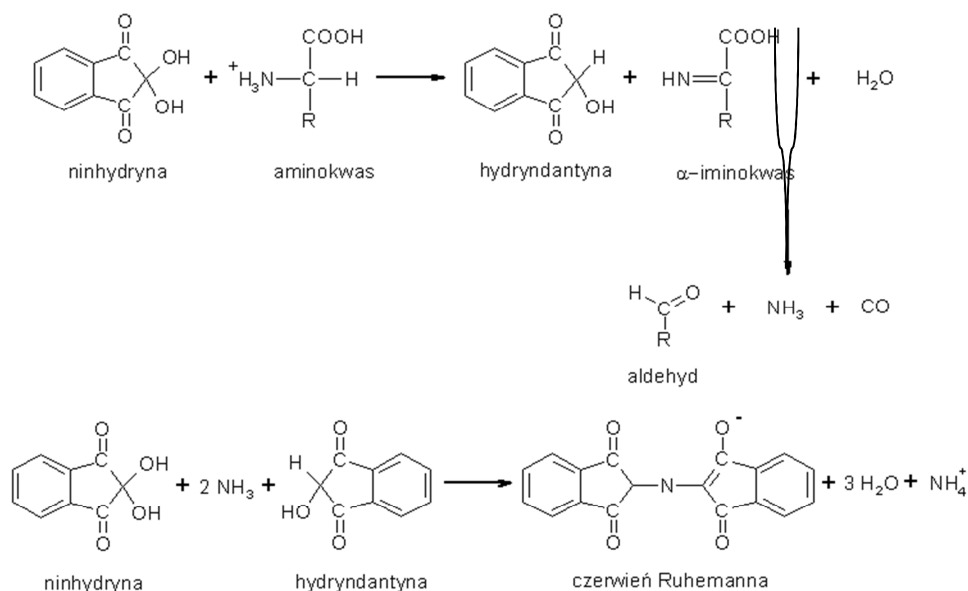
### 2.6.1. Reakcja z ninhydryną – ogólny odczyn na aminokwasy

Moore S, Stein W.H (1948) J. Biol. Chem. 176, 367–388.

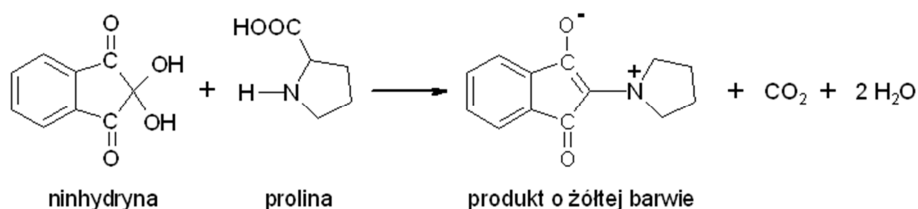
#### Zasada metody

Reakcja z ninhydryną służy do jakościowego i ilościowego oznaczania wolnych aminokwasów. Podczas ogrzewania z ninhydryną w pH 5,0–5,5 aminokwasy ulegają tlenowej dezaminacji i dekarboksylacji. W czasie tej reakcji ninhydryna redukuje się i łączy z amoniakiem powstałym z rozkładu aminokwasu oraz drugą cząsteczką ninhydryny, tworząc kompleks o zabarwieniu fioletowo-niebieskim z maksimum absorpcji przy 570 nm (Rys. 2.9). Prolina posiadająca grupę iminową w miejscu grupy  $\alpha$ -aminowej, tworzy z ninhydryną innego typu kompleksy o żółtym zabarwieniu z maksimum absorpcji przy 440 nm (Rys. 2.10). Cysteinę i cystynę można oznaczyć tą metodą dopiero po przeprowadzaniu ich w kwas cysteinowy.

Odczyn barwny z ninhydryną dają również peptydy posiadające większą ilość wolnych grup aminowych i karboksylowych, a także aminy, sole amonowe, aminocukry i amoniak. Z uwagi na czułość reakcji, w pracowni, w której oznacza się aminokwasy tą metodą, należy usunąć wszystkie odczynniki zawierające amoniak.



Rys. 2.9. Reakcja ninhydrynowa  $\alpha$ -aminokwasów



Rys. 2.10. Reakcja ninhydrynowa proliny

#### Postępowanie

1. Do trzech probówek odpipetować kolejno po 1 ml: wody, 0,1% roztworu albuminy, 1% roztworu glicyny.
2. Zawartość probówek zakwasić do pH 5,0–5,5, dodając kroplami roztwór kwasu octowego. Po dodaniu każdej kropli sprawdzić pH papierkiem uniwersalnym.

3. Do wszystkich probówek dodać po 0,5 ml roztworu ninhydryny, wymieszać i ogrzać do wrzenia w płomieniu palnika gazowego lub we wrzącej łaźni wodnej.
4. Uzyskane wyniki zamieścić w tabeli wyników, wyrażając intensywność zabarwienia symbolami:
  - \*\*\* barwa bardzo intensywna
  - \*\* barwa średnio intensywna
  - \* lekkie zabarwienie
  - brak zabarwienia

roztwór	0,1% albumina	1% glicyna	woda
intensywność barwy			

#### *Materiały i odczynniki*

- 0,1% roztwór albuminy
- 1% roztwór glicyny
- 0,1% etanolowy roztwór ninhydryny
- 2 M kwas octowy
- papierek uniwersalny

#### *Uwagi*

Optymalne pH dla przeprowadzenia reakcji ninhydrynowej mieści się w granicach 5,0–5,5. Do rozpuszczenia ninhydryny należy używać etanolu lub innych rozpuszczalników organicznych (np: 2-metoksyetanol, dimetylosulfotlenek) ze względu na to, że hydryndantyna oraz czerwień Ruhemanna są słabo rozpuszczalne w wodzie.

### **2.6.2. Ilościowe oznaczanie aminokwasów ninhydryną**

Jacobs S. (1959) Nature 183, 262.

#### *Zasada metody*

Reakcja barwna aminokwasów i soli amonowych z ninhydryną (szczegółowo omówiona w rozdziale 2.6.1) stanowi podstawę do ilościowego oznaczania tych związków w metodach kolorymetrycznych, w których mierzy się natężenie barwy zależne od stężenia powstałego barwnego kompleksu ninhydryny z amoniakiem oraz w metodach gazometrycznych, w których oblicza się ilość wydzielonego dwutlenku węgla (CO<sub>2</sub>) lub amoniaku (NH<sub>3</sub>). Metoda ninhydrynowa, jako czuła i dokładna, znajduje szerokie zastosowanie do ilościowego oznaczania aminokwasów rozdzielanych metodą chromatografii cienkowarstwowej lub kolumnowej. Aby oznaczyć aminokwasy związane w peptydach lub białkach należy te związki wcześniej poddać hydrolizie.

#### *Postępowanie*

1. W probówce umieścić 0,5 ml roztworu aminokwasu, zawierającego od 3–5 µg/ml azotu aminowego.
2. Dodać 1,5 ml 0,4 M buforu octanowego o pH 5,0 i 2 ml odczynnika ninhydrynowego. Równolegle wykonać próbę odczynnikową, dodając 0,5 ml wody w miejsce roztworu aminokwasu.
3. Próby wymieszać i wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 30 minut. Po tym czasie probówki oziębic, dodać po 6 ml 50% etanolu, wymieszać.
4. Wykalibrować spektrofotometr na kontrolną próbę odczynnikową i odczytać wartość absorbancji próby badanej przy 570 nm.
5. Uzyskane wartości absorbancji porównać z wartością absorbancji próby wzorcowej wykonanej równolegle, zawierającej leucynę o znanym stężeniu lub skorzystać z informacji, iż w warstwie 1 cm przy 570 nm 5,6 µg N (azotu aminowego) daje  $A_{570} = 0,805 \pm 0,008$ .

### Wykonanie krzywej kalibracyjnej

1. Do pięciu probówek odpipetować podane w tabeli objętości standardowego roztworu glicyny (o stężeniu 0,001 M), 0,4 M buforu octanowego o pH 5,5 i odczynnika ninhydrynowego.
2. Próby ogrzewać przez 30 minut we wrzącej łaźni wodnej i po oziębieniu do temp. pokojowej dodać etanol.
3. Odczytać absorbancję przy 570 nm wobec próby odczynnikowej (próba nr 1). Wykreślić krzywą zależności  $A_{570}$  od ilości N w próbce.

nr próby	1	2	3	4	5
0,001 M Gly [ml]	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20
0,4 M bufor octanowy, pH 5,5 [ml]	1,00	0,95	0,90	0,85	0,80
odczynnik ninhydrynowy [ml]	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
50% etanol [ml]	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
ilość N w próbce [μg]					
$A_{570}$					

**Uwaga!** 1 M roztwór glicyny ( $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ) zawiera w 1 000 ml 75 g glicyny, co odpowiada 14 g azotu.

### Materiały i odczynniki

- odczynnik ninhydrynowy: rozpuścić 2 g ninhydryny w 50 ml 2-metoksyetanolu, dodać 25 ml 0,4 M buforu octanowego o pH 5,5, 25 ml wody i 0,08 g dwuwodnego chlorku cyny (II)
- 0,4 M bufor octanowy o pH 5,0
- 50% etanol
- 0,003–0,01% roztwór aminokwasu

### Uwagi

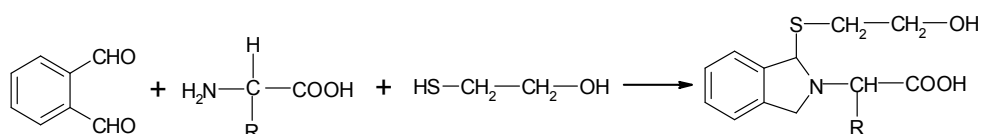
Dodatek  $\text{SnCl}_2$  do odczynnika ninhydrynowego powoduje redukcję części ninhydryny i zapobiega ubocznym reakcjom utleniania, dzięki czemu obserwowana barwa prób jest intensywniejsza i możliwe jest dokładniejsze oznaczenie ilościowe aminokwasów.

### 2.6.3. Oznaczanie wolnych grup aminowych za pomocą aldehydu o-ftalowego

Church F.C., Swaisgood H.E., Porter D.H., Catignani G.L. (1983) J. Dairy Sci. 66, 1219–1227.

### Zasada metody

Aldehyd o-ftalowy (OPA) daje z wolną grupą aminową aminokwasu w obecności  $\beta$ -merkaptetanolu cykliczny produkt (Rys. 2.11), który może być oznaczany ilościowo: spektrofotometrycznie przez pomiar absorbancji przy 340 nm lub fluorymetrycznie przez pomiar emisji światła o  $\lambda = 450$  nm, po uprzednim wzbudzeniu światłem o długości fali  $\lambda = 330$ . Powstający w tej reakcji związek posiada krótki czas trwania (około 10 minut) i nie powstaje w reakcji z proliną (imina). Aby oznaczyć ilość proliny tą metodą, należy ją wcześniej utlenić w reakcji z chloraminą lub chloranem (VII) sodu (nadchloranem sodu). Ze względu na stosunkowo łatwą automatyzację procesu reakcję tę wykorzystuje się w analizie składów aminokwasowych białek i peptydów po uprzedniej ich hydrolizie i rozdziale wolnych aminokwasów w cieczerwowej chromatografii kolumnowej.



Rys. 2.11. Reakcja aldehydu o-ftalowego z aminokwasem

### Postępowanie

1. Do 2 ml odczynnika o-ftalaldehydowego (OPA) dodać 50 µl roztworu aminokwasu, wymieszać i po upływie 2 minut odczytać absorbancję badanej próby przy 340 nm wobec próby odczynnikowej. Odczyt absorbancji powinien nastąpić w czasie nie dłuższym niż 10 minut od zakończenia reakcji.
2. Obliczyć stężenie aminokwasu w próbce badanej, posługując się krzywą kalibracyjną, sporządzoną dla glicyny w zakresie od 3 do 30 µg.

### Materiały i odczynniki

- odczynnik OPA: rozpuścić 3,8 g boraksu  $\times 10$  H<sub>2</sub>O w wodzie, dodać 2 ml etanolu, 2 ml β-merkaptoetanolu, 0,1 g SDS, 0,08 g OPA i uzupełnić do 100 ml; odczynnik o-ftalaldehdowy wykonywać bezpośrednio przed reakcją i przechowywać nie dłużej niż tydzień w temp. pokojowej lub lodówce
- glicyna o stężeniu 0,6 mg/ml

## 2.6.4. Jednokierunkowa wstępująca chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

### Zasada metody

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC, ang. *Thin Layer Chromatography*) umożliwia rozdzielenie mieszaniny związków na poszczególne składniki dzięki różnemu stopniowi podziału między dwie nie mieszające się ze sobą fazy: ruchomą i stacjonarną. Fazą stacjonarną (nieruchomą) jest woda związana adsorpcyjnie na nośniku (np: żel krzemionkowy, tlenek glinu, proszek celulozowy itp.) rozprowadzonym warstwą o grubości 0,1–0,3 mm, na płytkach szklanych, plastikowych lub metalowych. Natomiast jako fazy ruchomej używa się różnych mieszanin rozpuszczalników organicznych.

W układzie utworzonym przez dwie nie mieszające się ze sobą fazy ciekłe oraz rozpuszczoną w nich substancję, jej stężenie w obu fazach w stanie równowagi jest wielkością stałą, opisaną prawem Nernsta:

$$k = \frac{c_1}{c_2}$$

gdzie:

$c_1$  – stężenie molowe składnika w fazie 1,

$c_2$  – stężenie molowe składnika w fazie 2,

$k$  – współczynnik podziału.

**Współczynnik podziału ( $k$ )** zależy od temperatury i właściwości składników fazy ruchomej, a nie zależy od stężenia substancji rozpuszczonej. W praktyce częściej posługujemy się terminem: **stosunek podziału  $K = c_1/c_2$** , gdzie  $c_1$  i  $c_2$  ma wymiar stężenia procentowego.

Miara selektywności rozdziału dwóch substancji A i B w danym układzie jest stopień rozdziału  $\beta$  określony wzorem:

$$\beta = \frac{K_A}{K_B}$$

gdzie:

$K_A$ ,  $K_B$  – stosunki podziału, odpowiednio: substancji A i substancji B między fazą nieruchomą i ruchomą.

Im bardziej  $\beta$  różni się od jedności, tym rozdział dwóch substancji jest łatwiejszy.

W czasie rozwijania chromatogramu mieszanina związków, np. aminokwasów, przemieszcza się w fazie ruchomej nad nieruchomą fazą stacjonarną. W wyniku różnic w strukturze, rozpuszczalności, polarności i ładunku składników dochodzi do specyficznych oddziaływań na zasadzie adsorpcji i wymiany jonowej między fazami, co prowadzi do rozdziału analizowanych związków.

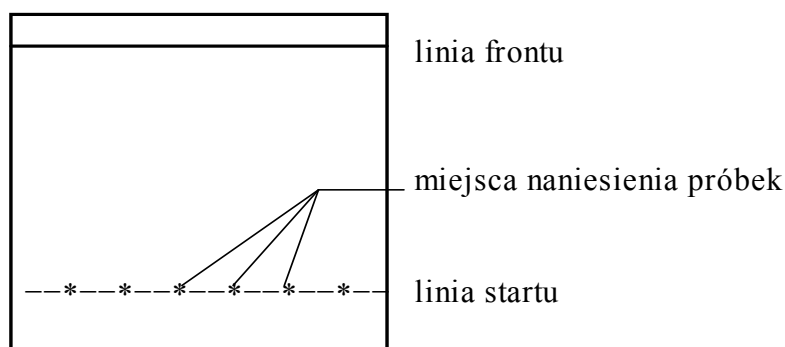
Na płytce z warstwą adsorbentu наносimy niewielkie ilości (kilka, kilkanaście mikrogramów) badanych mieszanin (np. aminokwasów) w niewielkiej objętości rozpuszczalnika (5–20  $\mu$ l), tak by średnica plam była jak najmniejsza (1,5–2 mm). Gdy istnieje taka potrzeba, roztwór mieszaniny można nanosić na płytkę kilkakrotnie małymi porcjami w odstępach czasu, które pozwalają na każdorazowe odparowanie rozpuszczalnika.

Chromatogram rozwijamy w komorze chromatograficznej nasyconej parami składników układu rozwijającego.

Po wywołaniu barwy rozdzielonych substancji, ich położenie na chromatogramie określane jest wartością współczynnika  $R_f$  (ang. *retention value factor*), który wyraża się zależnością:

$$R_f = \frac{\text{odległość środka plamy badanej substancji od miejsca startu}}{\text{odległość czoła fazy ruchomej od miejsca startu}}$$

W celu identyfikacji składników mieszaniny porównujemy otrzymane wartości  $R_f$  dla tychże składników z wartościami otrzymanymi dla pojedynczych, znanych związków, np. aminokwasów (roztwory standardowe). Możemy się w tym celu posłużyć również porównywaniem barw uzyskanych plam.



Rys. 2.12. Schemat płytki do jednokierunkowej wstępującej chromatografii cienkowarstwowej

#### Postępowanie

1. Umieścić niewielką ilość układu rozwijającego (20–50 ml) w komorze chromatograficznej i przykryć ją.
2. Na płytce powleczonej żelom krzemionkowym zaznaczyć miękким ołówkiem linię startu (ok. 1 cm od brzegu płytki) i miejsca nanoszenia próbek.
3. Na zaznaczone miejsca nanieść przy pomocy kapilary badane roztwory aminokwasów w możliwie najmniejszej objętości (5–20  $\mu$ l), pamiętając o tym, by do każdego nanoszonego roztworu używać tylko jednej kapilary (nie mieszać kapilar).
4. Poczekać do wyschnięcia naniesionych próbek.
5. Włożyć płytkę do komory chromatograficznej tak, by jej koniec był zanurzony w układzie rozwijającym, a linia startu była zdecydowanie powyżej poziomu cieczy.

6. Komorę przykryć i rozwijać chromatogram do momentu, gdy czoło fazy ruchomej (układu rozwijającego) znajdzie się około 1 cm od końca płytki.
7. Wyjąć płytkę z komory i natychmiast ołówkiem zaznaczyć na niej miejsce, do którego dotarło czoło fazy ruchomej.
8. Płytkę wysuszyć w strumieniu ciepłego powietrza z suszarki do włosów lub pozostawić do wyschnięcia w temp. pokojowej.
9. Suchą płytkę spryskać odczynnikiem ninhydrynowym i umieścić na około 2 minuty w suszarce laboratoryjnej rozgrzanej do temp. 110°C.
10. Po wyjęciu z suszarki obrysować wybarwione plamy aminokwasów ołówkiem i zaznaczyć środki plam.
11. Zmierzyć wszystkie odległości potrzebne do obliczenia wartości  $R_f$  dla każdej plamy i obliczyć te wartości.
12. Po obliczeniu wartości  $R_f$ , kierując się otrzymanymi wartościami i kolorem plam określić jakościowo skład mieszanin aminokwasów rozdzielanych w chromatografii.

#### *Materiały i odczynniki*

- płytki pokryte żelalem krzemionkowym
- komora chromatograficzna z przykrywką
- suszarka laboratoryjna nastawiona na 110°C
- kapilary
- suszarka do włosów
- spryskiwacz
- odczynnik ninhydrynowy (rozdział 2.6.2)
- układy rozwijające:
  - izopropanol : kwas octowy : woda (7:2:1)
  - n-butanol : kwas octowy : woda (4:1:1)
- 0,5% roztwory kilku wybranych aminokwasów
- 0,5% roztwory mieszanin aminokwasów



**W opracowaniu rozdziału Aminokwasy korzystano z następujących źródeł:**

- Hancock W. (red.) *Handbook of HPLC for separation of amino acids, peptides, and proteins*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida 1986.
- The handbook of analysis and purification of peptides and proteins by reversed-phase HPLC*. Broszura informacyjna firmy GRACE VYDAC, dostępna pod adresem internetowym <http://www.vydac.com/vydacpubs/brindex.html>.
- Freeland S.J., Hurst L.D. (2004) *Ewolucja języka genów*. *Świat Nauki* 5, 56–63.
- Jakubke H-D., Jeschkeit H. *Aminokwasy, peptydy, białka*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1989.
- Kączkowski J. *Biochemia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1992.
- Kłyszewko-Stefanowicz L. *Ćwiczenia z biochemii. Praca zbiorowa*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
- Kyte J., Doolittle R.F. (1982) *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein*. *J. Mol. Biol.* 157, 105–132.
- Mastalerz P. *Chemia organiczna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1986.
- Mejbaum-Katzenellenbogen W. *Ćwiczenia z biochemii dla biologów*. Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław 1992.
- Walker J.M. (red.) *Methods in Molecular Biology. New protein techniques. Vol. 3*, Humana Press Clifton, New Jersey 1988.
- Minakowski W. *Biochemia kręgowców*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1990.
- Stryer L. *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
- Voet D., Voet J.G. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York 1990.
- Windholtz M. (red.) *The Merck Index. An Encyclopedia of chemicals and drugs*. MERCK & CO., Inc. Rahway, N.J., USA 1976.
- Witkiewicz, Z. *Podstawy chromatografii*. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2000.
- Strona internetowa International Union of Pure and Applied Chemistry: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/>