

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ
ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ

М.УЛУҒБЕК НОМИДАГИ ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ
УНИВЕРСИТЕТИ

Р.П. ИГАМНАЗАРОВ, М.М.АБДУЛЛАЕВА, Г.Б.УМАРОВА

БИОКИМЁВИЙ ТАДҚИҚОТ УСЛУБЛАРИ

ТОШКЕНТ 2003

24.1

«Биокимёвий тадқиқот услублари» Услубий қўлланма, Тошкент, ЎзМУ, 2003, 88 – бет.

Ушбу услубий қўлланма университетларнинг биология, экология ва қишлоқ хўжалиги соҳасида таҳсил олаётган юқори курс талабалари учун мўлжалланган бўлиб, унда асосан баъзи биокимёвий тадқиқот услублари келтирилган.

Қўлланмада шу соҳадаги қўлланилиб келинаётган анъанавий, аниқ ва сезгир услублар, ҳамда бир қатор замонавий услублар ёритилган.

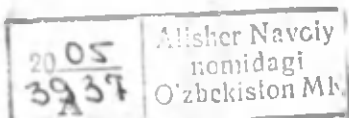
Қўлланмадан университет талабаларидан ташқари педагогика институтларининг биология ва табиатшунослик мутахассислиги талабалари ҳамда бошқа изланувчилар ва аспирантлар фойдаланиши мумкин.

МУАЛЛИФЛАР: б.ф.н., доцент Игамназаров Р.П., б.ф.н., доцент Абдуллаева М.М., б.ф.н. Умарова Г.Б.

Масъул муҳаррир: биология фанлари доктори, проф. Долимова С.Н.

Тақризчилар: Биология фанлари доктори, проф. Мирхамидова П., биология фанлари номзоди, доцент Асомов Д.К.

1031421
2.

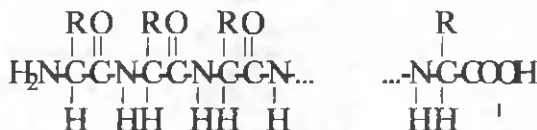


ОҚСИЛЛАР

Оқсил — мураккаб тузилишга эга бўлган биополимер бўлиб, ҳужайра қуруқ массасининг 50% ташкил қилади, ҳамда тирик организмнинг барча ҳаётий жараёнларида фаол иштирок этади. Табиий оқсилларнинг қурилиш бирлиги бўлиб 20 хил аминокислота (АК) хизмат қилади. Аминокислоталарнинг полипептид занжирида ўзаро жойлашиш тартиби ва сони оқсилнинг бирламчи структурасини белгилайди.

Оқсилнинг бирламчи структурасида АК лар ўзаро полипептид боғлари ёрдамида бириккан. Пептид боғининг ҳосил бўлишида биринчи АК нинг карбоксил группаси ($-COOH$) ва иккинчи АК нинг аминогруппаси ($-NH_2$) иштирок этади. Улар ўртасидаги ферментатив реакция асосида бир молекула сув ажралиши ҳисобига карбоксил группасидаги утлерод билан аминогруппадаги азот орасидаги боғ ҳосил бўлади

$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{N}- \\ | \\ \text{H} \end{array}$
 Маълумки, оқсил молекуласидаги барча АК лар ўзаро пептид боғи орқали боғланган. Полипептид занжиридаги эркин $-NH_2$ группа томони унинг N учи, эркин $-COOH$ группаси мавжуд томони эса C учи деб юритилади (1 — расм)



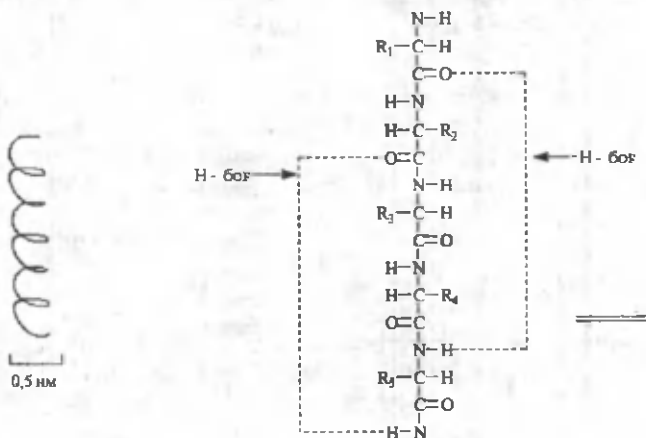
1 — расм. Оқсилларнинг бирламчи структураси

Оқсил таркибидаги АКлар кетма-кетлиги унинг функциясини белгилайди. Бу кетма-кетлик ДНК томонидан қатъий белгиланган ва ўзгармас бўлиб, наسدан наслга берилади. Бирорта АК нинг ўрни алмашиб қолиши оқсил функциясининг ўзгаришига олиб келади. Масалан: ўроқсимон ҳужайрали камқонлик касаллигининг келиб чиқишига сабаб гемоглобиндаги глутамин АК сининг валинга алмашиб қолишидир.

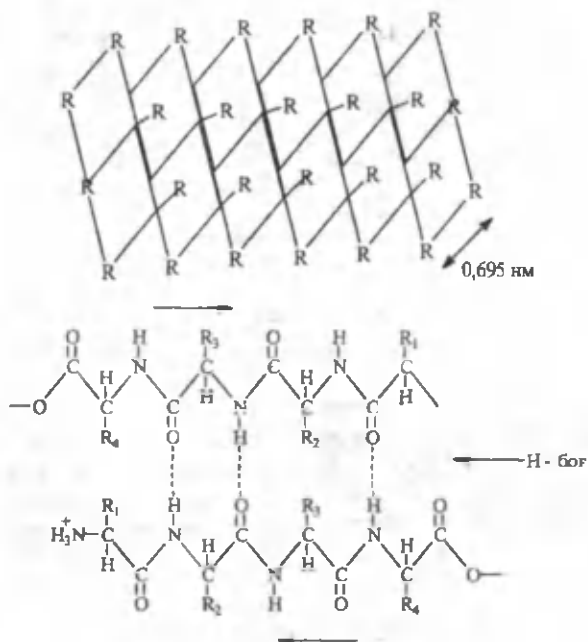
1953 йилда инглиз олими Сенгер томонидан инсулин молекуласидаги АК лар кетма-кетлиги биринчи мартаба

аниқланган бўлиб, унинг таркибидаги 51 та АК 2 та полипептид занжирида жойлашган экан.

Иккиламчи структура учун оқсилларнинг α -спираль ва β -структура кўринишлари хос. Бу кўринишлар оқсил молекуласидаги 1-АКнинг NH-гуруҳи 4-АК даги СО-группаси билан Н боғи орқали боғланиши ҳисобига ҳосил бўлади. Шу тариқа боғланиш оқсил молекуласининг спираль ҳолда тахланишига сабаб бўлади. Рентгеноструктур анализ ёрдамида спиралнинг битта айланиши 3,6 аминокислотага тўғри келиши, унинг узунлиги 0,54 нм эканлиги аниқланган (2 а расм). Соч, тирноқ, шоҳни ташкил қилувчи оқсил кератин α -спиралнинг айланма ҳолидаги кўринишга эга бўлса, β -структура тахланган кўринишга эгадир. (2 в -расм)



занжирнинг йўналиши
(С учидан N учига қараб)



β -структурасида полипептид занжир қўшни занжирга нисбатан антипараллел жойлашган ва бир занжирдаги $\text{CO}-$, NH_2 -группалари қўшни занжирдаги $\text{CO}-$, NH_2 -группалари билан мос равишда H -боғлари орқали боғланган. Ипак қурти пилласи оқсили – фиброин β -структура кўринишига эга бўлган оқсидир. Иккиламчи структурани ҳосил қилишда асосан H -боғлари иштирок этади. Ковалент боғига нисбатан 20 мартаба кучсиз бўлишига қарамай, H боғларининг кўплиги иккиламчи структуранинг мустаҳкамлигини таъминлайди.

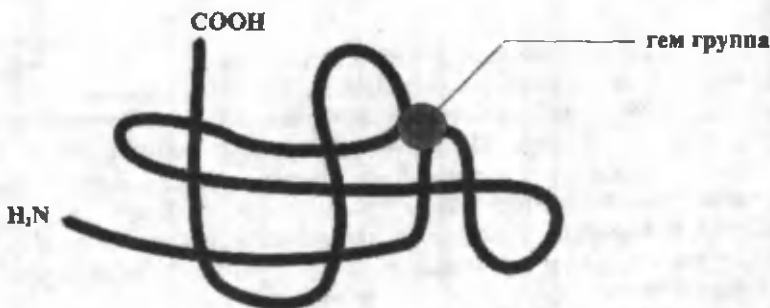
Пай оқсили – коллоген бир мунча мураккаброқ шаклдаги β -структурага эга. Бу ҳолда учта полипептид занжир ёнма – ён жойлашган ва H боғлари орқали бир – бири билан бириккан. Шунга кўра пайнинг узулиши қийин, чўзилмайди, бу ҳолат пайнинг организмда бажарадиган вазифасига ҳам мос келади.

Полипептид занжирининг фазода тахланиб йиғилиши ва ихчам (компакт) ҳолатга келиши оқсилнинг учламчи структураси деб юритилади. Бу структуранинг ҳосил бўлишида ион, дисульфид, водород ҳамда гидрофоб боғлар иштирок этади. (3 – расм)

$C=O$	$H-N$	– АК лар орасидаги водород боғ
$-O-H$	$O=C$	– АК нинг R группалари орасидаги H боғ
$—S—$	$S—$	– дисульфид боғ
$-COO^-$	H_3N^+	– зарядланган группалар
$—R$	R	ўртасидаги ион боғ нополяр R–группа орасидаги гидрофоб боғ

3 – расм. Учламчи структуранинг ҳосил бўлишида иштирок этадиган боғлар

Учламчи структуранинг ҳосил бўлишида гидрофоб боғлари алоҳида аҳамиятга эгадир. Улар ҳисобига оқсил таҳлиб йиғилганда гидрофоб қисми молекуланинг ички томонига, гидрофил қисми эса ташқи томонига жойлашади. Учламчи структурага мисол сифатида миоглобинни кўрсатиш мумкин. (4 – расм)



4 – расм. Миоглобиннинг тузилиши.

Бир нечта полипептид занжирларнинг ўзаро бирикиб фазовий конфигурация ҳосил қилиши натижасида оқсиллар мураккаб тузилишга эга бўлади. Бундай структура тўртламчи структурани ташкил этади. Масалан: гемоглобин 4 та полипептид занжирдан иборат бўлиб, иккитаси α занжирли 141

АК қолдигидан, иккинчиси β занжирли 146 АК қолдигидан ташкил топган.

Шуни таъкидлаб ўтиш лозимки, оқсиллар ўз хусусиятини ва функциясини фақат учамчи ва тўртламчи структуралар ҳолатидагина намоён қиладилар.

Оқсиллар таркиби, структураси, функцияси ва эрувчанлигига кўра классификацияланади.

Оқсиллар таркибига кўра 2 хил бўлади:

1. Оддий оқсиллар – парчаланганда фақат АК ҳосил қилади.

2. Мураккаб оқсиллар – парчаланганда АК лардан ташқари протетик группа ҳам ҳосил қилади.

Протетик группа: фосфопротеида – фосфат кислота, гликопротеида – углевод, нуклеопротеида – нуклеин кислота, хромопротеида – пигмент, липопротеида – липид, флавопротеида – ФАД (флавинадениндинуклеотид), металлопротеида – метал ҳисобланади.

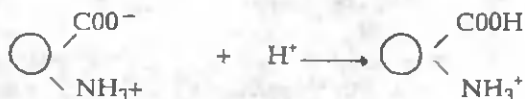
Структурасига кўра улар фибриляр ва глобуляр оқсилларга ажратилади. Фибриляр оқсиллар ипсимон кўринишга эга, ички томони гидрофоб, ташқи томони гидрофил бўлганлиги сабабли сувда яхши эрийди ва коллоид суспензия ҳосил қилади. М: гемоглобин, инсулин.

Функциясига кўра оқсиллар қуйидагича фарқланади:

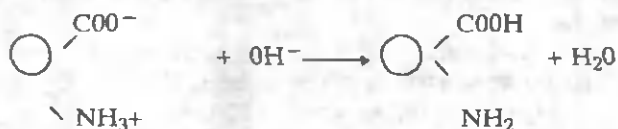
1. **структура оқсиллари** – коллоген, кератин ва ҳ. Соч, суяк, тирноқ, шоҳ, пат структура оқсилларига киради;
2. **каталитик оқсиллар** – липаза, трипсин ва б. оқсил табиатига эга бўлган биологик катализаторлардир. Улар организмда борадиган химиявий реакцияларни амалга оширишда қатнашадилар.
3. **гормон оқсиллар** – инсулин, гликокон, триотрипин ва бошқалар организмда борадиган моддалар алмашинувини бошқариб туради. М: инсулин қондаги глюкоза миқдорини ростлаб туради.
4. **ташувчи оқсиллар** – гемоглобин, миоглобин. Қонда мускулларда O_2 ёки CO_2 ни ташийди.
5. **ҳимоя оқсиллари** – антителолар. Организмга ёт моддалар (аятиген) тушганда уларни зарарсизлантиришда иштирок этадилар.
6. **қисқарувчи оқсиллар** – актин, миозиннинг фаолияти туфайли мускулларнинг қисқариши содир бўлади.
7. **запас озиқ модда оқсиллари** – тухум альбумини, сут казеини мисол бўла олади.

ОҚСИЛЛАРНИНГ ХОССАЛАРИ

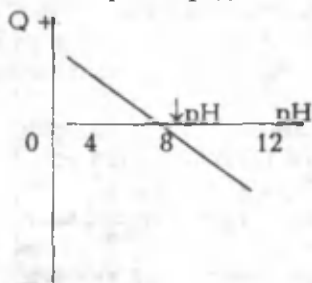
Оқсиллар таркибидаги эркин COO^- , NH_3^+ группалар сонига кўра ёки мусбат ёки манфий зарядга эга бўлади. Кўпчилик оқсиллар АКга ўшаш амфотер хусусиятга эга. Уларнинг зарядини муҳит рН белгилайди. М: кислотаи муҳитда оқсил мусбат зарядланади ва электр майдонида катодга қараб ҳаракатланади.



Ишқорий муҳитда эса манфий зарядга эга, электр майдонида анодга қараб ҳаракатланади.



Муҳит рН нинг маълум кўрсаткичида оқсилнинг умумий заряди 0 га тенг бўлиб қолади ва электр майдонида ҳаракатланмайди. Муҳит рНнинг шу кўрсаткичи оқсилларнинг изоэлектрик нуқтаси дейилади. Оқсил юқори рН кўрсаткичида эса манфий зарядга эга (5 – расм).



5 – расм. Оқсилга рН муҳитининг таъсири

Янги сутнинг рН кўрсаткичи казеиннинг изоэлектрик нуқтасидан катта. Сутга тушган бактерия ўз фаолияти натижасида сут, сут кислотасини ҳосил қилади, бу эса муҳит рНнинг пасайишига сабаб бўлади, рН кўрсаткичи казеиннинг изоэлектрик нуқтасига етганда (рН=4,7) сут ивиб, казеин чўқади.

Оқсиллар бир қатор юқори молекуляр бирикмалар каби, сувда эриганда коллоид эритма ҳосил қилади. Оқсилнинг сувда эриш механизми қуйдагича тушунтирилади: эритмада оқсил

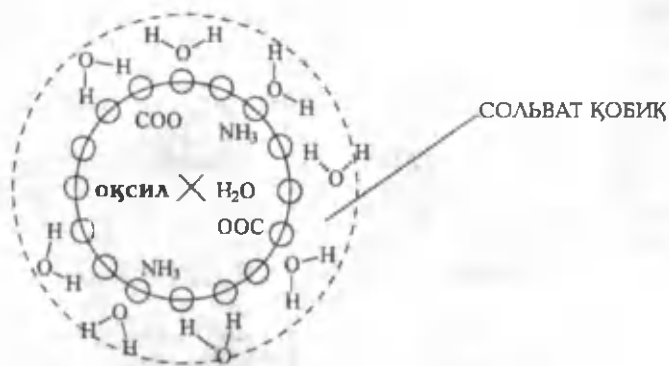


молекуласининг ташқи моноген группалари диссоциацияга учрайди.

Диссоциацияланган оқсил сувнинг дипол зарядланган молекулаларини ўзига тортади. Сув молекулалари оқсил молекулаларини ўраб олиб сольват қобиқ ҳосил қилади. (6 – расм) Бу қобиқ оқсил молекуласининг бир – бири билан бирикиб агрегатланишига йўл қўймайди. Эритма туз – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, органик эритувчилар (ацетон, спирт) қўшилганда чўкмага тушади.

6 – расм. Сольватланган оқсил.

Оқсилларнинг табиий структурасини йўқотишига



денатурация деб аталади. Денатурацияга учраган оқсил ўз

функционал хусусиятини йўқотади. Денатурация қайтар ва қайтмас бўлади.

Иккала ҳолда ҳам оқсилдаги аминокислоталар кетма – кетлиги сақланиб қолади. Денатурацияга учраган оқсил муҳит шароити ёки рН кўрсаткичи ўзгариши натижасида яна ўз табиий ҳолига қайтиб келиши ренатурация ёки қайтар денатурация дейилади. Қайтмас денатурацияга учраган оқсиллар бундай хусусияга эга бўлмайди. Қуйидаги факторлар денатурацияга сабаб бўлади:

а) юқори температура, инфрақизил ва ультрабинафша нурлар таъсирида нурланиш. Оқсилга таъсир этаётган кинетик энергия унинг атомларида кучли қўзғалиш юз беришига сабаб бўлади, натижада кучсиз Н ва ион боғлари узилади, оқсил денатурацияга учрайди;

б) кучли кислота, кучли ишқор ва концентранган туз эритмалари ион боғини узади, юқори температурада узоқ таъсир эттирилса, пептид боғларини ҳам узиши мумкин;

в) оғир металллар, метал катиони оқсилнинг карбоксил аниони билан мустақкам бирикиши ҳисобига ион боғи узилади;

г) органик эритувчи ва детергентлар. Бу реагентлар оқсилнинг гидрофоб қисми билан боғланиб Н боғларининг узилишига сабаб бўлади. Спиртнинг дезенфекцияловчи восита сифатида қўлланилиши унинг шу хусусиятига асосланган. Спирт таъсирида бактерия денатурацияга учрайди ва ўз фаолиятини тўхтатади.

ОҚСИЛЛАРНИ АЖРАТИШ ВА ТОЗАЛАШ УСУЛЛАРИ

Ҳужайра таркибидаги оқсилни ажратиш олиш ва тозалаш қуйидаги босқичларни ўз ичига олади:

1. ҳужайра деворини бузиш, ҳужайра структура элементларини ажратиш олиш ва улардан оқсилни сольобилизациялаш, яъни оқсилни эритмага ўтказиш;
2. тегишли оқсилни бошқа оқсиллардан ажратиш ёки қисман тозалаш (чўктириш, тузлаш).
3. оқсилни гель – фильтрация, ион алмашинув ёки адсорбцион хроматография ҳамда гель – электрофорез ва бошқа усуллар ёрдамида тўлиқ тозалаш.

ҲУЖАЙРА ОҚСИЛИНИ АЖРАТИШ

Ҳужайра оқсилни ажратиш олиш учун дастлаб ҳужайра бир бутунлигини таъминлаб турувчи ҳужайра деворини бузиш лозим. Бу жараёни амалга ошириш учун керакли услуб ва

шароит объектнинг хусусиятидан келиб чиқиб танланади. Масалан: ҳайвон органлари, ўсимлик барглари қайчи ва пичоқ ёрдамида кесиб майдаланади (ёки гўшт қиймалагичдан чиқарилади) ва махсус гомогенизатор ёрдамида бир хил масса — гомогенат ҳолига келтирилади. Бактерия ва бошқа микро— организмлар биомассасидан гомогенат ҳосил қилишда кварц ёки шиша кум, махсус инерт моддалардан тайёрланган майда шарчалар билан ховончада эзиш, ультратовуш таъсир эттириш, пресс ёки тегирмондан ўтказиш каби усуллардан фойдаланилади.

Микроорганизм ҳужайрасининг мустақкам деворини бузишда гидролитик ферментлар кенг қўлланилади. Масалан: лизоцим ҳужайра деворини ҳосил қилувчи пептидогликанин парчалайди, бунда ҳужайра протопластга зиён етмайди, ҳужайранинг бир бутунлиги сақланиб қолади. «Деворсиз» ҳужайрани дистилланган сувга солиб ҳужайра оқсиллини эритмага ўтказиш мумкин. Дистилланган сув ҳужайранинг ярим ўтказгич мембранаси орқали ичкарига кириб, у ердаги осмотик босимни оширади, натижада ҳужайра ёрилади. Ҳужайранинг компонентлари билан бир қаторда цитоплазматик оқсиллар ҳам эритмага ўтади. Тўқимани (ҳужайрани) гомогенлаш, оқсилни экстракция қилиш, ажратиш ва тозалаш вақтида температура, эритма муҳитининг рН кўрсаткичи катта аҳамиятга эга. Чунки оқсиллар лабил моддалар бўлиб хона температурасида қисман денатурацияга учраши, ферментлар эса ўз активлигини йўқотиши мумкин. Шу сабабли барча жараёнлар паст температурада (2°C дан $+4^{\circ}\text{C}$ гача) олиб борилади.

Эритма муҳити оқсилнинг хусусиятига кўра танланади. Асосан рН -7 бўлган буфер эритмалар қўлланилади, чунки кўпчилик ферментлар ўта ишқорий, ҳамда нордон муҳитларда ўз активлигини йўқотади. Ажратиб олиш ва тозалаш вақтида фермент стабиллигини ошириш учун буфер эритмага ЭДТА, меркаптоэтанол, сахароза каби стабилловчи моддалар қўшилиш мумкин.

Ҳужайра девори бузилиб, оқсил эритмага ўтказилгач, гомогенат центрифугаланади. Бунда ҳужайра қобиқлари чўкади ва эритмада эриган моддалар, шу жумладан оқсиллар ҳам супернатантга ўтади. Чўкма 1—2 марта буфер эритма билан ювиб центрифугаланади ва супернатант аввалгиларига қўшилади. Кейинги тозалаш ишларида тиниқ ҳолдаги супернатант қўлланилади, чўкма эса ташлаб юборилади.

ОҚСИЛЛАРНИ ҚИСМАН ТОЗАЛАШ

Ажратиб олинган супернатант таркибида хусусиятлари ўрганилаётган оқсидан ташқари яна кўплаб бошқа оқсиллар ҳам мавжуд. Улардан тегишли оқсилни ажратиб олишда оқсилларнинг эрувчанлик хусусиятидан фойдаланилади. Кўпчилик оқсилларнинг эрувчанлиги муҳитнинг рН кўрсаткичи, ион кучи, оғир металл ионлари ва органик эритувчиларнинг таъсирига боғлиқ бўлиб, ҳар бир оқсил учун ўзига хосдир. Қисман тозалаш давомида тегишли оқсил эритмада қолдирилиб, «кераксизлари» чўкмага туширилади ёки аксинча тегишли оқсил чўкмага туширилиб, центрифуга ёрдамида ажратиб олиниб, супернатант ташлаб юборилиши мумкин.

Оқсилни чўктириш учун қуйидаги усуллар қўлланилади: термик ишлов, эритма рНни ўзгартириш, оғир метал ионлари, органик эритувчи ва тузлар ёрдамида чўктириш.

Термик ишлов бериш усулидан фақат термостабил оқсилларни ажратиб олишда фойдаланилади. Эритманинг рН муҳитини ўзгартириш усули билан чўктириш оқсилнинг изоэлектрик нуқтасини ҳисобга олган ҳолда олиб борилади. Кислота ёки ишқорни томчилатиб кўшиш натижасида муҳитнинг рНни ўзгартирилади ва оқсилнинг изоэлектрик нуқтасига мос келганда чўкма ҳосил бўлади. Чўкма центрифугада ажратиб олинади, эритмада қолган нокерак оқсиллар ташлаб юборилади.

Оқсилларни чўктиришда оғир металл ионларидан симоб, кўрғошин, мис, кумуш ишлатилади. Бу ҳолда оқсил денатурацияга учрайди ва мураккаб комплекс ҳосил қилиб чўкмага тушади. Бундай чўктиришда тез қайта ишлов бериш ҳал қилувчи роль ўйнайди. Чунки юқоридаги ионларнинг узоқ вақт таъсир этиши қайтмас денатурацияга олиб келиб, ферментларнинг инактивациясига сабаб бўлиши мумкин.

Органик эритувчилардан — метанол, этанол, ацетон оқсил молекуласининг сувли қаватини тортиб олади (дегидратлаш). Натижада оқсиллар бирикиб чўкмага тушади. Хона ҳароратидаги органик эритувчилар оқсилнинг қайтмас денатурациясига сабаб бўлиши мумкин. Шу сабабли органик эритувчиларни -15° — 20°C гача совутиб эритмани аралаштириб турган ҳолда аста — секин қўшилади.

Кўпчилик ҳолларда оқсилни тозалаш учун бир неча усул кетма — кет қўлланилади. Оқсилларни чўктиришда энг кўп қўлланиладиган усуллардан бири нейтрал тузлар ёрдамида тузлаш ҳисобланади. Бу усул билан чўктиришда кўпинча ишқорий — ер металлариининг тузларидан фойдаланилади.

ОҚСИЛЛАРНИ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ЁРДАМИДА ЧЎКТИРИШ

Оқсилларни туз ёрдамида чўктириш учун аксарият аммоний сульфат қўлланилади. Бунга сабаб, биринчидан, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ сувда жуда яхши эрийди. (25°C 750 г/л да тўйинган эритма ҳосил бўлади) иккинчидан, унинг эрувчанлиги температурага деярли боғлиқ эмас. Энг муҳими аммоний сульфат иштирокида кўпчилиқ ферментлар ўз активлигини йўқотмайди.

Эритмадаги ион кучи ортиши билан оқсилнинг эрувчанлиги кескин пасаяди. Буни қуйидаги тенгламада кўришимиз мумкин:

$$\lg S = \beta - K_s \cdot M$$

бу ерда, S — оқсилнинг эрувчанлиги, г/л

β — ион кучига эга бўлган гипотоник эритувчидаги оқсилнинг эрувчанлиги

M — ион кучи

K_s — тузлаш константаси

Эритмада туз концентрациясининг юқори бўлиши тузланишнинг самарали бўлишига олиб келади, чунки оқсил молекуласини гидратловчи сув молекулалари туз таъсирида камаяди. Натижада оқсиллар агрегатланиб чўкмага тушади. K_s тузнинг табиатига боғлиқ бўлса, β оқсил табиатига боғлиқ, шу сабабли аммоний сульфатнинг маълум концентрацияли эритмасида тегишли оқсилни чўкмага тушириб аралашмадан ажратиб олиш мумкин.

Оқсил эритмасини $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ билан тузлашда туз концентрацияси «тўйиниш фойизларида» ёки «тўлиқ тўйинишнинг ўнли касрларида» ифодаланади. 25°C да 1 л сувда 760 г гача аммоний сульфат эрийди, бу эритма тўйиниш фойизиди 100%, тўлиқ тўйинишнинг ўнли касрларида эса 1,0 деб олинади. Шунга мос равишда 10, 20, 30, 40... % ли тўйиниш даражасида ёки 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; ... ўнли касрларида белгиланади.

Оқсилни туз ёрдамида чўктириш қўйидагича олиб борилади: оқсилни чўктирилиши керак бўлган ҳужайрасиз экстракт ёки культура суюқлигига ошиб бориш тартибида (0,1; 0,3; 0,5 ва ҳ.) аммоний сульфат қўшиб борилади, бунинг учун 1-жадвал маълумотларидан фойдаланилади. Жадвалдаги вертикал устунда эритманинг дастлабки тузга тўйиниш даражаси берилган, горизонтал йўналиш бўйича эса тайёрланиши лозим бўлган эритманинг тузга тўйиниш даражаси кўрсатилаган.

Жадвалдан фойдаланишни қуйидаги мисолда тушунтириш мумкин: дастлаб оқсил эритмасида 0,1 миқдордаги тўйиниш даражаси ҳосил қилиш керак бўлса, у ҳолда жадвалдан вертикал йўналиш бўйича 0,0; горизонтал 0,1 нинг кесишган жойи 76,0 га тўғри келади. Демак, ҳужайрасиз экстрактнинг 1 литрига 76 г аммоний сульфатдан оз-оздан аралаштириб қўшилади. Эритмани тўхтовсиз аралаштириб туриш шарт, чунки туз эриётган жойда концентрация юқори бўлиб кетиши ҳисобига «бегона» оқсиллар чўкмага тушиши мумкин. Тузлаш давомида эритманинг рН камайиб кетса, у суюлтирилган NH_4OH эритмаси ёрдамида нейтралланади. Керакли миқдордаги туз эриб бўлгач 10–15 минут аралаштириб турилади, сўнг 4–10 минг айланиш тезлигида 20–30 минут центрифугаланади. Агар ажратилмоқчи бўлган оқсил чўкмада бўлса чўкма дистилланган сув ёки буферда эритиб тузсизлантирилади агар эритмада (супернатантда) бўлса, у ҳолда тузлаш давом эттирилади. Бунинг учун яна 1–жадвалдан фойдаланилади. М: тузлаш даражаси 0,3 бўлиши лозим бўлса вертикал бўйича –0,1; горизонтал –0,3; кесишган жойи –70,4 га тўғри келади. Демак, эритмага яна 70,4 г аммоний сульфат тузи оз-оздан қўшиб эритилиши керак. Шу тарзда юқоридаги кетма-кетлик яна қайтарилади. Бу жараён тегишли оқсил чўкмага тушганлиги учун специфик хусусиятига қараб, масалан; фермент бўлса унинг активлигига кўра аниқланади. Тузлаш тугагач тузсизлантириш лозим. Тузсизлантириш учун гельфилтрация ёки диализ услубларидан фойдаланилади. Диализ тузсизлантиришнинг энг содда услуби ҳисобланади. Бунинг учун махсус ярим ўтказгич хусусиятига эга бўлган целлофан қопчага диализ қилинмоқчи бўлган эритма солиниб оғзи беркитилади ва дистилланган сувга солиб қўйилади. Эритмадаги ортикча туз ионлари диффузия йўли билан дистилланган сувга ўтади. Дистилланган сув тез-тез алмаштирилиб турилса диализ яхши боради. Кўпчилик оқсиллар термолабиллик хусусиятига эга бўлганлиги сабабли диализ паст температурали совиттич камераларида (-2° ; $+4^{\circ}\text{C}$) ўтказилиши лозим.

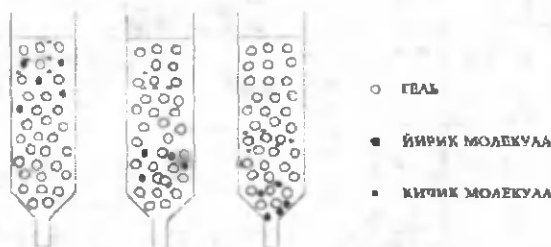
Маълум миқдорда $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ билан тўйинган 1 л эритмани янада тўйинтириш учун керак бўлган аммоний сульфат миқдори (граммларда)

	Охириги тўйиниш даражаси									
	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
0,0	76,0	52,0	228,0	304,0	380,0	456,0	532,0	608,0	684,0	760,0
0,1	–	73,5	246,9	220,0	293,0	367,3	440,8	514,2	587,7	661,1
0,2	–	–	70,4	140,7	211,1	281,5	351,9	422,2	492,6	563,0
0,3	–	–	–	67,9	135,7	203,6	271,4	339,3	407,1	475,0
0,4	–	–	–	–	65,5	131,0	196,5	262,0	327,5	399,0
0,5	–	–	–	–	–	63,3	126,7	189,0	253,3	316,7
0,6	–	–	–	–	–	–	61,3	122,6	183,9	245,2
0,7	–	–	–	–	–	–	–	59,4	118,7	178,1
0,8	–	–	–	–	–	–	–	–	57,6	116,2
0,9	–	–	–	–	–	–	–	–	–	55,9

ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ (Гель-хроматография)

Гель-фильтрация услуби моддаларни ўлчами, оғирлиги, шаклига кўра ажратишга асосланган. Бу услуб ёрдамида оқсилларни молекуляр оғирлигига кўра ажратиш, оқсил фракцияларини тозалаш, оқсил эритмаларини концентрлаш (қуюлтириш), тузсизлантириш ва оқсилларнинг молекуляр оғирликларини аниқлаш мумкин. Бу жараёнларнинг барчаси «молекуляр элак» принципида амалга оширилади.

Услубнинг моҳияти. «Молекуляр элак» вазифасини бажарувчи гель дончалари билан тўлғизилган колонка орқали оқсил аралашмаси ўтказилганда кичик молекулалар гель ғовакларида тутилиб қолади, натижада уларнинг ҳаракати сустлашади. Йирик молекулалар гель ичига кира олмайди. Шу сабабли, дастлабки фракцияларда юқори молекуляр, кейингиларида эса кичик молекуляр оқсиллар йиғилади. (7-расм)



7-расм. Моддаларни гелъ – филътрация услубида ажратишнинг схематик тасвири.

Гел турлари. Гелъ сифатида сувда, тузли, тузсиз кислотали, ишқорий эритмаларда эрийдиган, юқори гидрофил, кучли бўхувчи полимерлар қўлланилади. Шундай геллардан бири «Фармация» номли швед фирмасининг сефадексларидир. Сефадекслар гаюкозанинг табиий полимери – декстранга эпихлоргидрин таъсир эттириб олинади. Бунга декстраннинг узун занжири учбурчак говак ҳосил қилиб бирикади. Говакнинг ўлчами эпихлоргидриннинг миқдорига боғлиқ. Сефадекслар Г (С) харфи билан белгиланиб, «сувни ютиш ҳажми» билан фарқланадилар.

2-жадвал

Сефадекс турлари

Гелъ тури	Молекулъ оғирлигига кўра ажратиш қобилияти, дальтонда	Сувни ютиш ҳажми, л/г қуруқ гелга нисбатан	Бўккан гелнинг ҳажми см ³ /г, қуруқ гелга нисбатан
Г-10	700 гача	1,0	2
Г-15	1500 гача	1,5	3
Г-25	1000 – 5000	2,5	5
Г-50	1500 – 30000	5,0	10
Г-75	3000 – 80000	7,5	12 – 15
Г-100	4000 – 150000	10,0	15 – 20
Г-150	5000 – 300000	15,0	20 – 30
Г-200	5000 – 600000	20,0	30 – 40

Сефадексларни бўктиришда одатда кучсиз кислотали эритмалардан фойдаланилади, чунки кучли кислотали муҳит сефадексларнинг гликозид боғларига таъсир кўрсатади. Сефадекслар дистилланган сувда бўктирилганда, электростатик

тортишув туфайли бир-бирига ёпишиб қолиши мумкин. Электролитларда эса бундай ҳолат кузатилмайди. Шу сабабли сефадексларни кучсиз тузли эритмаларда бўктириш мақсадга мувофиқдир. Барча геллар тез бўлинади, лекин бўкиш тўлиқ бориши учун уларни маълум муддат эритмада ушлаш лозим. Агар гель тўлиқ бўлмаган бўлса, бу жараён гель билан тўлдирилган колонкада давом этади. Натижада гель доначалари зичлашиб эритманинг ўтишини қийинлаштиради. Ишлатиб бўлгач сефадексни автоклавда (100°C да, 40 мин) стерилизация қилиш мумкин.

Гель – фильтрация ишлатиладиган гелларга агарозалар ҳам киради. Агароза геллари – чизиқли полисахарид бўлиб, D – галактоза ва 3,6 – ангидро – L галактоза қолдиқларининг кетма – кет бирикишидан ҳосил бўлган.

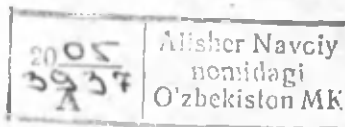
Сефароза, биогель А, гелароза, сагавак – агароза геллари ҳисобланади. Бу геллар ҳам декстран генларига ўхшаш гидрофил хусусиятига эга ва таркибида зарядланган группа тутмайди. Бу генларнинг говаклик даражаси юқори бўлганлиги сабабли катта молекуляр оғирликка эга бўлган моддаларни ажратишга қўлланилади (Г – 200 гели 600000 дальтонгача бўлган молекулаларни ажратади). Шу сабабли агароза геллари вируслар, НК ва полисахаридларни текширишга қўлланилади.

Агароза геллари юқори концентрациядаги туз эритмаларида, 96% ли спиртта, рН 4 – 10 бўлган мухитда турғун ҳисобланади. Гель билан ишлаш учун оптимал ҳарорат 0 – 30°C бўлиб, ундан юқори ҳароратда гель юмшаб қолади, паст ҳароратда эса ўз хусусиятини йўқотади.

Полиакриламид геллари акриламид ва метиленбисакриламиднинг полимери бўлиб, иккала мономер нисбатини ўзгартириш билан маъқул ўлчамдаги говаклик ҳосил қилиш мумкин. «Bio – RadLo – barafopis» фирмаси томонидан 30 хилдан ортиқ полиакриламид асосига эга бўлган биогеллар ишлаб чиқарилади, улардан Р – 2, Р – 6, Р – 10, , Р – 300 ва ҳакозолар. Улар 800 – 400000 дальтон молекуляр оғирликка эга бўлган моддаларни ажратишда қўлланилади. Бу геллар ҳам рН муҳити 4,5 – 9 дан ошганида ва 50°C дан юқори ҳароратда ўз стабиллигини йўқотади.

Гель ўрнида «биоглас» ва «порасил» номи билан юритиладиган говаксимон шарчалардан ҳам фойдаланилади. Бу шарчалар боросиликат шишасидан ясалган бўлиб, бир қатор ижобий хусусиятларга эга:

а) HF ва кучли ишқорлардан ташқари барча реагентларга нисбатан инерт:



б) шарчалар ишта тайёр ҳолда бўлганлиги сабабли бўқиши учун ортиқча вақт сарфланмайди:

в) эритма катта тезликка ўтказилганда ҳам шарчалар ҳолати ўзгармайди (бир – бирига ёпишиб қолмайди, зичлашиб кетмайди)

г) шиша шарчаларнинг поралари ўлчами эритма концентрацияси рНига боғлиқ эмас:

д) шиша шарчаларни осон ювиб стериллаш мумкин.

Гельфилтрация олиб борилаётган гелларда ички турғун ва ташқи ҳаракатланувчи фазалар мавжуд. Шу зайдда гелнинг умумий ҳажми 2 қисмдан: ташқи – гранула ташқарисидеги ҳажм (V_0) ва ички ҳажмидан (V_i) дан иборат. Текширилаётган модданинг гел говаклари ичига кириши ёки гел атрофида тарқалишини тарқатиш коэффициентини кўрсатади. Бу кўрсаткич молекуланинг ўлчамига боғлиқ бўлиб, агар молекулалар катта бўлса, улар гел говаклари ичига кира олмайди ва $K_d=0$ бўлади. Кичик молекулалар тешик орқали гел ичига киради, бу ҳолда $K_d=1$ бўлади. Ўртача ўлчамдаги молекулалар гел говаклари ичига қисман кира олиши сабабли уларнинг K_d кўрсаткичи 0 билан 1 оралиғида ётади.

Гельфилтрацияда ажратиладиган моддани колонкада юборишдан то унинг колонкадан чиққунча кетган буфер ҳажми элюат ҳажми (V_e) деб аталади. Элюат ҳажми ташқи ҳажмга (V_0), тарқалиш коэффициенти (K_d) ва гелнинг ички қисмига (V_i) боғлиқ равишда ўзгаради. Элюат ҳажми (V_e) қуйидаги тенглама бўйича аниқланади:

$$V_e = V_0 - K_d \cdot V_i \quad (1)$$

Гелнинг ички ҳажми (V_i) унинг қуруқ массаси (a) ва сувни ютиш қобилиятига (W) боғлиқ:

$$V_i = a \cdot W \quad (2)$$

V_e – элюат ҳажми колонканинг катта – кичиклигига мос равишда ўзгаради, лекин K_d – маълум гел учун доимий катталиқ бўлиб, унинг кўрсаткичи колонка ўлчамига боғлиқ эмас.

Агар икки хил модда турлича молекуляр оғирликка ва K_d га эга бўлса, (K_{d1}) ва (K_{d2}), у ҳолда иккала модданинг элюат ҳажми қуйидагича кўринишда бўлади:

$$V_s = V_{e1} - V_{e2} = (V_0 - K_{d1} \cdot V_i) - (V_0 - K_{d2} \cdot V_i) \quad (3)$$

$$V_s = (K_{d1} - K_{d2}) \cdot V_i \quad (4)$$

Икки хил моддани тўлиқ ажратиш учун текширилаётган эритма миқдори V_s миқдоридан хиёл камроқ олинади. Колонкадаги гелнинг баландлиги 1 ва 2 тентлама асосида ҳисоблаб топилади.

ҚОН ЗАРДОБИНИ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ УСЛУБИ БЎЙИЧА ФРАКЦИЯЛАРГА АЖРАТИШ.

Керакли асбоб ва реактивлар: Хроматография колонкаси ($D=3 \times 80$ см), спектрал асбоб – «Увикорд», фракциялар коллектори, перистальтик насос, потенциометр, ажратувчи воронка, пипеткалар, пробиркалар, шиша таёқча, фильтр қоғоз, спектрофотометр, Г–200 сефадекси, 0,2 М NaCl, 0,1 М трис–HCl буфери ($pH=8,0$), қон зардоби, Лоури услубида оқсилни аниқлаш учун зарур реактивлар.

Ишнинг бориши: 1. Гелни бўктириш. Г–200 сефадекси 0,2 М NaCl ли 0,1 М трис–HCl буферида ($pH=8,0$) суспензия қилинади. Тиндириб суюқлик ва сув юзасидаги майда заррачалар тўкиб юборилади. Бу жараён уч мартаба такрорлангач, сефадекс 0,1 М трис–HCl буферида 1 суткага қолдирилади.

2. Колонкани тўлдириш. Колонка қатъий вертикал ҳолатда штативга ўрнатилади ва колонканинг пастки қисмига шиша фильтр унинг устидан колонка диаметрига мос равишда қирқилган фильтр қоғоз кўйилади.

3. Колонканинг 1/3 қисмига буфер эритма кўйиб пастки кран очилади ва хово сиқиб чиқарилади. Колонкада маълум миқдорда буфер эритма қолдириб кран ёпилади.

4. Ажралишнинг бориши колонканинг тўғри тўлдирилишига боғлиқ. Шу сабабли колонкани гел билан тўлдиришга алоҳида этибор бериш зарур.

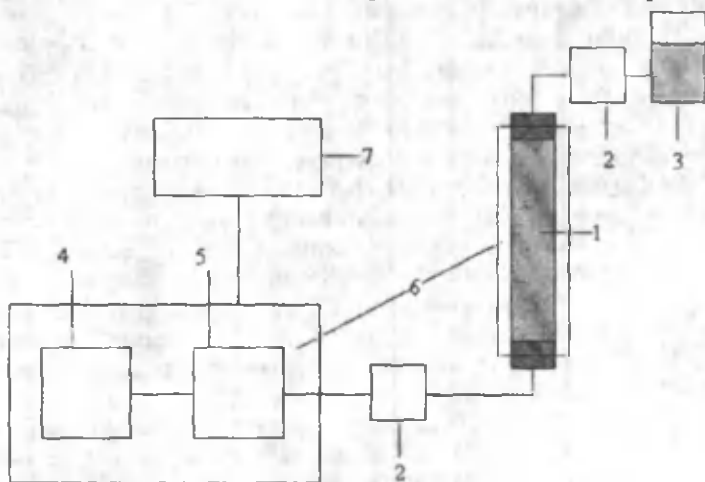
Гелнинг қуюқ суспензияси колонка девори бўйлаб ёки шиша таёқча ёрдамида қўйилади. Колонкада сефадекснинг керакли баландлигини ҳосил қилиш учун колонка оғзига мос келувчи шиша идишдан (8–расм) фойдаланиш ишни осонлаштиради. Бу идиш пастки томонидан колонкага резина пробка ёрдамида маҳкамланади ва гел суспензиясининг керакли миқдори шиша таёқча ёрдамида солинади. Колонка шу усулда тўлдирилганда гел заррачалари бир текисда ўтиради, иш жараёни тезлашади. Агар юқоридаги идиш бўлмаса оғзи кенг воронкадан фойдаланиш мумкин. Юқоридаги жараёнларни амалга ошириш давомида гелнинг сиртқи юзаси бир текис бўлиши лозим.



5. Колонкада гелнинг керакли баландлиги ҳосил бўлгач крани очиб гел устидаги ортиқча буфер эритма чиқариб юборилади. Гель бир сутка давомида буфер эритма билан ювилади. Бунда буфернинг тез оқиб кетишига йўл қўймаслик лозим, акс ҳолда суюқликнинг тез оқиши натижасида вужудга келган босим гелнинг зичланиб қолишига сабаб бўлади.

6. Қон зардобини юбориш. Колонкадаги буфер эритманинг чегараси гел юзасига яқинлашгач колонка диаметрига мос келувчи фильтр қоғоз қўйилади ва эҳтиёткорлик билан колонка девори бўйлаб пипетка ёрдамида 4–5 мл (1 сутка давомида буфер эритмага қарши диализ қилинган) қон зардобни қўйилади. Пробиркадаги зардоб қолдиқлари ҳам буфер билан чайиб пипетка ёрдамида колонкага қўйилади.

7. Пастки кран очилиб зардоб гел ичига критади.



Колонка деворлари 3–4 мл буфер билан ювиб гел ичига киритилади.

8. Колонка ичига 2–3 мл буфер эритма солиниб адаптор ёрдамида резервуар билан уланади, натижада ёпиқ система ҳосил бўлади (9–расм).

- 1 – гел билан тўлдирилган колонка
- 2 – пересталтик насос
- 3 – буфер эритма солинган резервуар
- 4 – фракциялар коллектори
- 5 – спектрал асбоб «Увикорд»

- 6 – совитувчи камера
- 7 – потенциометр

9. Қон зардобини элюирлаш учун ўртача 700 – 800 мл 0,2 М NaCl ли 0,1 М трис – HCl (pH – 8) буфер эритма керак бўлади. Элюция тезлиги 40 – 60 мл/соат.

10. Колонкадан чиқаётган элюатдаги оқсил миқдори автоматик равишда ишловчи «Увикорд» асбоби ёрдамида ўлчаниб, 3 – 5 мл дан фракциялар коллекторида йиғилади. Бунинг иложи бўлмаса оқсил миқдорини Лоури услуби бўйича ёки 280 нм тўлқин узунлигида фракциянинг оптик зичлигини ўлчаш ёрдамида аниқлаш мумкин.

11. Олинган натижаларга кўра график тузилади. Бунда Y ўқига оптик зичлик, X ўқига фракциялар сони қўйилади.

ОҚСИЛ ЭРИТМАЛАРИНИ ТУЗСИЗЛАНТИРИШ

Тузлаш ёғли билан чўктирилган оқсил эритмасини туз ионларидан озод этиш учун тузсизлантириш лозим. Бу жараён гельфилтрация услуби ёрдамида амалга оширилиши мумкин. Оқсиз эритмасини тузсизлантириш қуйидагича амалга оширилади:

1. Тузсизлантириш жараёнида G – 10, G – 25 сефадекслари ёки P – 6, P – 10 биселларидан фойдаланилади. Гель миқдори тузсизлантириладиган эритма ҳажмининг 1/4 қисминини ташкил қилиши лозим. Шунинг учун 100 мл оқсил эритмасини тузсизлантириш учун 25 г сефадекс олинади.
2. Керакли миқдордаги сефадекс 0,05 М трис – HCl буфер эритмасида (pH – 7,2) суспензия қилинади ва 3 марта декантацияга учратилади.
3. Колонкани тўлдириш, эритмани юбориш, элюирлаш худди қон зардобини фракцияларга ажратиш каби амалга оширилади (юқорига қаранг).
4. Колонкадан аввал юқори молекуляр бирикмалар – оқсиллар, кейин эса туз ионлари чиқади.

СЕФАДЕКС ЁРДАМИДА ОҚСИЛ ЭРИТМАЛАРИНИ ҚУЙИЛТИРИШ

Қуйилтириш лозим бўлган оқсил эритмасига қуруқ G – 25 сефадекси қўшиб яхшилаб аралаштирилади. 10 дақиқадан сўнг центрифугаланади ёки филтрланади. 1 грамм қуруқ сефадекс 2,5 г сув ютади. Яна қуруқ сефадекс қўшиб оқсил эритмасини

кўпроқ қуюлтириш мумкин. Бу усул билан қуйилтиришда оқсилга зиён етмайди, унинг рН ва ион кучи деярли ўзгармайди.

ИОН АЛМАШИНУВ ХРОМОТОГРАФИЯСИ

Хроматографиянинг бу тури қарама-қарши зарядланган оқсил ва ион алмашинувчи адсорбентнинг ўзаро боғланиш хусусиятига асосланган.

Ион алмашинувчи адсорбент турлари. Ион алмашинувчи адсорбентларнинг катион алмашинувчи ва анион алмашинувчи турлари мавжуд. Катион алмашинувчи адсорбент таркибидаги кислота группасининг протолити ҳисобига манфий зарядланади ва мусбат оқсилларни бириктиради: шунга кўра кислотали катионалмашинувчи адсорбент (катион) деб номланади. Анионалмашинувчи адсорбент эса ишқорий группасига протон бириктириш ҳисобига мусбат зарядланади ва манфий оқсилларни бириктиради, ҳамда ишқорий ионалмашинувчи адсорбент (анионит) деб юритилади.

Азбинокислота ва пептидларни тозалашда қўлланивчи смолаларни оқсиллар учун қўлаб бўлмайди. Чунки, биринчидан, оқсиллар смола билан мустаҳкам боғ ҳосил қилади; иккинчидан, смоланинг ўлчани оқсилга нисбатан кичик бўлганлиги сабабли оқсилнинг йирик молекуласи унинг ичига кира олмайди; учинчидан, смоланинг гидрофоб матрицаси оқсилнинг денатурациясига сабаб бўлади. Шунга кўра оқсилнинг ион алмашинувчи хроматографияси учун целлюлоза асосли ионалмашинувчи адсорбентлар қўлланилади. 4 – жадвалда энг кўп қўлланилувчи адсорбентлар ва уларнинг хусусиятлари келтирилган.

4 – жадвал.

Ион алмашинувчи адсорбент тури	номи	қисқарт илган номи	рН	элюция рН	ИЛ да иштирок этувчи функция онал гр	буфер
Анионит						

Услубнинг моҳияти. Махсус ишлов бериб, колонкага тўддирилган ион алмашинувчи адсорбент ва оқсил ўртасида куйидагича жараён боради:



IA^+ ; IA^- ион алмашинувчи адсорбент

A^- анион

K^+ — катион

O^- ; O^- оқсилнинг анион ёки катион кўриниши

Натижада тегишли оқсил ионалмашинувчи адсорбент билан боғланиб комплекс ҳосил қилади. Бирикмаган оқсиллар эса буфер эритма билан ювиш натижасида колонкадан чиқиб кетади. Адсорбент билан бириккан оқсилни буфер эритманинг рН ини ёки маънариғини ўзгартириш орқали ажратиб олиш мумкин. Элюция қилинаётган буфер эритма рН миқдорининг ошиши ёки камashi натижасида оқсил ўз зарядини ўзгартиради ва ион алмашинувчи адсорбентдан ажралиб эритмага ўтади. Буфер эритманинг ион кучини ошириш ҳисобига оқсилни адсорбентдан ажратиб олиш ион атомларининг оқсил молекуласи билан рақобат қилиб уни сиқиб чиқишига асосланган. Шу йўл билан тегишли оқсил бoshка оқсиллардан ажратиб олинади.

ҚОН ЗАРДОБИ ОҚСИЛИНИ ИОН АЛМАШИНУВ ХРОМОТОГРАФИЯ ЁРДАМИДА ФРАКЦИЯЛАРГА АЖРАТИШ

Керакли асбоб ва реактивлар. Хромотография колонкаси (1x60 см) анализатор, центрифуга, СФ – спектрофотометр, иберистальтик насос, «Увикорд», погенциометр, механик аралаштиргич, совиттич, фракциялар коллектори, 500 мл, 1000 мл ҳажмдаги стаканлар, ўлчов қолбалари, пробиркалар, сифон, ДЭАЭ – целлюлоза, 96% ли этанол, 0,01 М фосфат буфери, рН – 8,4, 0,3 М фосфат буфери, рН – 4,2, 0,05 М трис HCl рН – 8,0.

Ишнинг бориши. 1. ДЭАЭ – целлюлозага ишлов бериш. ДЭАЭЦ нинг керакли миқдори 5 марта ортиқ ҳажмдаги 0,5 Н ли NaOH билан хона ҳароратида 15 минут чайқатилади ва тиндирилади. Сувда сузиб юрган майда заррачалар тўкиб юборилади (декантация).

2. ДЭАЭ – целлюлоза бир неча марта муҳит рН 8–9 га келгунча дистилланган сув билан ювилади. Бу жараён центрифугалаш ёрдамида тезлаштирилиши мумкин.

3. Ювилган ДЭАЭ—целлюлоза 3 баробар ҳажмда 96 ли этанол қўйиб чайқатилади. Тиндирилгач суюқлиги бошқа идишга ўтказилади

4. 0,5 Н NaOH билан ишлов бериш яна такрорланади (1—2).

5. Целлюлоза муҳит рН нейтрал бўлгунча дистилланган сув билан ювилади. Шу усулда ишлов берилган ДЭАЭ— сувли суспензия ҳолида (40С да) сақлаш мумкин.

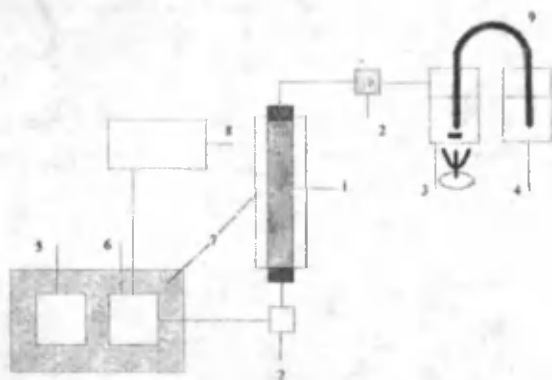
6. Агар HCl -ионлари тозаланаётган оксиганга зарар етказилса ДЭАЭ— целлюлозанинг Cl^- формаси афзал ҳисобланади. ДЭАЭ— целлюлозани OH^- формасидан Cl^- формага ўтказиш қуйидагича амалга оширилади: юқоридаги усулда ишлов берилган целлюлозга 3 ҳажм рН—8 бўлган 0,05 М триг— HCl қўлиб хона ҳароратида 15 дақиқа аралаштирилади. Декантациядан сўнг шу жараён яна 2 марта қайтарилади. Сўнгра ДЭАЭ— целлюлоза 0,01 М фосфат буфери билан рН—8,4 бўлгунча ювилади.

7. Колонкани тўлдириш. Дастлаб колонка штативга қатъий вертикал ҳолатда ўриштирилади. Колонканинг пастки қисмига озгина шиша пахта ва колонка диаметрига мос келувчи фильтр қоғоз қўйилади. Пастки крани бекитиб, колонка узунлигининг 1/4 қисмига бошланғич буфер эритма (0,01 М фосфат буфери рН—8,4) қўйилади. Пастки найши очиб буфер эритманинг маълум қисмини чиқариб юбориш ҳисобига ҳаво сиқиб чиқарилади.

8. Пастки найши ёпиб ДЭАЭ—целлюлозанинг чайқатилган қуюқ суспензиясига эҳтиёткорлик билан шиша тайёқчани колонканинг ички деворига тираган ҳолатда қўйилади, акс ҳолда ДЭАЭ—целлюлоза колонкада бир текис ўтирмайди. Натижада буфер эритманинг колонка бўйича бир текисда ҳаракатланиши ва оксиган молекулаларининг ажралиши кийинлашади. Колонкада ДЭАЭ— целлюлозанинг керакли баландлигини ҳосил қилишда махсус шиша идишдан (8—расм) фойдаланиш мумкин. ДЭАЭ— целлюлоза тингач ажралиб қолган буфер қатлами гел устида 0,5 буфер эритма қолгунча жуда кичик тезликда чиқариб юборилади.

9. Колонкада ион алмашинуви адсорбентнинг керакли баландлиги ҳосил бўлгач, у бошланғич буфер эритма билан рН тенглашгунча ювилади.

10. Қон зардоби колонкага солинишидан олдин бир сутка



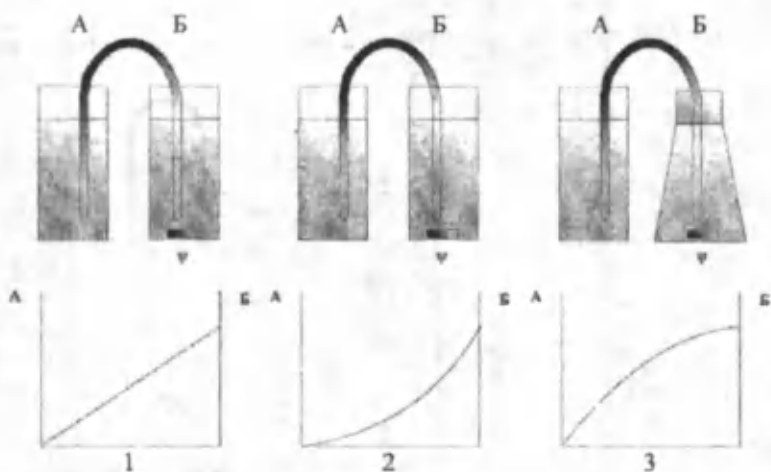
давомидла бошланғич буфер эритмага қарши диализ қилинади.

Адсорбент устидаги буфер эритма баландлиги 2–3 мм га етунча қоғозга шимдириш йўли билан ёки пипетка ёрдамида оҳишта олиб ташланади. Шундан сўнг 2 мл қон зардоби пипетка ёрдамида колонка девори бўйлаб айланма ҳаркат қилган ҳолда оҳишта қуйилади. Пастки най очилиб зардобнинг адсорбент ичига кириши таъминланади. Колонка девори ҳам 2 мл бошланғич буфер эритма билан ювилади ва адсорбентта шимдирилади.

11. Колонка 10 – расмдаги схема бўйича системага уланади:

- 1 – адсорбент (ДЭАЭ – целлюлоза) тўлдирилган колонка
- 2 – перестальтик насос
- 3 – бошланғич буфер эритма солинган резервуар.
- 4 – юқори концентрацияли буфер эритма солинган резервуар.
- 5 – фракциялар коллектори
- 6 – спектрал асбоб, «Увикард»
- 7 – совитувчи камера
- 8 – сифон.

Дастлаб колонканинг 3–4 ҳажмига тенг бўлган бошланғич буфер эритма билан элюция қилинади. Элюция тезлиги 40–50 мл/с қилиб ўрнатилади. (Элюция тезлиги колонка диаметри ва узунлигига боғлиқ). Кейин шу тезликни ўзгартирмаган ҳолатда градиентли элюирланади. 11 – расмда градиент ҳосил қилишнинг уч хил йўли кўрсатилган.



11 – расм. Ион алмашинувчи хроматография градиент ҳосил қилиш турлари.

А – резеруар; Б – аралаштиргич.

Концентрация градиентлари: 1 – чизиқли; 2 – ботиқ; 3 – қавариқ.

12. Аралаштиргич сифатида 500 мл ҳажми, резервуар сифатида эса 1000 мл ҳажли идиш қўлланилади. Аралаштиргич бошланғич буфер зритма билан (0,01 М фосфат буфери, рН – 8,4), резервуар 0,3 М фосфат буфери рН – 4,2 билан тўлдирилади. Иккала идиш тифлон ёки поливинилхлориддан қилинган сифон орқали уланади.

Буфер зритманинг колонкадан ўтишини насос (2) бошқариб туради. Колонкадан ўтган оқсил фракциялари коллекторда (5) тўпланади. Оқсил миқдори «Увикорд» (6) ёрдамида автоматик ўлчаниб потенциометрга (8) узатилади. «Увикорд» колонкадан элюирланаётган оқсил миқдорини кузатувчи графикни тайёр ҳолда чизиб беради. Агар «Увикорд» бўлмаса, пробиркадаги оқсил фракциялари спектрофотометрик йўл билан 280 нм тўлқин узунлигида ёки бошқа усуллар ёрдамида текширилади. Олинган натижаларга кўра график тузилади, бунда ордinata чизигига СФ кўрсаткичи ёки оқсилнинг 1 мл зритмага тўғри келувчи мкг миқдори, абсцисса чизигига эса фракция тартиби белгиланади.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Оқсилларни ажратиш ва уларнинг бир жинслилигини аниқлашда муҳим ўрин тутадиган услублардан бири электрофорездир. Электр зарядига эга бўлган моддаларнинг электр майдонида анод ёки катод томонига силжиши электрофорез дейилади.

Аввалги бўлимда ёритилганидек мусбат зарядланган оқсил катодга, манфий зарядлангани эса анодга томон силжийди. Оқсилларнинг электр майдонида ҳаракатланишига уларнинг молекуляр оғирлиги ҳам таъсир кўрсатади. Кичик молекуляр оғирликдаги молекула иддамроқ, каттаси вазминроқ ҳаракатланади. Натижада бир хил зарядланиш даражасига эга бўлган оқсиллар молекуляр оғирлигига кўра ажратилади.

Электрофорезнинг 2 хил тури мавжуд:

1. Эркин электрофорез;
2. Зонали ёки ташувчи муҳитдаги электрофорез;

Эркин электрофорез Тизелиус томонидан ишлаб чиқарилган бўлиб, буфер билан тўлдирилган V—симон электорфоретик асбобда олиб борилади. Бу идишнинг бир учига «+», иккинчи учига «-» зарядланган электрод туширилади. Электр токи юборилганда эритмадаги оқсил молекулалари зарядларига кўра силжийди.

Ҳозирги кунда эркин электрофорез деярли қўлланилмайди, чунки унга нисбатан бир қаторт ижобий хусусиятга эга бўлган, такомиллашган усуллар кашф этилди. Шулардан бири зонали электрофорез бўлиб, бунда электрофорезқаттиқ муҳитда олиб борилади. Қаттиқ муҳит сифатида ПАГ, крахмал, агар ва филътр қоғозидан фойдаланиш мумкин.

Зонали электрофорез эркин электрофорездан қуйидаги жиҳатлари билан фарқланади:

1. Зонали электрофорезни бажариш осон.
2. Кам миқдорда оқсил талаб этилади, масалан: қоғоздаги электрофорез учун 0,5—0,8 мг, ПАГ электрофорез учун 100—200 мкг оқсил керак бўлади.
3. Электрофорез жараёнида ҳосил бўлган оқсил фракцияларини ташувчи муҳитда бўяб (ажратилган оқсилни) аниқ кўриш мумкин.
4. Ташувчи муҳит ёки буфер эритмани ўзгартириш йўли билан оқсил аралашмасини фракцияларга ажратиш мумкин. М: қон зардобининг қоғоздаги электрофорезида борат буферини (рН—8,9) қўлаб 5 фракция (альбумин, $\alpha-1$, $\alpha-2$, β , α -глобулин)

олинса, трис — ЭДТА буферини (рН — 8,9) қўллаш орқали 9 та фракция олиш мумкин.

5. Зонали электрофорезда оқсилларни фракцияларга ажралиши тез боради (баъзи услуб бўйиш билан биргаликда 1—2 соатда бўлади).

6. Зонали электрофорез асбоби содда тузилган ва эркин электрофорез асбобига нисбатан арзонга тушади.

7. Ташувчи муҳитнинг ўзида ажратилган оқсил фракцияларига субстрат таъсир эттириб ферментлар активлигини аниқлаш мумкин.

Шу билан бирга электрофорезнинг бир қатор камчиликлари ҳам мавжуд.

1. Оқсилларнинг силжиш тезлигини тўғридан — тўғри аниқлаб бўлмайди.

2. Аниқланаётган оқсил ва ташувчи муҳит ўртасида салбий боғланиш вужудга келиши мумкин. Бунда оқсил ташувчига адсорбцияланиб қолиши кузатилади. Қоғоздаги электрофорезда адсорбцияланиш кучлироқ бўлиб ПАГ да бу ҳодиса деярли кузатилмайди.

Зонали электрофорезнинг турлари. Қоғоздаги электрофорез. Қоғоздаги электрофорез кенг тарқалган усул бўлиб у махсус фильтр қоғозда олиб борилади. Бу қоғоз юқори гигроскопик бўлиши, сувни шимиши натижасида унинг оғирлиги қуруқлигидаги оғирлигига нисбатан 180—200 маротаба ошиши шарт.

Электрофорез ўтказиладиган асбобнинг турига кўра электрофорез 4 соатдан 16 соатгача давом этади. Электрофорез қоғоз бўлади ва оқсилнинг ажралган фракциялари аниқ кўрилади. Бўялган фильтр қоғозни сақлаб қўйиш мумкин. Агар ажратилган оқсил миқдорини аниқлаш лозим бўлса керакли фракция қирқиб олиниб оқсил эритмага ўтказилади ва фотометрик йўл билан ўлчанади.

Крахмал гелидаги электрофорез. Айрим услубий қийинчиликлар бу электрофорезнинг кенг тарқалишига монелик қилди. Бунга сабаб крахмал, гелини тайёрлаш, уни гидролиз қилиш анча мураккаб жараён эканлигидадир. Лекин шунга қарамай крахмал гели оқсилни ажратишда кенг қўлланилади, чунки бу услубга кўра оқсиллар фақат зиярланиш даражасига кўрагина эмас, балки молекуляр оғирлигига кўра ҳам ажратилади. Бу эса фракциялар сонини кўпайтиради. М: қон зардоби оқсилдан ушбу услуб бўйича 8—10 та фракция олиш мумкин. Крахмал гелидаги электрофорез оқсил гомогенлигини билишда аниқ услуб ҳисобланади.

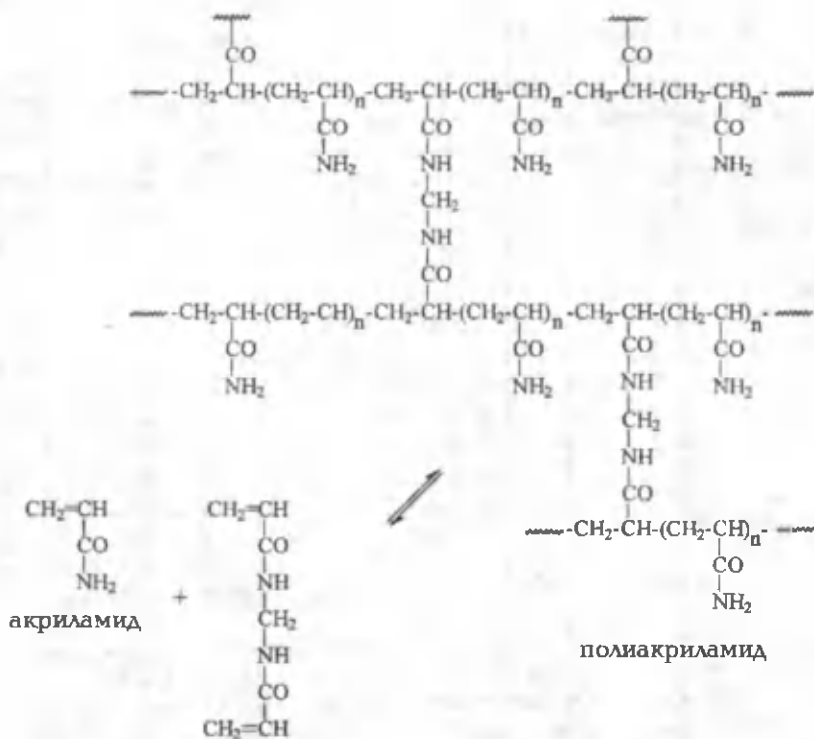
Агар гелидаги электрофорез. Зонали электрофорезни олиб боришда агар гели ташувчи муҳит ҳисобланади. 1–1,5% ли агар гелида оқсил эркин электрофорездаги каби ҳаркатланади. Агар гелидаги электрофорезда қоғоздаги электрофорезга нисбатан оқсиллар тез фракцияларга учрайди. Агар қатламининг тиниқлиги оқсил фракцияларини яхши бўйшни ва фотометрик услуб аниқлашни осонлаштиради. Шу билан бирга бундай шароитда оқсил фракциялари «дум» ҳосил қилмайди. Ажралади. Лекин агар гелини тайёрлашнинг мураккаблиги унинг кенг қўлланишини чегаралайди. Агар таркибида агаропектиннинг бўлиши гелнинг сифатига салбий таъсир қилувчи факторлардан ҳисобланади, чунки нордон агаропектин липопротеидлари ва кучли ишқор оқсиллар билан комплекс ҳосил қилиш хусусиятига эга. Агар манфий зарядланганлиги сабабли буфер кагионлари ва сув молекуласи анодга силжийди. Электрофорезда бу оқим оқсил фракцияларини ҳам ўзи билан бирга силжишига сабаб бўлиши мумкин. Бу ҳодисани текшириладиган оқсил аралашмасини гелли пластинканинг ўртасига томизиш йўли билан бартараф этиш мумкин. Бундай ҳолат агарозада, ацетат–целлюлоза мембранасидаги, фильтр қоғоздаги электрофорезларда кузатилмайди.

Ацетат–целлюлоза мембранасидаги электрофорез.

Ацетат–целлюлоза мембранаси жуда яхши ташувчи муҳит бўлиб, бир қатор ижобий хусусиятларга эга. Крахмал ва гар гелларини тайёрлаш мураккаб ва кўп вақт талаб этиладиган жараён бўлиб, ацетат–целлюлоза мембранасига ишлов бериш фильтр қоғозники сингари осон. Ундан фарқли ўлароқ бу электрофорезда оқсил тез ва яхши ажралади. Бу электрофорездафақат оддий оқсилларгина эмас, балки гликопротеинлар ҳам яхши бўялади, шунга кўра уларни миқдорий жиҳатдан ҳам аниқлаш мумкин. Ацетат–целлюлоза мембранасидаги электрофорез ёрдамида қоғоздаги электрофорезга нисбатан кўпроқ, крахмал гелидагига нисбатан эса камроқ фракция олинади. Ушбу электрофорез ёрдамида жуда оз миқдордаги (0,1–10 мкл дистилланган сувда эритилган 5–1000 мкг) оқсиллар аралашмасини фракцияларга ажратиш мумкин, шунга кўра ацетат–целлюлоза мембранасидаги электрофорез ажратиб олинган оқсилнинг гомогенлигини аниқлашда қўл келади.

Полиакриламид гелидаги электрофорез. ПАГ

электрофорез кенг қўлланиладиган усул ҳисобланади. Ташувчи муҳит сифатида акриламид ва метиленбисакриламид сополимерлари қўлланилади. Мономерларнинг узун



N,N' – мет иленбисакриламид

полиакриламид занжири маълум жойларида метилен кўплиги ёрдамида ўзаро бирикиши ҳисобига элексимон тешиклар ҳосил қилади. Бир – бирдан бир хил узоқликда жойлашган амид группалари бу структуранинг юқори гидрофиллигини таъминлайди.

Акриламиднинг полимерланиш ТЕМЕД (тетраметилэтилендиамин) индикатори, персульфат катализатори ёрдамида ёки рибофлавин иштирокидаги фотокатализ ҳисобига боради. Ўзининг элаксимон структураси туфайли ПАГ молекуляр элак вазифасини ўтайди. Гелнинг қовушқоқлиги, чидамлилиги, застиклиги ва тешикларнинг ўлчами полиакриламиднинг полимерланиш даражасига, яъни N, N – бисакриламид сонига боғлиқ. Гелнинг ғовақлик даражасини полимерланиш вақтида эритмадаги акриламиднинг концентрацияси белгилайди. Акриламид ва бириктирувчи мономер – N, N – метиленбисакриламиднинг нисбати 40:1 (оғирлигига кўра) ни

ташкил этади. Демак акриламиднинг тўғри келадиган концентрациясини танилаб керакли ўлчовдаги ғовакли гелни ҳосил қилиш мумкин.

Юқори молекулали оқсилларни (100000 ва ундан ортиқ) ажратишда 7% ли акриламиддан фойдаланилади (ғовак диаметри 50А).

Кичик молекулали оқсилларни ажратиш учун кичик ғовакли гель ишлатилади. (15% ва 20% ли акриламид, ғовак диаметри 30А).

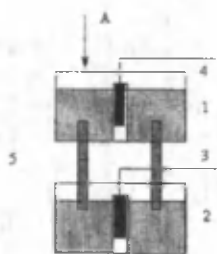
Синтетик ПАГ табиъларига (М: крахмал, агар гелига) нисбатан бир қатор афзалликларга эга: кимёвий жиҳатдан инертлиги, механик жиҳатдан турғунлиги, рН ўзгаришларига чидамлиги, ультрабинафша нурида тиниқлиги, кўпчилик эритувчиларда эримаслиги; адсорбция ва электроосмос содир бўлмаслиги билан аҳамиятлидир. Услуб юқори сезгирликка эга (аниқлаш учун 50—100 мкг оқсил кифоя) бўлганлиги сабабли кам реактив талаб этади.

Бу усул бўйича оқсилларни фракцияларга ажратиш бошқаларига кўра анча самарадорлигини, техник жиҳатдан оддийлигини, электрофорез тез содир бўлиши ҳисобига вақтнинг тежалишини ва аниқ натижалар олиш имкониятини беришини ҳисобга олган ҳолда диск—электрофорезнинг моҳияти ва ишни олиб бориш таркиби ҳақида батафсил тўхталиб ўтамиз.

ДИСК—ЭЛЕКТРОФЕРЕЗ

Бу услубда оқсилларнинг электр майдонида ҳаркатланиши ва фракцияларга ажраши ПАГ билан тўлғазилган цилиндрсимон шиша найчаларда амалга оширилади. Колонкада оқсил фракциялари диск кўринишида ажралади, шунга кўра диск—электрофорез деб номланган.

Асбобнинг тузилиши. Диск—электрофорез ўтказиладиган асбобнинг асосий қисми юқори (1) ва пастки идишдан (2), гель тўлдириладиган шиша найчалардан (3) иборат (10—расим). Юқори ва пастки идишга платина симли ёки қўмир пластикали электрод (4) ўрнатилган. Иккала идиш ўртасида гель тўлдирилган шиша найчалар вертикал ҳолатда жойлашади. Юқориги идишнинг тубида бир хил узоқликда жойлашган тешиклар бўлиб, маҳкамловчи ҳалқа (5) ёрдамида гелли найча бириктирилади. Шиша найчанинг ички диаметри 5 мм, ташқи диаметри 7 мм, найча узунлиги 65—70 мм. Найчанинг ички юзаси бир текис бўлиши лозим, акс ҳолда оқсиллар аниқ фракцияларга ажралмайди ва гелни шишадан ажратиб олиш қийинлашади.



- 1 – асбобнинг буфер тўлдирилган юқори қисми
- 2 – асбобнинг буфер тўлдирилган пастки қисми
- 3 – гелли шиша найча
- 4 – электродлар
- 5 – маҳкамловчи ҳалқа
- 6 – шиша найча ўрнатиладиган тешик

12 – расм. Диск – электрофорез ўтказиш учун мўлжалланган асбоб.

Акриламид гелнинг яхши полимерланишига шиша найчанинг тозалиги ҳам таъсир қилади, шунинг учун ишлатишдан аввал шиша найчаларни хром аралашмасида бир соат бўктириб қўйиб, сувда чайилади ва термостатда қуритилади. Ёдан тозалаш учун ацетонга ботириб олиб, яна қуритилади.

Электрофорез ўтказиш учун керакли асбоб ва реактивлар: электрофорез асбоби, микропипетка, шприц, шиша найча учун штатив, фотополимерлаш учун лампа, электртоки манбаи, бириктирувчи симлар, трис, акриламид, ТЕМЕД, HCl, БИС, рибофлавиш, сахароза, аммоний персульфат, глицин ёки (аланин), бромфенол қуми (метилен яшили), тоза сирка қахрабоси, (KOH) керак бўлади.

Эритма тайёрлаш. Гель тайёрлаш учун асосий эритмалар. Нордон оқсиллар учун.

А ишқорий эритма: (pH=8,9)	48,0 мл	I N HCl
	36,6 г	трис
	0,23 мл	ТЕМЕД
	100 мл гача дистилланган сув билан келтирилади.	
	48,0 мл	I N HCl
	5,98 г	трис
	0,46 мл	ТЕМЕД
	100 мл гача дистилланган сув солинади.	
	28,0 г	акриламид
	0,75 г	БИС
	100 мл гача дистилланган сув солинади.	

10 г акриламид
 2,6 г БИС
 100 мл гача дистилланган сув солинади.
 400 мг рибофлавин
 100 мл гача дистилланган сув солинади.
 40 г сахароза
 100 мл гача дистилланган сув солинади.
 0,14 г аммоний персульфат
 100 мл гача дистилланган сув солинади.
 6,0 г трис
 28,8г глицин
 1000,0 мл гача дистилланган сув солинади.

Ишлатишдан аввал 10 марта суюлтирилиши лозим!

Индикатор – бўйовчи эритма; 0,001 г бромфенол кўки
 100 мл гача дистилланган сув солинади.

Фиксирловчи – бўёвчи эритма; 1 г маид қораси 10 В

100 мл гача 7% сирка қаҳробоси солинади.

Ажратувчи – қуюлтирувчи эритма; 1000 мл 7% сирка қаҳробоси

Ишқорий оқсиллар учун

А нордон эритма;

(pH=4,3)

5,8 мл I H КОН
 17,2 мл тоза сирка қаҳробоси
 4,0 мл ТЕМЕД
 100 мл гача дистилланган сув солинади.

В нордон эритма;

(pH=7,8)

48,0 мл I H КОН
 2,87 мл тоза сирка қаҳробоси
 0,48 мл ТЕМЕД
 100 мл гача дистилланган сув солинади.

С нордон эритма;

60 г акриламид
 0,4 г БИС

	100 мл гача дистилланган сув	
	солинади.	
Е нордон эритма;	4 мг рибофлавин	
	100 мл гача дистилланган сув	
	солинади.	
Г нордон эритма;	40 г сахароза	
	100 мл гача дистилланган сув	
	солинади.	
К нордон эритма;	0,28 г аммоний нерсульфат	
	100 мл гача дистилланган сув	
	солинади.	
Электрод буфери эритмаси	31,2 г	β – аланин
pH=4,5;	8,0 мл	тоза сирка

1000,0 мл гача дистилланган сув солинади.

Ишлатишдан аввал 10 марта суюлтирилиши лозим.

Индикатор – бўёвчилари: 0,1 г метилен яшили
100 мл гача дистилланган сув
солинади.

Ажратувчи – қуюлтирувчи эритма ва фиксирловчи – бўёвчи эритмалар ишқорий оқсиллар учун берилганидек қилиб тайёрланади.

«К» эритмадан ташқари барча эритмаларни музлаткичда сақлаш мумкин. «К» эритма бевосита ишлатишдан олдин тайёрланади.

Ишнинг бориши: 1. Музлаткичда сақланган эритмалар хона ҳароратига келтирилади.

2. Шиша найчалар гелни полимерлаш учун мўлжалланган штативга урнатилади.

3. Пастки гел маномерини тайёрлаш учун асосий эритма қуйидаги нисбатда олинади:

1 ҳажм	А эритма
2 ҳажм	С эритма
1 ҳажм	дис. Сув
4 ҳажм	К эритма

Вакуум насос ёрдамида эритма ҳавоси тортиб олинади, акс ҳолда эритма таркибидаги ҳаво гелни муртлаштиради ва полимерланиш жараёни бир текис бормайди. Эритмалар юқоридаги нисбатда олинганда ишқорий муҳит учун 7% (pH=8,9), нордон муҳит учун 15%ли (pH=4,3) гел ҳосил бўлади.

4 Шиша найчаларга 1,2–1,5 мл ажратувчи гел мономер эритмасидан қуйилади. Гелнинг сирти текис қотиши учун мономер эритма устига 0,1–0,2 мл дистилланган сув эҳтиётлик билан шиша наёча девори орқали қуйилади, бунда мономер ва дистилланган сув ажралиб кетмаслиги керак. 5. Полимерланиш 30 минут давом этади. Бу жараён туганганини сув билан мономер гел ўртасида ҳосил бўлган аниқ чегарадан билиш мумкин.

6. Асосий эритмалардан қуюлтирувчи гел мономерини тайёрланади. Бунинг учун:

нордон оқсиллар учун ишқорий оқсиллар учун

1 ҳажм	В эритма	В эритма
2 ҳажм	Д эритма	Г эритма

1 ҳажм	Е эритма	С эритма
4 ҳажм	Г эритма	Е эритма

Қоттан пастки гелнинг сирти қуюлтирувчи гел эритмаси билан чайиб олинади.

7. Ажратувчи гел устига 0,1–0,15 мл қуюлтирувчи гел эритмаси қуйилади.

8. Шиша найчалар жойланаган штатив 260–500 Втти ультрабинафша лампаси остига қўйилади. Рибофлавин иштрокида борадиган фотополимерланиш жараёни 15–20 минут давом этади. Полимерланиш жараёни туганганини сарғиш–яшил эритманинг хиралашшишидан, гел билан сув ўртасида ҳосил бўлган аниқ чегарадан билиш мумкин.

9. Полимерланиш жараёни тугагач гел устидаги дистилланган сув филтёр қоғоз ёрдамида олиб ташланади.

10. Оқсил эритмасини тайёрлаш. Оқсил эритмаси буферга диффузияланиб кетмаслигини таъминлаш учун, ажратилмоқчи бўлган оқсилни 8 марта суюлтирилган А эритмасида эритилади. Осон диффузияланадиган, молекуляр оғирлиги кичик бўлган оқсилларни сахароза эритмасида эритилади.

11. Шиша найча асбобга ўрнатилиб гел устига 0,10–0,25 мл оқсил эритмаси қуйилади. Найчанинг бўш қолган электрод буфери ёрдамида, оқсил эритма билан аралашиб кетмаслигини таъминлаган ҳолда тўлдирилади.

12. Пастки идишга -4° С гача совутилган буфер эритма солиб, юқори ва пастки идишлар бирлаштирилади. Юқоридаги идишга ҳам эҳтиётлик билан совуқ буфер ва 1–2 мл индикатор бўёғи қўйилади. Асбоб музлаткичга ўрнатилади ва поляригига кўра ток манбаига уланади. Дастлабки ярим соатда ҳар бир шиша найчага 2 мАдан ток кучи берилиши керак. Бу вақтда

электрохимёвий концентрланиш жараёни боради, агар бирданига катта ток кучи юборилса иссиқлик таъсирида броун ҳаракати кучайиб оқсил буфер эритмага чиқиб кетиши мумкин. Оқсил молекулалари конценрловчи гелдан ўтиб ажратувчи гел чегараси етиб келган ток кучи ҳар бир найча учун 5 мАгача оширилади.

13. Электорофорез тугаганлигини индикатор бўёғи шишиа найчанинг пастки чегарасига етиб келганидан билиш мумкин.

14. Электорофорез тугагач шиша найчалар асбободан чиқариб олинади.

15. Найчадан гелни ажратиб олиш учун сув тўлғазилган шприцдан фойдаланилади. Бунинг учун найча ва гел орасига шприц нивасияи спиралсимон йўналишда айлантириб сув юборилади. Шунда гел аста ташқарига чиқади.

16. Гел фиксирловчи бўёқда I соат ушланади.

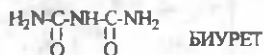
17. Бўяган гел бир неча марта дистилланган сув билан чайқалади ва ажратувчи эритмага солинади. Бу жараён ажратувчи эритмага бўёқ чиқмайдиган бўлгунча давом эттирилади. Ювиш жараёни тугаганлигини гелнинг оқсилли фракциялари бўялиб, оқсил бўлмаган қисмининг рангсизланнишидан билиш мумкин.

18. Гелни узоқ муддат сақлаш лозим бўлса гел шиша пластинка устида хона ҳароратида қуриштилади. Қуруқ гелни бир неча йиллаб сақласа бўлади. Қуруқ гел ажратувчи эритмада 24 соат ушланса у яна ўз ҳолига келади.

ОҚСИЛАРНИ МИҚДОРИЙ ЖИҲАТДАН АНИҚЛАШ УСЛУБАРИ.

Оқсилни Биурет реакцияси бўйича аниқлаш.

Услубнинг мохияти: Ишқорий муҳитда мис ионлари оқсил молекуласининг пептид боғлари билан реакцияга киришиб, кўк – бинафша ранг берувчи комплекс ҳосил қилади. Бу реакциянинг боришида камида иккита пептид боғи иштирок этади, шунга кўра оддий бирикма биурет номи билан юритилади.



Ишнинг бориши: Эритма тайёрлаш.

1. Оқсил (альбумин, пенсин, казеён)нинг 1% NaCl дағи стандарт эритмаси 10 мг/мл.

2. Биурет эритмаси; 0,15 г Си SO₄ · 5H₂ O ва 0,6 г NaKC₄ H₄O₆ · 4H₂O (сегнет тузи) 50 мл 10 ли NaOH қўшиб д.с. билан 100 млга келтирилади. Эритма полиэтилен идишда сақланади.

3. 1% NaCl.

Каибирлаш эгри чизигини тузиш. Бунинг учун 10 та пробиркага стандарт эритмадан 1—1— мг миқдорида қилиб солинади. Ҳамма пробиркадаги эритма 1% NaCl билан 1млга келтириб унга 8 млдан биурет эритмаси қўшилади. Контроль сифатида оқсил эритмаси ўрнига 1мл 1%NaCl олинади, аралашмалар чайқатиб хона ҳароратида ўлчанади. Олинган натижалар асосида график тузилади. Бунда ордината ўқига СФ кўрсаткичи, абсцисса ўқига эса оқсилнинг мг/мл миқдори кўйилади.

Оқсил миқдорини аниқлаш. Текширилаётган эритмада оқсилнинг миқдорини аниқлаш учун 1 мл оқсил эритмасига 8 мл биурет реактиви қўшилади ва 30 минут хона шароратида сақлангач оптик зичлиги аниқланади. Оқсил миқдори калибрлаш эгри чизигига кўра топилади.

Услубнинг камчилиги унчалик сезгир ва аниқ эмаслиги бўлиб, шунга қарамай эритмада оқсил миқдори кўп бўлганда фойдаланиш мумкин.

ЛОУРИ УСЛУБИ.

Услубнинг моҳияти. Бу услуб оқсил таркибидаги тирозин ва цистеин аминокислоталарининг фолин эритмаси таркибидаги фосфомолибдвольфрам кислотасини қайтариш хусусиятига асосланган. Бу реакция натижасида қайтарилган молибден ва вольфрам кўки ҳисобига эритма кўк ранга киради. Ишнинг бориши. Эритма тайёрлаш.

1. Оқсилнинг стандарт эритмаси 100 мкг/мл.
2. А эритма; 0,1 г NaOH даги 2% ли Na_2CO_3 эритмаси.
3. В эритма; 1% $\text{ENaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ даги 0,5% ли $\text{SiSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ эритмаси.
4. С эритма; 49 мл Фва 1 мл В эритмаларнинг аралашмаси.
5. Фолин эритмаси; 1,5 л ҳажмли юмалоқ колбага 100г натрий вольфрамат ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25 г натрий молебдат ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 750 мл д.с., 50 мл 85% ли H_3PO_4 ва 100 мл конц. HCl солиб 10 соат давомида қайтар совуттич улаб қайнатилади. Аралашма совугач 150 г ZiSO_4 .50 мл д.с. ва 5 томчи Вг қўшиб совуттичсиз, ҳаво тортувчи шкафта 15 минут қайнатилади. Тайёр бўлган эритма лимон сариғи рангида бўлади. Совутган эритма филтрланиб ҳажми 1 лга келтирилади ва қорамтир идишда, музлаткичда сақланади. Фолин эритмасини ишлатишдан аввал кислоталилиги 1 Н га келгунча д.с. билан суюлтирилади (тахминан 2 марта).

Калибрлаш эгри чизигини тузиш. 10 та қуруқ, тоза пробиркага стандарт эритмадан оқсил 10–100j гача бўлган миқдорда солинади ва д.с. ёрдамида 1 млга келтирилади. Устига 4 мл С эритмаси солиб 10 минут хона ҳароратида сақланади, сўнгра 0,4 мл Фолин (1Н) эритмасидан қўшиб, яхшилаб чайқатилади, 30–90 минутдан сўнг 750 нм тўлақин узунлигида оптик зичлиги ўлчанади. Контроль пробиркада оқсил эритмаси ўрнига 1 мл д.с. олинади. Натижалар график кўринишда ифодаланилади. Бунинг учун ордината ўқига СФ кўрсаткичи, абсцисса ўқига оқсилнинг мкг мл миқдори қўйилади.

Оқсил миқдорини аниқлаш. Текширилаётган объектдан 0,1–0,2 мл олиб д.с. билан 1 мл га келтирилади. Қолган кетма – кетлик юқорида кўрсатилганидек амалга оширилади. Аниқланаётган оқсил миқдори калибрлаш эгри чизигига кўра топилади.

Лоури услубининг сезгирлиги юқори бўлганлиги туфайли кенг қўлланилади. Бу услуб ёрдамида оқсил миқдори аниқланганда бир қатор бирикмалар (аммоний сульфат, мочевино, этанол, ацетон ва ҳ.)нинг ҳалақит бериши камчилиги ҳисобланади.

УГЛЕВОДЛАР

Углеводлар энг муҳим органик бирикмалардан бўлиб, улар ҳамма тирик организмлар таркибига киради, лекин ўсимлик организмиде кўпроқ бўлади. Углеводларнинг алмашинуви организм учун жуда муҳим ҳисобланади. Авваламбор тирик табиатдаги органик моддалар ўсимликларда кетадиган фотосинтез натижасида ҳосил бўладиган углеводлардан ҳосил бўлади. Шу билан бирга ҳужайра учун керакли энергиянинг асосий қисми углеводлар парчаланишида ҳосил бўлади. Бундан ташқари айниқса ўсимликларда ва микроорганизмларда углеводлар энергияси депоси ва структура бирлиги бўлиб ҳам ҳизмат қилади.

Кейинги йилларда биохимиклар углеводларни ўрганишга катта эътибор бера бошладилар, бунинг сабаби шундаки, углеводлардан гликопротеинлар ва гликолипидлар ҳужайрада кетадиган муҳим жараёнларда, жумладан морфогенез ва дифференцияланишда муҳим аҳамиятта эга.

Углеводлар тирик организмларда бир қатор муҳим вазифаларни бажаради. Масалан: пентозалардан рибоза ва дезоксирибоза нуклеин кислоталарнинг таркибий қисми ҳисобланади. Углеводлар кўпгина антибиотикларнинг таркибига киради. (масалан, стрептомицин, неомицин, линкомицин ва

бошқаларнинг]. Углеводлар иммунитетнинг ҳосил бўлишида ҳам муҳим рол ўйнайди. Кўпгина антителоларни ҳосил бўлишига микроб антигенлари ҳам углеводлар (полисахаридлар) жумласига киради. Антитело сифатидагиларга асосан гликопротеидлар – оқсилларнинг углеводлар билан ҳосил қилган бирикмаси киради.

" Углевод "лар номи уларнинг эмпирик формуласи $(C_n H_{2n} O_n)$ бўлиши билан белгиланади.

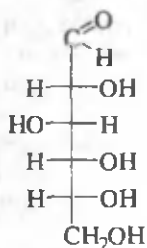
Углеводлар 3 та синфга бўлинади.

1. Моносахаридлар
2. Дисахаридлар
3. Полисахаридлар

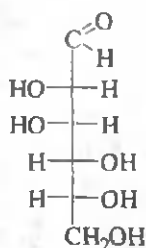
Моносахаридлар молекуласидаги углевод атомлари сонига қараб триозалар (3C), тетрозалар (4C), пентозалар (5C), гексозалар (6C), гептозалар (7C) га бўлинади.

Тирик ҳужайралар таркибида асосан пентозалар ва гептозалар учрайди. Энг кўп тарқалган гексозалардан глюкоза – энг муҳим моносахарид ҳисобланади, чунки у асосан ҳамма полисахаридларнинг мономериди ҳисобланади. Бундан ташқари табиий моддалар таркибида глюкозага яқин бўлган углеводлар – манноза, фруктоза, галактоза ва рамноза учрайди. Кучсиз ишқорий муҳитида глюкоза, манноза ва фруктоза осон бири кикинчисига ўтиши мумкин.

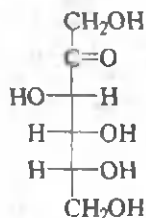
Энг кўп тарқалган пентозалардан рибоза ва дезоксирибозалар боғланган ҳолда нуклеин кислоталар таркибида учрайди. Булардан ташқари ксилоза ва арабиноза ҳам пентозалар қаторига киради. Фотосинтез жараёнида кетопентоза – рибULOZA муҳим аҳамиятга эга.



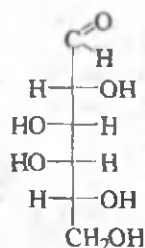
Глюкоза



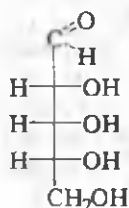
Манноза



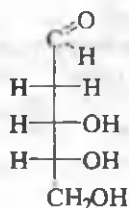
фруктоза



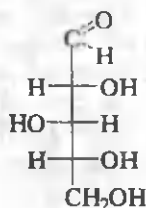
Галактоза



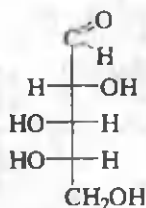
Рибоза



Дезоксирибоза



ксилоза



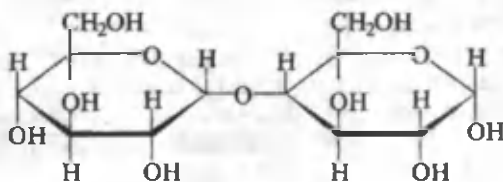
Арабиноза

Моносахаридларнинг энг муҳим хоссаларидан бири, уларнинг осон оксидланиши. Улар металл тузларини қайтариш ҳусусиятига эга бўлиб, осон оксидланади.

Дисахаридлар 2 та моносахариддан тузилган бўлиб, улар бир – бири билан гликозид боғи билан боғланган бўлади.

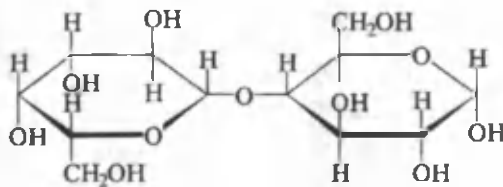
Энг муҳим дисахаридлар асосан 3 та; сахароза, лактоза ва мальтозадир. Булардан ташқари трегалоза ёки микоза, целлобиоза ва генциобиоза учрайди.

Мальтоза 2та молекула глюкозадан ташкил топган бўлади, 1та эркин гликозид гидроксил (карбонил группаси) бўлганлиги учун металлارни қайтариш реакциялари амалга ошади.



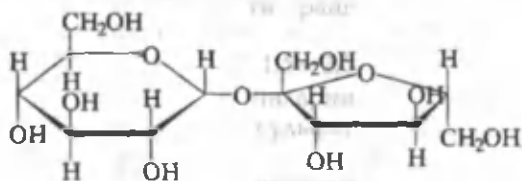
Мальтоза

Лактоза 1 молекула глюкоза ва 1 молекула галактозадан ташкил топган. Лактоза ҳам мальтоза каби эркин карбонил группасига эга бўлганлиги учун Троммер, Бенедикта, Нилендер ва бошқа реакцияларга осон кириша олади.



Сахароза 1 молекула глюкоза ва 1 молекула галактозадан тузилган бўлиб, уларда эркин гликозид гидроксил бўлмайди. Шунинг учун сахароза металларни қайтариш реакцияларини амалга ошираолмайди. Сахароза осон гидролизга учраб, глюкоза

ва фруктозага парчланади. Шунинг учун сахарозанинг бундай ҳолати инверт қанд деб аталади. Инверт қанд маннозаларга хос ҳамма реакцияларга кириша олади.



сахароза

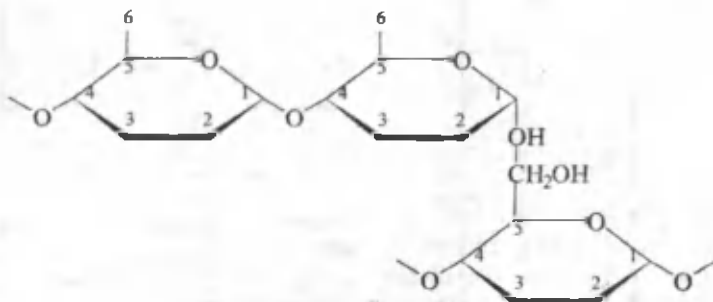
Полисахаридлар полимер моддалар бўлиб, моносохаридлардан ташкил топган. Крахмал, гликоген (ҳайвон крахмали), инулин, целлюлоза, хитин ва бошқалар табиатда энг кўп тарқалган полисахаридлар ҳисобланади. Улар организмда турли туман вазифаларни бажаради. Полисахаридлар молекуласидаги мономер сони, боғланиш усули, хоссалари ва бажарадиган функциялари билан бир – биридан фарқ қилади.

Полисахаридлар ширин мазага эга бўлмайди ва кристалла холига ўтмайди, уларнинг кўпчилиги каллоид эритма ҳосил қилади. Улар кислоталар ёки ферментлар ёрдамида гидролизланганда, дисахарид ва моносохаридларгача парчланади. Маннозаларнинг қолган қолдиги полисахаридларнинг молекуласида гликозид боғи билан боғланган бўлиб, тўғри ва тарқалган ҳолда жойлашади. Полисахарид молекуласидаги маннозаларнинг турига кўра гомо – ва гетерополисахаридлар фарқланади. Гомополисахаридларнинг молекуласи бир хил моносохаридларнинг такрорланишидан ҳосил бўлади. Гетерополисахаридларнинг таркибига турли хил моносохаридлар кириши ва улар углевод бўлмаган моддалар (липидлар, оқсиллар амнокислоталар ва бошқалар) билан боғланган бўлади.

Крахмал – юқори тузилишга эга бўлган полисахарид бўлиб, ўсимликларнинг асосий заҳира моддаси ҳисобланади. Ўсимлик ҳужайраларида тўпланадиган крахмал маълум ўсимликларда кўп бўлади. Масалан, картошкада, бугдойда, гуручда, сули ва арпада кўп миқдорда тўпланади. Крахмалга бой бўлган ўсимликлар озиқ – овқат саноатининг асосий хомашёси ва манбаи ҳисобланади.

Крахмал дончалари 2та компонентдан тузилган бўлиб, амилоза ва амилопектиндан ташкил топган. Амилоза иссиқ сувда

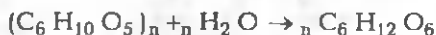
яхши эрийди, амилопектин эса кластр ҳосил қилади. Амилоза йод билан кўк ранг, аминопектин эса қизил – бинафша ранг ҳосил қилади. Амилозанинг таркибида Д глюкоза бўлиб, гликозид боғи билан боғланган ва тўғри занжирли тузилишга эга. Амилопектин эса худди ўша α-Д- глюкозадан тузилган бўлиб, лекин у шохланган занжирли тузилишга эга.



амилопектин тузилиши

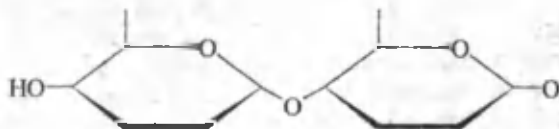
Крахмал таркибида амилопектиннинг миқдори кўпроқ бўлиб, 70 – 80 % ни ташкил қилади.

Кислоталар ёки амилаза ферменти таъсирида крахмал парчаланиб, охириги маҳсулот сифатида α-Д- глюкоза ажралиб чиқади.



Гидролизнинг оралиқ маҳсулоти бўлиб, декстринлар ҳисобланади. Кислотали гидролизда крахмал глюкоза ҳосил бўлгунча парчланади. Ферментатив гидролиз натижасида мальтоза дисахариди ҳосил бўлади. α-глюкозидаза (мальтаза) ферменти таъсирида мальтоза гидролитик парчаланиб, 2 молекула глюкоза ҳосил бўлади.

Крахмал қайтарувчанлик хусусиятига эга бўлмаганлиги учун Троммер, Ниландер, Бенедикте реакцияларини бермайди.



крахмал

Гликоген (ҳайвон крахмали). Жигарда (2–10%), склет ва силлиқ мускуларда, бош миёда бўлади. Ўсимликлардан замбуруғларда – аскомицетларда, фикомицетларда, базидиоми – цетларда сезиларли даражада бўлади. Гликоген иссиқ сувда коллоид эритма ҳосил қилади ва йод таъсирида қизил – кўнгир ёки қизил – бинафша ранг ҳосил қилади.

Гликоген кислотали ёки ферментатив гидролиз (глюкоамилаза ва гликогенфосфорилаза таъсирида) натижасида α -D-глюкозагача парчланади. Амилаза ферменти таъсирида гликоген мальтозагача парчланади.

Гликоген ўзининг тузилиши ва ҳоссаси билан крахмалнинг компоненти бўлган амилопектинга жуда ўхшайди. Гликоген молекуласи ҳам худди амилопектин молекуласи сингри, жуда тармоқланган бўлиб, кислород кўприкчалари билан α -глюкозидлар типига ўзаро боғланган бир қадар калта занжирлардан (12–18 глюкоза қолдиқларидан) тузилган. Гликоген қуруқ ҳолда оқ аморф кукундир. Гликоген ҳужайрада гранулалар дончалар шаклида бўлиб, асосан силлиқ эндоплазматик тўр билан бирикиб туради.

Целлюлоза. Целлюлоза ҳам полимер модда бўлиб, унинг мономерини ҳам глюкоза ҳисобланади. Ўсимлик организмидаги 50% углерод целлюлозага тўғри келади ва у Ер шарида ҳамма органик моддалар орасида ўзининг массаси билан биринчи ўринда туради. Целлюлозанинг ҳаммаси асосан ўсимлик организмида учрайди, лекин тубан умртқасизларда ва замбуруғларнинг бир группасининг (оомицетларда) таркибида ҳам бўлади. Ўсимликлардаги ҳужайра девори асосан (20–40%гачаси) целлюлозадан тузилган. Целлюлозанинг тузилиши унинг функцияси билан боғланган. Улар узун занжирли бўлиб, тахминан 10000 глюкоза қолдиғидан ташкил топган. Занжирнинг четидан кўплаб – OH группаси ташқарига чиққан бўлиб, турли томонга тарқалади ва кўлимча занжир билан водород боғларини ҳосил қилади. Бу эса целлюлозанинг мустахкамлигини таъминлаб туради. Занжирлар бир – бири билан бирикиб микрофибриллаларни ҳосил қилади. Бу микрофибрилла қатлавлари мустахкам бўлишига қарамай, сув ва унда эриган моддаларни осон ўтказиш хусусиятига эга. Целлюлоза ўсимликларда ҳужайра девори вазифасини бажариш билан бирга, кўпгина ҳайвонлар, замбуруғлар ва бактериялар учун озиқа модда бўлиб ҳам хизмат қилади. Целлюлозани глюкозагача парчаловчи фермент целлюлаза табиатда нисбатан кам учрайди. Шунинг учун кўпгина ҳайвонлар, шу жумладан одам ҳам целлюлозани, глюкозанинг бой манбаи бўлишига қарамай

ўзлаштира олмайди. Шуни айтиш керакки, кавш қайтарувчи ҳайвонларнинг ичагида симбионт ҳолда яшовчи бактериялар целлюлозани осон ўзлаштиришга ёрдам беради.

Целлюлозани саноатдаги аҳамияти жуда катта. Ундан газлама ва қоғоз тайёрланади.

Инулин. Инулин фруктозадан ташкил топган полисахарид. Инулин кўпгина ўсимликларнинг (қоқиўт, сачратқи, кўк — сарғиш ер нок, картошка гул) илдизида бўлади ва шу билан бирга баъзи сув ўтларида ҳам бўлади. Унинг таркибида β -D фруктоза бўлиб, ўзаро гликозид боғи билан боғланган. Кўпгина донли ўсимликларнинг илдизи ва баргидан фруктозадан ташкил топган полисахарид топишган бўлиб, инулидлар деб аталади. Инулидларнинг инулиндан фарқи шундан иборатки, фруктозанинг қолдиғи 2 ҳолатда боғланган бўлади. Инулин ва инулидлар илиқ сувда эрийди ва коллоид эритма ҳосил қилади. Инулин эритмаси йод билан реакцияга киришмайди. Кислоталар билан қайнатилганда ёки инулоза ферменти таъсирида инулин молекуласи гидролитик парчаланиб, β -D-фруктоза ҳосил бўлади.

Хитин. Хитин ўзининг тузилишига кўра целлюлозага жуда ўхшайди. Хитин бир қатор замбуруғларнинг таркибида учраб, ҳужайра деворини ҳосил қилади. Шу билан бирга бир гуруҳ ҳайвонларда, асосан бўғим оёқлиларда бўлиб, уларда ташқи скелет сифатида катта аҳамиятга эга. Хитиннинг тузилиши целлюлозага ўхшаш бўлиб, унинг таркибида 2-углерод атомида гидроксил группаси ($-\text{OH}$) — $\text{NH}\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_3$ группаси билан алмашинган бўлади.

Углеводлар организм учун зарур полимер моддалардан бири бўлиб, асосий энергия манбаи ҳисобланади. Шунинг учун углеводларни ҳар томонлама ўрганиш ва аниқлаш методларини ўзлаштириш муҳим ҳисобланади.

УГЛЕВОДЛАР ТАРКИБИНИ ҚОҒОЗДАГИ ХРОМАТОГРАФИЯ УСУЛИ БИЛАН АНИҚЛАШ.

Углеводлар таркибини аниқлаш ўсимликларда борадиган физиологик — биохимиявий жараёнларни таҳлил қилишда катта аҳамиятга эга.

Ўсимликлар таркибида эркин ҳолда бир қатор моносахаридлар — олигосахаридлар — пентозалар, гексозалар, ди — ва полисахаридлар учрайди. Буларнинг таркиби ва миқдори ўсимлик турига, ёшига, сутка вақтига, об — ҳавога қараб ва ўстириш шароитига

кўра ўзгариб туради. Бундан ташқари 1 та ўсимликнинг турли органларида углеводларнинг миқдори турлича бўлади.

Углеводларни (қандларни) аниқлаш методи, уларни ўсимлик материалдан ажратиб олишга ёки маълум шароитда гидролиз қилиш билан ди- ва полисахридлардан ҳосил бўлишига қаратилган. Бу методларни қўллаш билан фақатгина қандларнинг йиғиндисини аниқлаш мумкин. Қандларни таркибини ва миқдорини аниқлаш учун хроматография усулидан фойдаланиш яхши натижа беради. Бунда қоғоздаги хроматография усули содда ва тез бўлиб, белгиланган дарс соатида қўллаш мумкин.

Методнинг моҳияти. Қандлар янги ёки фиксирланган ўсимлик материалдан 70–80% ли қайноқ спирт билан экстракция қилинади. Экстракт бошқа моддалардан тозаланади. Эрувчан қандлар қоғоздаги хроматография усули билан маълум эритувчилар ёрдамида ажратилади. Хроматограммадан ўтказилгандан кейин қандлар махсус реактивлар ёрдамида хроматограммадан рангли реакциялар ёрдамида аниқланади.

Ишнинг бориши. Қандларни хроматография усули билан аниқлашда янги ўсимлик материали олинади. Олинган материалда 100 мг атрофида қанд бўлишлигига эътибор бериш керак бўлади. Шунга асосан ўсимлик баргларидан – 5–10 г, мева ва сабзавотлардан 1–5 г олиш керак бўлади.

Углеводларни экстракция қилиш учун ўсимлик материали стаканга солинади ва устига 5–6 карра 96%ли қайноқ этил спирти солинади ва 5 минут давомида сув ҳаммомида қайнатилади.

Агар материал кислотага бой бўлса, уни нейтраллаш учун стаканга бир оз бўр солинади. Бундан кейин стакандаги материал гамогенизаторда майдаланади. Агар гамогенизатор бўлмаса, ўсимлик тўқимаси тозаланган қум билан аралаштириб, ажратиб хавончада майдаланади. Майдаланган ўсимлик тўқимаси спирт билан биргаликда стаканга солинади ва тиндирилади. Юқориги қисм қуруқ стаканга филтраб олинади. Стакан тагида қолган ўсимлик тўқимаси иккинчи марта экстракцияланади. Бунда стаканга 30–40 мл 80 % ли этил спиртидан солинади ва 30 минут давомида сув ҳаммомида ушланади. Бу вақт орасида стакандаги материал арилиштириб турилади. Шундан кейин яна тиндирилади ва устки тиниқ қисми филтратга қўшилади. Учинчи марта экстракция қилингандан кейин ҳамма материал ва чўкма филтрдан ўтказилади ва филтлда қолган чўкма оз миқдордаги 80 % ли қайноқ этил спирти билан ювилади.

Агар ўсимликдан олинган материал тинмаса ёки яхши филтрянмаса, унда центрифугаланади. Бунинг учун

майдаланган материал хавончадан ёки гомогенизатордан центрифуга пробиркаларига солинади. Хавонча ёки гомогенизатор оз миқдорда 80%ли этил спирти билан ювилади ва бу центрифуга пробиркасига солинади. Аралашма 4—5 минут давомида 2—3 минг/ минут тезликда центрифугаланади, чўкма устидаги суюқликка қандлар ўтган бўлиб, суюқлик тоза колбага солинади. Чўкма эса стаканга солиниб, устига 80 % ли спиртдан 50 мл бўлгунча солинади ва қандларнинг кейинги экстракцияси амалга оширилади. Бунинг учун стакан 70°—80°С температурали сув ҳаммомида 30 минут давомида аралаштириб турилади. Шундан кейин стакан совитилади ва ичидаги аралашма центрифуга пробиркаларига солинади. Центрифугадан кейин чўкма устидаги суюқлик бошқа стаканга қуйилади ва чўкма яна 80%ли спирт билан экстракция қилинади. Бундай экстракция уч марта такрорланади.

Спиртли экстрактларнинг ҳаммаси йиғилиб, хайдаш колбасига солинади ва вакуум остида ҳайдалади. Вакуум сувли насос орқали ҳосил қилинади ва спирт 60° С да 10—8 мл қолгунча ҳайдалади.

Спиртни вакуум остида ҳайдаш ўрнига чинни идишдан фойдаланиб, сув ҳаммоми ёрдамида 40—50° температура остида буғлантириш мумкин. Буғлантиришни вентилятор ёки фен ёрдамида тезлаштириш мумкин.

Агар аниқланаётган материалда пигментлар кўп бўлса, уни экстрактдан чиқариб ташлаш керак бўлади. Бунинг учун экстракт петрол эфири билан қайта ишланади. Ҳайдаш учун қўйилган колба асбобдан чиқариб олинади ва суюқлик 100 мл ли ажратиш воронкасига солинади. Колба 2—3 марта иссиқ сув билан ювилиб, у ҳам ажратиш воронкасига солинади. Ажратиш воронкасидаги аралашма 25—30 мл дан ошмаслиги керак. Кейин колба 2—3 марта петрол эфири билан чайилади ва эфир ўша ажратиш воронкасига солинади. Агар спирт чинни идишда буғлантирилган бўлса, бунда ҳам аралашма ажратиш воронкасига солиниши зарур. Воронкадаги аралашма 5—10 минут давомида чайқатилади ва тиндирилади. Тиндирилгандан кейин сув тоза колбага қуйиб олинади. Эфир қавати учиради ва экстракт яна петрол эфири билан ажратувчи воронкада қайта ишланади. Бу иш пигмент тўла йўқолгунча 2—3 марта амалга оширилади. Сувли экстракт колбага солинади ва петрол эфирининг қолдиги сув ҳаммоми ёрдамида 60° С температурада тортувчи шкаф остида учиради.

Ўсимликлардан олинган сувли экстракта қандлардан ташқари турли бирикмалар — минерал ионлар аминокислоталар,

органик кислоталарнинг қолдиқлари бўлади. Булар қандларнинг хроматографиясига ҳалақит бериши мумкин. Шунинг учун бу бирикмалардан қутилиш мақсадида ион алмаштиргичлардан фойдаланилади.

Ўсимлик экстракти катионитлардан (КУ-2 ёки Дауэкс-50 H^+ формадагиси) ўтказилиб, неорганик катионлардан ва аминокислоталардан тозаланилади. Анионитлардан (Дауэкс-1, АВ-17, ПЭ-9) ўтказилиб, неорганик анионлардан, углеводларнинг фосфорли эфирларидан, органик кислоталардан тозаланади. Ион алмаштирувчи колонкаларни тайёрлаш қуйидагича олиб борилади.

Ион алмаштирувчилар зарраларининг оптимал катталиги 0,1-0,3 мм бўлади, чунки зарралар майда бўлса эритманинг колонкада ҳаракатланиши қийинлашади. Колонкани тайёрлаш учун ион алмаштирувчи смола хавончада майдаланади ва керакли катталikka эга бўлган зарраларни олиш учун махсус элақдан ўтказилади. Кейин 20 г атрофидаги ион алмаштирувчи 0,5 л ҳажмли таги текис қолбага солинади ва 3 соатга бўкиши учун қўйилади. Қолба вақти-вақти билан аралаштириб турилади. Бўктирилган катионит кўп марта лаб дистилланган сув билан ювилади ва сув тиниқ бўлгунча давом эттирилади.

Шундан сўнг колонка катионит билан тўлдирилади. Бунинг учун тагига шиша қўйилади ва кичик бўлақлар ҳолида сув билан солинади. Ҳар бир бўлақ шиша таёқча билан босиб турилади. Колонка тўлдирилгандан кейин ион алмаштирувчи керакли формага катионит водород бўйига анионит эса гидроксил бўйига ўтказилади.

Катионит КУ-1 ёки КУ-2 H^+ шаклига ўтказилиши учун, колонка орқали HCl нинг 7%ли эритмаси 1,5-2,5 мл/минут тезлик остида ўтказилади. Ўтиш тезлиги колонкадаги дастаги орқали бошқарилади. Агар колонкадаги катионит 15 г бўлса, уни "зарядлаш" учун (яъни H^+ шаклига келтириш учун) асосан 150 мл HCl етарли бўлади.

Колонка катионит билан тўлдирилгандан кейинги, филтратда HCl қолмагунча дистилланган сув билан ювилади. Катионитнинг HCl дан тўлиқ тозаланганлигини текшириш учун индикатордан фойдаланилади. Шундан сўнг тоза бўлган катионитли колонка ишлаш учун тайёр бўлади.

Анионит ЭДЭ-10П ёки бошқа бир анионит ишлаш учун худди катионит каби тайёрланади. Унинг "зарядлаш" учун 4%ли натрий ишқорисидан фойдаланилади. Бундан $NaOH$ колонкадан ўтказилгандан кейин унинг концентрацияси 4%ли бўлиб қолгунча

давом эттирилади. Бунинг учун одатда колонкадан 200 мл NaOH ўтказилиши зарур бўлади.

Анионит "зарядлангандан" кейин ортиқча NaOH сув билан ювилиб, фенолфталеин билан текширилади ва пушти ранг йўқолгунча давом эттирилади.

Колонкадан ҳамма эритмаларни ўтказиш тезлиги 1,5–2,5 мл/минутдан ошмаслиги керак. Анионит кислоталарни адсорбциялайди. Органик кислоталар анионитдан 0,2 н сульфат кислота ёрдамида элюирланади.

Қандлар нейтрал бирикмалар бўлиб, ион алмашилиши амалга ошмайди ва колонкадан ўтиб кетади. Катионлардан халос қилиш учун олинган экстракт 15х1 см ли, катионит билан тўлдирилган колонкадан ўтказилади. Суюқликнинг колонкадан ўтиш тезлиги 1 мл/минут тезликда амалга оширилиши керак. Колонка экстракт ўтказилгандан кейин 100 мл сув билан ювилади. Колонкадан ўтган суюқлик йиғилади, чинни идишга солинади ва вакуумда ёки сув ҳаммомида вентиллятор ёрдамида 60°C да 50 мл ҳажмигача буғлантиради. Экстракт совитилади ва анионит тўлдирилган колонкадан ўтказилади. Колонка сув билан ювилади, экстракт ва ювилган сувлар йиғилади, бир – бирига қўшилади ва чинни идишда вакуумда ёки сув ҳаммомида вентиллятор ёрдамида 60°C да 3–5 мл ҳажмигача буғлантиради.

Олинган экстракт 10 мл пробиркага солинади, чинни идиш оз миқдордаги илиқ сув билан ювилиб, улар ҳам пробиркага солинади. Суюқликнинг ҳажми белгиланган миқдоргача етказилади. Олинган эритма хроматография усули билан аниқлаш учун хизмат қилади.

Аниқланган эритмадан ташқари хроматография учун қандлардан "гувоҳ" эритмалар тайёрланади. Одатда "гувоҳ" сифатида хроматограммага қуйидаги қандлар томизилади: рибоза, ксилоза, арабиноза, глюкоза, манноза, галактоза, фруктоза, сахароза, мальтоза, лактоза ва рафиноза. Бу қандларнинг эритмалари 2%ли концентрацияда тайёрланади.

Хроматография учун стандарт хроматография қоғози (52х64 см) N4 олинади. Қоғознинг четидан 4–5 см қолдириб, қалам билан чизиқ тортилади. Шу чизиққа ҳар 3 см оралиқда нуқта қўйилади ва шу ерга қандларнинг эритмасидан томизилади.

Хроматограмманинг пастки томони қиррали қилиб кесилади, бу эса эритувчиларни бир текис юришини таъминлайди.

Хроматограммада қандларни яхши тарқалиши учун ҳар бир қанднинг миқдори 60–100 мкг атрофида бўлиши керак.

Шунинг учун бошланғич олинган материал 100 мг атрофида қандларни тутган бўлса, 10 мл ли пробиркадаги эритмадан хроматограмманинг 2 та нуқтасига 0,02 ва 0,05 мл дан томизилади. Хроматограммада белгиланган қолган нуқталарга «гувоҳ» эритмасидан 0,004 мл дан томизилади. Хроматограммага эритмалар микропипеткалар ёрдамида бир неча қайта томизилади. Ҳар гал қоғоз қуритилади.

Қандларни хроматографик тарқалиши учун бир қатор эритувчилар системаси таклиф қилинган. Қуйидаги эритувчилар кўп қўлланилади: Н-бутил спирти-сирка кислота-сув 4:1:5 нисбатда; Н-бутил спирти-этил спирти-сув-аммиак (40:10:49:1); сувга тўйинтирилган фенол 1 % ли аммиак билан; Н-бутил спирт-пиридин-сув (6:4:3) ва бошқалар.

Бутил-спирти-сирка кислота ва сувдан таркиб топган эритувчидан фойдаланиш учун, 4 ҳажм бутил спирт, 1 ҳажм сирка кислота ва 5 ҳажм сув олинади ва ажратиш варонкасига солинади. Аралашма аралаштирилади ва 15-20 минутдан кейин хроматография қилиш учун аралашманинг устки қисми олинади, пастки қисми эса тўқиб ташланади. Аралашма махсус кюветаларга солинади ва хроматография камерасига жойлаштирилади. Қандларни аниқлашда пастта тушувчи хроматографиядан фойдаланилади. Қоғоз кюветага яхшилаб жойлаштирилади ва хроматография камерасига қўйилади. Кюветага эритувчи солиниб, камера зич беркитилади.

Қандларнинг Н-бутил спирти-сирка кислота-сув (4:1:5) эритувчидаги R_f кўрсаткичи унча катта бўлмасдан қуйида баъзи бир қандлар учун R_f кўрсаткичи берилган.

Рефиноза — 0,05	Манноза — 0,20
Лактоза — 0,08	Мальтоза — 0,11
Арабиноза — 0,22	Фруктоза — 0,23
Сахароза — 0,14	Ксилоза — 0,25
Галактоза — 0,16	Рибоза — 0,31
Глюкоза — 0,18	

R_f нинг кўрсаткичи кичик бўлганлиги сабабля эритувчи бир марта ўтказилганда ҳамма қандлар қоғознинг юқориги қисмида қоляб кетади ва аниқ ажралиш кузатилмайди. Шу сабабли, эритувчи қоғоз орқали бир неча марта ўтказилади. Одатда эритувчини қоғозда охиригача юриши таъминланади, бунинг учун тахминан 24 соат вақт кетади.

Шундан кейин хроматограмма тортувчи шкафда 1–2 соат давомида қуритилади. Бунда асосан ҳамма қандлар яхши ажралади. Фақатгина 3 жуфт қандлар: галактоза–глюкоза, арабиноза–фруктоза, фруктоза–ксилозалар яхши ажралмайди. Агар қилинётган тажрибада бу қандлар борлиги аниқланса, эритувчи 3 марта 40–48 соат давомида утказилиши керак. Бундай ҳолда ҳамма қандлар яхши ажралади.

Кўпгина қандларнинг ажралиши, Н–бутанол–пиридин – сув (1:1:1) эритувчисида яхши натижа беради.

Қандлар ажралиб бўлгандан кейин хроматограмма тортувчи шкафда эритувчи охиригача кетгунча яхшилаб қуритилади. Шундан сўнг хроматограммага қандлар билан рангли реакция берадиган реактивлардан сепилади. Реактив универсал бўлиб, ҳамма қандлар билан реакцияга кириша олиши ва юқори сезгирликка эга бўлиши керак. Қуйида кўп ишлатиладиган реактивларни тайёрлаш йўллари кўрсатиб берилган.

1. Перманганат реактиви:

1 г К Мп О₄ ва 2 г Na₂ СО₃ кетма–кет сувда эритилади ва эритманинг ҳажми 100 мл га етказилади ва аралаштирилади. Хроматограммага махсус пуркагич билан сепилади ва хона температурасида қуритилади. Пуркалган рангли хроматограммада турли қандларнинг сариқ рангли доғлари пайдо бўлади. Қуритиш натижасида сариқ доғлар кулранг бўлиб, хроматограмманинг ранги жигарранг бўлади. Ранглари тез ўзгариши ҳисобга олинган ҳолда, ҳосил бўлган доғлар дарров қалам билан белгилаб қўйилиши керак.

2. Параанизидин реактиви:

Параанизидиннинг 3% ли эритмасида 96%ли этил спиртида тайёрланади. 100 мл эритмага 1,5 мл концентрланган НСl қўшилади, аралаштирилади ва хроматограммага сепилади. Шундан сўнг хроматограмма 120–150°С температурали термостатта 10 минутта қўйилади. Параанизидин қандлар билан сариқ, жигарранг ва қизил ранглр ҳосил қилади. Қоғозлар ранги эса жигарранг ҳолда бўлади.

3. Анилиндифениламинофосфат реактиви:

Хайдалган анилиннинг 96%ли этил спиртидаги 4 % ли эритмаси тайёрланади ва дифениламиннинг 4%ли эритмаси ҳам 96%ли этил спиртида тайёрланади. Биринчи ва иккинчи эритмалар 5 ҳажмдан олиниб қўшилади ва бир ҳажм концентрланган ортафосфат кислота қўшилади. Шундан сўнг хроматограммага томизилади ва ҳавода қуритиб, 10 минутта 80°С ли термостатта қўйилади. Қандлар рангсиз фонда ҳаворанг–яшил, кўк ва

жигарранг доғлар ҳосил қилади. Бу реактив қандларни очилтириш учун энг яхши ҳисобланади.

Юқоридаги реактивлардан ташқари айрим қандларни очиш учун ишлатиладиган махсус реактивлар ҳам мавжуд.

1. Анилинфосфат реактиви.

Н – бутил спиртининг 12 % ли сувли эритмаси тайёрланади. Шундан сўнг шу спиртда анилиннинг 0,075 М эритмаси (6,98 г 1 л да) ва фосфат кислотанинг 0,15 М эритмаси (14,7 г 1 л да) тайёрланади.

Реактив қора шишали идишда совуткичда сақланади. Шу реактив билан хроматограмма ишлагандан сўнг 105°C ли шкафта 5 – 10 минут давомида ушланади.

Альдогексозалар хроматограммада сариқ – жигарранг доғ, альдопентозалар – пушти, қизил ва олча рангли доғлар ҳосил қилади.

Дисахаридлар – мальтоза ва локтозалар ҳам ва тексозалар сариқ – жигарранг доғлар ҳосил қилади.

2. Нафторезоцин реактиви.

Бу реактивни тайёрлаш учун 100 мг нафторезорцин, ўзида 20 мл 2 н Н Сl ва 80 мл 96%ли этил спирти тутган аралашмада эритилади. Реактив совуткичда сақланиши керак. Реактив хроматограммага сепилади ва ҳавода енгил қуритилади ва секинлик билан шкафта 75° – 80°C температурада қизитилади. Хроматограммада кетозалар тиниқ рангли, альдозалар эса кўк – бинафша рангли доғларни ҳосил қилади.

МОНОСАХАРИДЛАРНИ МИҚДОРИЙ АНИҚЛАШ МЕТОДЛАРИ.

Моносахаридларни миқдорий аниқлаш асосан 2 хил метод билан аниқланади. 1. Карбонил группасини оксидланиши ҳисобига борадиган реакция асосида олиб борилади.

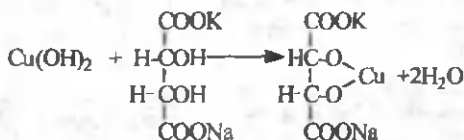
2. Ҳосил бўлган рангли конденсирланган бирикмаларнинг дегидротацияси реакциялари асосида олиб борилади.

ОКСИДЛАНИШ ЙЎЛИ БИЛАН ОЛИБ БОРИЛАДИГАН МЕТОДЛАР.

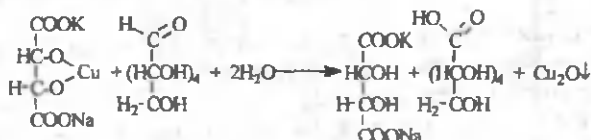
Вознисенский методи.

Методнинг моҳияти; моносахаридларни миснинг икки валентли ишқордаги эритмаси билан қайнатилганда, уларнинг маълум альдозаларгача ёки кетозаларгача оксидланиши амалга ошади. Бунда тенг миқдордаги мис қайнатилган ҳолга ўтади. Оксидловчи

реактив сифатида Фелинг эритмасидан фойдаланилади. Фелинг эритмаси мис купораси, сегнет тузи ва натрий ишқоридан тайёрланади. Ишқорий муҳитда ҳосил бўлган мис гидроксиди сегнет тузи иштирокида (K, Na виннокислий) комплекс бирикма ҳосил бўлиши ҳисобига эрувчан сақланиб қолади:



Оксидланиш ва қайтарилиш реакцияси натижасида мисли комплекс миснинг миқдорий қайтарилган ҳолига ўтади.



Реакцияга киришган редуцияланган углеводларнинг миқдори эритмадаги 2 валентли миснинг миқдорий камайиши билан белгиланади. Бунда ҳосил бўлган кўк рангнинг жадаллиги камаяди. Бу метод бўйича олинган намуналардаги 1 мг дан 15 мг гача бўлган редуцияланган углеводларни аниқлашга имкон беради.

Керакли реактивлар: 1. 4 % ли мис купораси ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

2. Сегнет тузининг ишқордаги эритмаси (200 г K Na – виннокислот ва 150 г Na OH сувда эритилади ва 1 л ҳажмгача етказилади).

Ҳосил бўлган эритма шиша филтрдан ўтказилади.

Аниқлаш йўли: Фелинг эритмаси аниқлашдан олдин тайёрланади. Буving учун 1 эритманинг маълум ҳажмдаги миқдорига тенг қилиб 2 эритма қўшилади ва яхшилаб аралаштирилади. Реакция 15 мл ли оғзи зич беркиладиган пробиркаларда олиб борилади. Мана шу пробиркага шипетка ёрдамида 6 мл углеводлар эритмасидан (1–15мг) солинади, устига 6 мл Фелинг реактивидан қўшилади ва яхшилаб аралаштирилади.

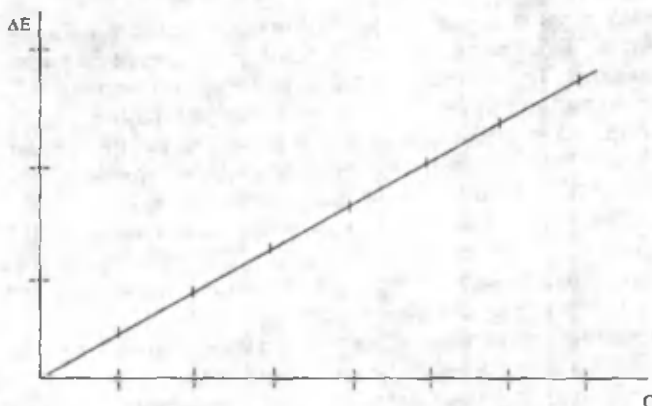
Контрол пробиркага углеводлар эритмаси ўрнига 6 мл дистилланган сув солинади ва устига 6 мл Фелинг реактивидан қўшилади. Тажрибаи ва контролли пробиркалар 10 минутга

қайнатиш учун сув ҳаммомига қўйилади. Бунда пробиркаларнинг пўкаклари зич беркитилмаган ҳолда туриши керак. Кейин пробиркалар тезда совуқ сув ёрдамида совитилади. Тажриба ўтказилаётган пробиркалардаги эритманинг ранги ўча бошлайди ва пробирка деворида қайтариш миснинг қизил чўкмаси пайдо бўла бошлайди. Чўкмадан ажратиш учун эритма 5–7 минут давомида 2000–3000 д остида центрифугаланади.

Тиниқ эритма (4–5 мл) шиша кюветаларга солинади ва 630–650 нм тўлқин узунлиги қаршида фотозлектроколориметрда ўлчанади. Натижалар контролли кюветалардаги кўрсаткичларни тажрибаларникидан айириб ташлаб олинади.

Ҳисоблаш ўтказиш. Тажриба қилинаётган эритмалардаги углеводларни аниқлаш учун колибрлаш эгри чизигидан фойдаланилади. Колибрлаш эгри чизигини чизиш учун концентрацияси маълум бўлган моносакхаридларнинг (глюкоза) стандарт эритмаларидан фойдаланилади. Стандарт моносакхарид хроматографик тоза бўлиши зарур. Бундан ташқари ишлатилаётган стандарт моносакхариднинг намлиги аниқланиши ва оғирлиги ўлчанганда бунга эътибор берилиши керак. Вознесенский методи бўйича колибрлаш графигини тузиш учун глюкозанинг 3 мг/мл концентрацияда эритмасидан ишлатилади. Графикдаги биринчи нуқтани олиш учун стандарт эритмадан 1 мл олинади ва устига 5 мл сув қўшилади. Кейинги 4 та нуқталарни олиш учун—2,3,4,5, мл стандарт эритма ва 4,3,2,1 мл сув қўшилади. Ҳамма пробиркаларга Фелинг реактивидан қўшилади ва юқорида айтилгандек тажриба ўтказилади ва ўлчанади. Бунга параллел ҳолда 6 мл сув солиниб, контрол тажриба ўтказилади. Ҳамма ўлчаш ишлари 2 марта олиб борилади.

Графикни чизаётганда обцисса ўқига турли концен-трациядаги глюкозаларнинг миқдори қўйилади. Ордината ўқига эса эритмаларнинг ФЭК даги кўрсаткичи қўйилади. График шундай чизилдики, координатанинг бошланиши нолдан ўтиши керак бўлади.



Расм1 – Вознесенский методи бўйича редуцирланган углеводларни аниқлаш учун калибрлаш графиги.

ФЭК – 56 М, X= 630 нм (фильтр N9) кюветалар
 с l= 0,5 см Δ E= Eконтр. E таж.

$$K = \frac{C}{\Delta E} = \operatorname{ctg} \alpha = 25,7$$

Ҳар доим график бўйича ҳисоблашни енгиллаштириш мақсадида графикнинг ҳисоблаш коэффицентини топиш қулай.

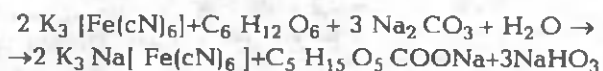
$$K = \operatorname{ctg} \alpha = \frac{C}{K}$$

Коеффициенти билгандан сўнг, қанднинг миқдорини осон топиш мумкин бўлади: $C = KE$.

Вознесенский методи ҳамма редуцияга учровчи углеводларнинг умумий миқдорини аниқлаш учун муҳим ҳисобланади.

Хагедорн – Иенсен методи.

Методнинг моҳияти: Редуцирланувчи углеводлар ишқорий муҳитда қиздирилганда калий феррицианид тузини (қизил қон тузи) калий ферроцианид тузигача (сарик қон тузи) қайтаради. Углеводлар бунда альдон ва альдар кислоталаригача оксидланади.

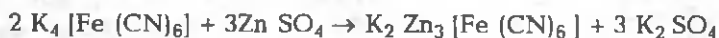


Бу реакцияни нормал ўтказилиши учун феррициониднинг миқдори кўп бўлиши керак. Сарфланмаган феррицианид қолдигини иодометрик усул билан аниқлаш натижасига кўра текширилаётган тажрибадаги углеводнинг миқдори белгиланади.

Сирка кислота иштирокида калий йодид қолган феррицианид билан оксидланади ва эркин йод ажралиб чиқади.



Реакцияни миқдорий ҳолатига ўтказиш учун рух сульфат қўшилади, бунда ҳосил бўлган ферроционид мураккаб рухли бирикма шаклида чўкмага тушади.



ҳосил бўлган йод эса натрий гипосульфит билан гитрланади.



Бу метод бўйича углеводларни миқдорий аниқлаш учун махсус жадвалдан фойдаланилади. (Жадвал 1)

Хагедорн – Иенсен методи углеводларни миқдорий 2 дан 385 мкг оралиғидаги диапазонда аниқлай олади. Бу метод ўзининг жуда сезгирлиги ва аниқлиги билан ажралиб туради.

Реактивлар:

1. 0,005 Н ли $K_3 [Fe(CN)_6]$ нинг 0,1 н ли $Na_2 CO_3$ даги эритмаси.
2. КJ эритмаси. Буни тайёрлаш учун 5 % ли $Zn SO_4$ ва 25 % $Na Cl$ хизмит қилади. Аниқлашдан аввал 100 мл шу эритмага 2,5 г КJ қўшилади.
3. Сирка кислотанинг 3 %ли эритмаси.
4. Крахмалнинг 1 % ли эритмаси.
5. 0,05 Н ли $Na_2 S_2 O_3$ эритмаси. Бу эритма ишлатишдан аввал тайёрланади.

Аниқлаш йўли: 2та 50 мл ли таги текис колбага ўзида 20 – 350 мг углевод тутган 10 мл эритма солинади ва уларнинг устига 2 мл дан калий феррицианид эритмасидан солинади. Учинчи контрол сифатидаги колбага 10 мл дистилланган сув солинади ва устига

оксидловчи эритмадан солинади. Ҳамма колбаларнинг оғзи яхшилаб беркитиладиган пўкак билан ҳаво совуткичига уланган ҳолда ёпилади ва 15 минутта қайнаб турган сув ҳаммомига қўйилади. Қайнатиб бўлгандан кейин колбалар оқиб турган сувда совитилади. Кейин ҳар бир колбага 3 мл дан КJ эритмасидан ва 2 мл дан 3 % CH_3COOH дан солинади. Колба яхшилаб аралаштирилгандан кейин, ажралиб чиққан йодни гипосульфит эритмаси билан 2 мл ли микробюретка ёрдамида титрланади. Титрлаш эритма сариқ сомон ранг бўлгунча давом эттирилади, бундан кейин эса 1–2 томчи крахмал эритмаси қўшилади ва эритма рангсизлангунча титрланади. Тажрибали ва контролли колбаларга титрлаш учун сарф бўлган гипосульфит эритмасининг ҳажми белгиланади.

Ҳисоблаш йўли: 1 – жадвалдан углеводнинг миқдори сарфланган гипосульфит эритмасининг миқдори тажриба ва контрол учун титрлашга кетган ҳажми бўйича топилади. Улар орасидаги фарқ редуцирланган углеводларнинг текширилаётган намуналардаги миқдорини белгилайди.

Гипосульфит бўйича ҳисоблаш жуда аниқ бўлмайди. Агар намуналардаги углеводларнинг миқдори 385 мкг дан юқори бўлса феррицианидининг ҳаммаси реакцияга киришади ва элементар йод ҳосил бўлмайди. Шунинг учун крахмал билан эритма кўкармайди. Бундай ҳолда текширилаётган эритма бидистилланган сув ёрдамида 2–4 марта суюлтирилиб қайтадан қилинади.

Жадвал 1

Редуцирланган углеводларни 0,005 н гипосульфитнинг ҳажми бўйича микрограмма ҳисоблаш

Эритма нинг ҳажми мл	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	385	382	379	376	373	370	367	364	361	358
0,1	355	352	350	348	345	343	341	338	336	333
0,2	331	329	327	325	323	321	318	316	314	312
0,3	310	308	306	304	302	300	298	296	294	292

0,4	290	288	286	284	282	280	278	276	274	272
0,5	270	268	266	264	262	260	259	257	255	253
0,6	251	249	247	245	243	241	240	238	236	234
0,7	232	230	228	226	224	222	221	219	217	215
0,8	213	211	209	208	206	204	202	200	199	197
0,9	195	193	191	190	188	186	184	182	181	179
1,0	177	175	173	172	170	168	166	164	163	161
1,1	159	157	155	154	152	150	148	146	145	143
1,2	141	139	138	136	134	132	131	129	127	125
1,3	124	122	120	119	117	115	113	111	110	108
1,4	106	104	102	101	99	97	95	93	92	90
1,5	88	86	84	83	81	79	77	75	74	72
1,6	70	68	66	65	63	61	59	57	56	54
1,7	52	50	48	47	45	43	41	39	38	36
1,8	34	32	31	29	27	25	24	22	20	19
1,9	17	15	14	12	10	8	7	5	3	2

ЛИПИДЛАР

Липидларга гидрофоб бўлган юқори молекулали моддалар киради. Бу моддалар сувда эриймайди, фақатгина органик эритувчиларда (хлороформ, эфир, ацетон, бензол, бензин) эрийди. Липидлар ҳамма тирик организмлар ҳужайрасининг албатта бўладиган компоненти ҳисобланади.

Химиявий тузилишига кўра липидлар бир қанча гуруҳларга бўлинади.

1. Нейтрал ёғлар ёки триглицеридлар.
2. Фосфолипидлар ёки фосфолипидлар
3. Сфинголипидлар
4. Гликолилипидлар
5. Стерин ва стеридлар
6. Мумлар

Органик эритувчиларда эришга қараб ва улардаги қутубли функционал группа молекулаларининг бор йўқлигига қараб 2 га бўлинади.

1. Қутубли липидлар
2. Нейтрал липидлар

Қутубли липидларга фосфолипидлар, сфинголипидлар, гликолипидлар киради. Нейтрал липидларга эркин ёғ кислоталари ва уларнинг эфирлари, ацилглицеридлар, стероидлар ва мумлар киради.

Липидлар тирик организмда жуда муҳим функцияларни бажаради. Биринчидан улар асосий энергия манбаи ҳисобланади, чунки 1 г ёғ парчаланганда 38,9 ккал энергия ажралиб чиқади. Бу эса 1 г углевод ва оқсил парчаланганда ажралиб чиққан энергиядан 2 марта кўп ҳисобланади. Иккинчидан липидлар ҳамма ҳужайраларнинг мембранасининг структура бирлиги ҳисобланади ва мембрананинг ярим ўтказгичлигини таъминлаб туради. Бунда ҳужайра ичига кирадиган моддалар танлаб ўтказилади.

Плазматик мембрана липид ва оқсиллардан ташкил топган бўлиб, уларнинг миқдорий нисбати асосан 1:1 нисбатда бўлади. Мембрана таркибидаги липидларнинг 40% дан 90% гача бўлган қисми фосфолипидлардан ташкил топган. Бактерияларнинг ва митохондриянинг ички мембранасидан кўп миқдорда кардиолипин топилаган.

Учинчидан липидлар ҳимоя функциясини бажаради. Бунда ички органларнинг ҳаммаси ёғ қавати билан ўралганлигини кузатиш мумкин.

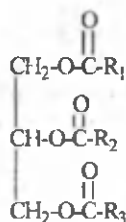
Тўртинчидан кўпгина витаминлар ва гормонлар липидларга ҳос бўлиб, организмда махсус бошқариш функцияларини бажаради.

Бешинчидан липидлар терморегуляция хоссасига эга бўлиб, организмдаги иссиқликни бошқариб туради.

Олтинчидан ёғлар сув манбаи бўлиб, улар парчаланганда сув ажралиб туради ва бу чўл зонасида яшовчи ҳайвонлар учун сув манбаи бўлиб хизмат қилади.

Стеринлар эса миянинг оқ моддасининг таркибида бўлади ва кўпгина биологик актив моддалар витаминлар, гормонлар ва ўт кислоталарини ҳосил бўлишида қатнашади.

Ёғлар триглицеридлар бўлиб, улар ёғ кислоталар ва глицериннинг мураккаб эфири ҳисобланади.



$R_1 R_2 R_3$ — юқори тузилишга эга бўлган ёғ кислоталарнинг қолдиги ҳисобланади.

Ёғларнинг таркибига тўйинган ва тўйинмаган ёғ кислоталари киради. Тўйинган ёғ кислоталаридан стеарин ($C_{17}H_{35}COOH$) ва пальмитин ($C_{15}H_{31}COOH$)лар ёғларнинг таркибида энг кўп бўлади. Тўйинмаган ёғ кислоталардан энг асосийлари олеин ($C_{17}H_{33}COOH$), линол ($C_{17}H_{31}COOH$)ва линолен ($C_{17}H_{29}COOH$) кислоталари ҳисобланади. Тўйинмаган ёғ кислоталарининг таркибида қўшбоғ бўлиб, бу уларнинг реакцияга осон киришишини таъминлаб беради. Олеин кислотасининг молекуласида 1 та, линол кислотасида 2 та, линолен кислотасида эса 3 та қўшбоғ бўлади. Линол ва линолен кислоталари одам организмида синтезланмайди ва овқат билан кириши зарур. Бу кислоталарнинг организмдаги етишмаслиги натижасида моддалар алмашинуви бузилади. Шунинг учун юқоридаги моддалар витамин сифатида таъсир этувчи моддалар хоссасига (витамин F) эга.

Линол ва линолен кислоталари ўсимлик мойлари (кунгабоқар, зиғир) таркибида бўлади.

Липидларни аниқлаш бўйича қуйидаги методлардан фойдаланиш мақсадга мувофиқ бўлиб, булар липидларни биологик материалларидан ажратиб олиш, бир қатор липидларни миқдорий аниқлаш, аналитик фракциялаш ва уларни юпқа қатамларда хроматография қилишдан иборатдир.

I. ЛИПИДЛАРНИ БИОЛОГИК МАТЕРИАЛЛАРДАН АЖРАТИБ ОЛИШ

Липидларни ажратишни ўзига хослиги.

Липидларни ҳужайрадан гўлиқ ажратиб олиш жуда қийин чунки, улар гетроген группали бирикмалар бўлиб, ҳужайрада эркин ва боғланган ҳолда учрайди. Боғланган ҳолда улар ҳужайрадаги гидрофил бирикмалар (оқсиллар, углеводлар) билан комплекс ҳосил қилади. Бу комплексларнинг ҳосил бўлишида ван-дер-ваальс кучлари, гидрофоб боғланиш ҳамда водород ва

коволент боғлар иштирок этади. У ёки бу типдаги боғларнинг бўлиши боғланган липидларни биологик материалдан экстракция қилиниши билан тушунтирилади.

Липидларни ҳужайрадан экстракция қилиниш даражасига кўра шартли равишда уч гурппага бўлиш мумкин.

1. Эркин липидлар
2. Боғланган липидлар
3. Мустаҳкам боғланган липидлар

Эркин липидлар онсонгина кучсиз қутбли эритувчиларда (петрол ва диэтил эфири, хлороформ, бензол ва бошқалар) эрийди. Бунда гидрофоб боғланиш ва ван-дер-вайлс кучлари осонгина бузилади.

Боғланган липидларни эритиш учун ва улардаги водород боғларини (мембрана липопротеидлардаги) бузиш учун аначигина қутбланган эритувчилар (метанол ёки этанол) қўлланилади. Мустаҳкам боғланган липидлар ковалент боғ билан боғланганлиги учун кучсиз кислота ёки ишқорнинг органик эритувчилар билан биргаликда гидролиз қилиниши билангина ажратиб олинади.

МАТЕРИАЛНИ ВА ЭРИТУВЧИЛАРНИ ТАЙЁРЛАШ

Липидларни ажратиш учун одатда янги материал қўлланилади, чунки юқори температурада қуритилган материалда оксидланиш ва ферментларнинг таъсири натижасида липидларнинг модификацияланиши кузатилади. Керак бўлганда материал лигофилланади (музлатилган ҳолда вакуум остида қуритилади) ва маълум температурада сақланади.

Кўпгина липидлар таркибидаги қўшбоғ ҳисобига осон оксидланади, шунга кўра уларни экстракция қилиш учун тоза органик эритувчилардан фойдаланилади. Эритувчиларни тозалаш учун ишлатишдан олдин ҳайдалади. Бунинг учун шиша зич беркитиладиган идишлардан фойдаланиб, липидларнинг оксидланишга сабабчи бўладиган моддаларни ўзига бириктирувчилар ёки сувни тортиб олувчи моддалар иштирокида олиб борилади. Ҳайдалган эритувчилар албатта қора идишда, оғзи яхши беркитилган ҳолда сақланади.

Липидларни экстракция қилиш ва сақлашда ишлатиладиган эритмалар қора шиша идишга солинади. Колбалар, ажратувчи воронкалар ва бошқа идишлар албатта шлифланган қопқоқ билан беркитилиши зарур.

ЛИПИДЛАРНИ ЭКСТРАКЦИЯ ҚИЛИШ

Липидларни экстракция қилиш учун ҳужайра ёки тўқима органик эритувчилар билан бузилади ва олинган гомогенатни эритувчида сақланади. Ҳайвон тўқимаси майда бўлақларга бўлинади ва гомогенизаторда (Блендор типдаги) майдаланади. Ўсимлик тўқимаси ва микроорганизмлар биомассаси ҳовончада шиша кукунни қум билан бирга эзилади. Майдалаш ишлари совитилган муҳитда олиб борилади, кейинги экстракция ишлари эса хона температурасида амалга оширилади.

Липидларни экстракция қилиш учун 2–3 та эритувчидан иборат бўлган аралашмадан фойдаланилади. Липидларнинг аралашмаси асосан хлороформ ва метанолнинг 2:1, 1:1 ва 1:2 нисбатдаги эритмасидан фойдаланиб экстракция қилинади. Энг кўп тарқалган методлардан бири Фолч методи бўлиб, хлороформ–метанол (2:1) нисбатдаги эритмасидан фойдаланилади ва бунда ҳужайрадаги липидларнинг 30–35% экстракцияланади.

Фолч методининг авзаллиги шундан иборатки, бу эритмалар аралашмаси ҳамма липидлар учун фойдаланилади.

Липидларни ажратиш учун олинган материалларнинг массасига нисбатан 3–6 ҳажм эритувчилардан олинади ва 20–30 минут давомида хона температурасида экстракция қилинади. Шундан кейин 10–15 минут давомида 2000 г тезликда центрифугаланади, бу процесс уч марта такрорланади.

Олинган экстракт таркибида липидлардан ташқари бир қатор гидрофил бирикмалар, масалан аминокислоталар ва қандлар бўлади. Кейинги липидларни аниқлаш учун экстракт липид бўлмаган қолдиқлардан тозаланади ва қуригилади.

Липид бўлмаган қолдиқлар сув билан ювилиб ёки сефодекс – G – 25 ли колонкадан ўтказиб тозаланади.

Липидларни қурийтиш

Экстрактни қурийтиш учун, эритувчи вакуум остида ҳайдалади, сув томчилари эса қолдиққа қуруқ бензол қўшилиши билан йўқотилади ва яхшилаб аралаштирилиб, охиригача вакуумда ҳайдалади. Бу процесс бир неча марта такрорланади. Кейин липидлар оз миқдордаги янги ҳайдалган хлороформда эритилади ва совуқда сақланади.

Липидларни тухум сариғидан ажратиб олиш

Битта тухум сариғига 50 мл хлороформ – метанол ва сув (2:1:0,8) аралашмасидан солинади ва 30 минут давомида магнитли аралаштиргич ёрдамида экстракция қилинади. 20 минут давомида 2000 г тезликда центрифугаланади.

Липид тугган органик фаза ажратиб олинади. Қолган қисмга яна эритувчилардан қўшилиб, процесс бир неча марта такрорланади. Ажратиб олинган липидли фракциялар умумлаштирилади.

Липид бўлмаган қолдиқлардан ҳоли бўлиш учун экстракт ажратувчи воронкага солинади, 20% ли бўлгунча сув солинади, аралаштирилади ва сув ва органик фаза бир – биридан тўлиқ ажралгандан кейин, органик қисми қолбага солинади. Шундан кейин эритувчи вакуум остида ҳайдалади. Қуригиш учун қолдиққа 5–7 мл қуруқ бензол қўшилади, аралаштирилади ва бензол ҳайдалади. Бу процесс бир неча марта такрорланади. Липид чўкмаси 5–10 мл янги ҳайдалган хлороформда эритилади. Кейин оғзи зич беркитиладиган қора шиша идишга солиб, совуқда сақланади.

Липидларни юрак мускулидан ёки жигардан ажратиб олиш

100 гр ёғдан ва устидаги пардасидан тозаланган тўқима (юрак мускули ёки жигар) 2–4°C температурада майдаланади ва хона температурасида 1–2 минут давомида 7–8 минг тезликда гомогенизириланади. Гомогенат оғзи зич беркитиладиган қолбага солинади ва 3 хисса ҳажмли хлороформ – метанол (2:1) аралашмасидан солинади. Липидларни экстракция қилиш хона температурасида магнитли аралаштиргич ёрдамида доимий аралаштирилиб турган ҳолда 30 минут давомида амалга оширилади. Суспензия 15–20 минут давомида 2000 г центрафугаланади. Органик фазаси ажратиб олинади, қолдиқ эса яна қолбага солинади ва экстракция қилиш аввалги шароитда 2 марта амалга оширилади. Бирлаштирилган экстрактлар вакуумда ҳайдалади ва липид қолдиғи 5–10 мл хлороформ – метанол сув (6:3:0,45) аралашмасида эритилади.

Липид бўлмаган қолдиқлардан тозалаш учун сефадекс G – 25 дан фойдаланилади. Сефадекс ишлатилишдан аввал майда қисмлардан тозалансади. Қрутилган сефадекс 3 ҳажм хлороформ – метанол сув (6:3:0,45) аралашмаси билан суспензия ҳолига келтирилади ва 10–12 соат давомида бўктириб қўйилади.

Бўккан сефадекс билан 2x15 см ли колонка тўлдирилади. Колонканинг тагига ювилган шиша вата жойлаштирилган бўлиши керак.

Колонка тўлатилгандан кейин сефадекснинг юзасига ҳам шиша вата қўйилади ва тайёр колонка бир ҳажм аралашма билан ювилади. Тозалаш учун колонкага липидлар экстракти томизилади (20–30%) ва 1,5–2 ҳажм ўша аралашма билан элюция қилинади. Элюат таркибида ҳамма липидлар бўлади. Липид бўлмаган қолдиқлар эса колонкада қолади ва уларни хлороформ–матанол (1:1) аралашма билан элюция қилиш мумкин.

Липид бўлмаган қолдиқлардан тозаланган экстракт колбага солинади ва ҳайдалади. Қолган қисмга 10 мл сувсиз бензол қўшилади, яхшилаб аралаштирилади ва бензол ҳайдаб чиқарилади. Сувдан ҳоли қилинган липидлар янги ҳайдалган бензолда эритилади ва оғзи яхши беркиладиган қора шиша идишда сақланади.

II. ЛИПИДЛАРНИ МИҚДОРИЙ АНИҚЛАШ УСУЛЛАРИ

Умумий липидларни тортиш усули билан аниқлаш

Таги думалоқ бўлган ва ҳайдаш учун мос бўлган колбанинг оғирлиги торозида аниқ ўлчанади. Ўзида 10–20 мг липидлар тутган маълум ўлчанган липид экстракти солинади ва эритувчиси азот ёрдамида ёки қуритиш аппаратида ҳайдалади. Липидлар чўкмаси қолган колба КОН ли вакуум–эксикаторида доимий оғирликка келгунча ушланади. Липидларнинг қуруқ оғирлиги чўкмали ва бўш колбанинг доимий оғирлигининг фарқи орқали аниқланади. Тортиш ишлари аналитик торозида олиб борилади.

Липидларни колориметрик метод билан аниқлаш

Методнинг моҳияти. Бу метод ванилин альдегиди (ванилин) билан липидларнинг фосфор кислотаси иштирокида борадиган реакциясига асосланган. Реакция маҳсулоти олча рангга бўялади.

Реактивлар: 1. Фосфо ванилин реактиви (0,013 М ли ванилин 11,8 М фосфор кислотасида тайёрланади). Бунинг учун 400 мг ванилин 40 мл сувда эритилади ва ҳажми 85% ли H_3PO_4 билан 200 мл гача етказилади. Бу реактив қора идишда хона температурасида узоқ вақт сақланади.

2. Концентранган сульфат кислота.

Аниқлаш йўли. Оғзи зич бекиладиган пробиркага 50 мкл липид экстракти солинади (контрол учун пробиркага 50 мкл хлороформ солинади) ва сув ҳаммомида буглантирилади. Шундан кейин пробиркага 0,2 мл концентрланган H_2SO_4 солинади ва 10 минут давомида сув ҳаммомида қайнатилади. Пробиркалар совитилади ва уларга 2,5 мл дан фосфо-ванилин реактивидан солиниб, яхшилаб аралаштирилади ва $37^{\circ}C$ температурада 15 минут ушланади.

Контрол қаршисида 540 нм да колومترланади. Липидларнинг миқдори колибрлаш графиги орқали ҳисобланади. Колибрлаш графигини тузиш учун юқори сифатли ўрик ёки зайтун мойининг хлороформдаги эритмасидан фойдаланилади. Методнинг сезгирлиги 10 дан 120 мкг гача бўлади.

ЎР КИСЛОТАЛАРИНИ АНИҚЛАШ

Методнинг моҳияти. ЎР кислоталари мис нитрат эритмаси билан чайқатилаганда бензолда эрувчан мис тузлари ҳосил бўлади. Органик фазадаги миснинг миқдори диэтилдитиокарбат натрий — $(C_2H_5)_2N-CS-S-Na \cdot 3H_2O$ ёрдамида аниқланади. Ҳосил бўлган рангнинг интенсивлиги ўР кислоталарининг миқдорига пропорционал бўлади.

Реактиваар: 1. 10 мл 0,5 М мис нитрат эритмасига 10 мл 1 М триэтанолламин эритмасидан ва 1 н NaOH эритмасидан қўшилади, аралаштирилади ва 30 г натрий хлордан солинади. Туз эриб бўлгандан кейин, эригманинг ҳажми сув билан 100 мл гача етказилади (рН 8,8).

2. 100 мг диэтилдитиокарбат натрий 100 мл бутанолда эритилади, эритма қороғида сақланади.

Аниқлаш йўли. Оғзи зич беркиладиган пробирка 5 мл ўР кислотасининг бензолдаги эритмаси солинади (контрол учун 5 мл бензол олинади) ва устига 2,5 мл I реактив дан солинади. Пробиркалар 2 минут давомида горизонтал ҳолда яхшилаб чайқатилади. Икки қисмга ажралиш бўлгандан кейин, пастки фазаси олиб ташланади. Юқориги (бензоли) фазаси натрий сульфат қўшилиб қуритилади. Бензоли эритмадан 3 мл олиб, тоза, қуруқ пробиркага солинади ва 0,5 мл 2-реактивдан қўшилади, аралаштирилади. Шундан сўнг 440 нм тўлқин узунлигида контролга нисбатан колориметрланади.

ЎР кислоталарининг миқдори колибрлаш графиги орқали ҳисобланади. Колибрлаш графигини тузиш учун ўР кислоталарининг бирортасини бензолдаги эритмасидан фойдаланилади.

Методнинг сезгирлиги намуналарда 50 дан 400 мкг гача бўлади.

ЛИБЕРМАН-БУХАРДТ МЕТОДИ БЎЙИЧА СТЕРОЛЛАРНИ АНИҚЛАШ

Методнинг моҳияти: Стерооллар сув тортувчи моддалар иштирокида (сульфат кислота) сирка ангдириди билан реакцияга киришиб конденсирланган яшил рангли бирикмани ҳосил қилади.

Реактивлар: 1. Сирка ангдириди, 2. Концентрланган сульфат кислота, 3. Хлороформ.

Аниқлаш йўли. Оғзи зич беркиладиган пробиркага 1 мл стероолнинг хлороформдаги эритмасидан солинади, устига 0,7 мл сирка ангдрид ва 0,1 мл концентрланган H_2SO_4 дан қўшилади. Пробиркадаги аралашма яхшилаб чайқатилади, ҳажми хлороформ билан 5 мл гача етказилади ва 15–20 минут давомида қоронғи жойда ушланади. Шундан сўнг бўялган эритма 610 нм тўлқин узунлигида колориметрланади.

Стероолларнинг миқдори колибрлаш графиги ёрдамида аниқланади. График тузиш учун эргостероолнинг ёки холестероолнинг хлороформдаги эритмасидан фойдаланилади. Аниқлашнинг сезгирлиги 50 дан 250 мкг гача бўлади.

СТЕРОЛЛАРНИНГ ТЕМИР ХЛОРИД БИЛАН БОРАДИГАН РЕАКЦИЯ АНИҚЛАШ

Методнинг моҳияти. Метод темир хлоридни стерооллар билан қўшилиши натижасида қизил (пур–пур) ранг ҳосил бўлишига асосланган. Реакцияда этил ацетат ва сульфат кислота иштирок этади.

Реактивлар: 1. Темир хлорид эритмаси (0,125 г $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 100 мл сирка кислотасида эритилади).

2. Этилацетат ($CH_3-COO-C_2H_5$).

3. Концентрланган сульфат кислота.

Аниқлаш йўли. Оғзи зич беркиладиган пробиркага 1 мл стероолнинг хлороформдаги эритмасидан солинади, устига 2 мл этилацетатдан, кейин эса 2 мл темир хлориддан қўшилади. Яхшилаб аралаштирилиб, устига 3 мл H_2SO_4 солинади. Аралашма яна секинлик билан чайқатилади ва 30 минутта ҳопа температурасида ушланади. Бўялган эритма 540 нм тўлқин узунлигида колориметрланади.

Колибирлаш графигини тузиш учун эргостерол ёки холестеролнинг хлороформдаги эритмасидан фойдаланилади. Методнинг сезгирлиги 10 дан 100 мкг гача бўлади.

ЛИПИДЛАРНИНГ ЙОД СОНИНИ АНИҚЛАШ

Методнинг моҳияти. Йод сони липидларни характерловчи муҳим омил ҳисобланади. У липидлар таркибидаги ёғ кислоталарининг тўйинмаганлик даражасини кўрсатиб беради. Йод сони деб, 100 г липидга бирика оладиган йоднинг грам сонига айтилади. Йод ва бошқа галогенлар липидлар билан қўшбоғ ҳисобига бирикади. Йод сонининг аниқлашнинг бир қатор методлари мавжуд бўлиб уларнинг кўпчилигида йод иштирок этмайди. Чунки йод тўйинмаган ёғ кислоталар билан жуда секин ва бир текис реакцияга киришмайди, лекин униинг бошқа галогенлар билан ҳосил қилган бирикмаси ёки бир қатор голлонд группаси бўлган гетероциклик бирикмалар тез ва кўп миқдорда қўшбоғга бирикиш хусусиятига эга.

Энг содда ва яхши ўзлаштирилган методлардан бири йод сонини дибромпиридин ёрдамида аниқлаш ҳисобланади.

Липид эритмаси мазкур реактив билан ивланади, кейин эса реакцияга киришмаган дибромпиридинни аниқлаш учун КJ қўшилади. Натижада эквивалент миқдордаги йоднинг миқдори гипосульфит билан титрлаб топилади.

Реактивлар: 1. Дом реактиви (0,05 н ли дибромпиридиннинг эритмаси) Бу реактивни тайёрлаш 5 мл сирка кислотига 1,85 мл H_2SO_4 ва 2,06 мл 5 мл сирка кислотада эритилган пиридин солинади. Аралашма совитилади, кейин унда 2 г (0,63 мл) бром эритилади ва ҳажми сирка кислотаси билан 500 мл га етказилади.

2. Янги тайёрланган 10% ли КJ.

3. 1% ли крахмал эритмаси.

4. 0,02 н натрий гипосульфит эритмаси.

Аниқлаш йўли. Оғзи зич беркиладиган колбага аниқ оғирлиги ўлчанган (2 дан 5 мг гача) липиднинг 5 мл хлороформда эритилган аралашмаси солинади ва 5 мл Дом реактивидан солинади. Колбаниннг оғзи беркитилиб, бир неча минут яхшилаб чайқатилади. Кейин хона температурасида 15 минут ушланади. Бундан кейин колбага 0,5 мл КJ эритмасидан ва 0,5 мл сув солинади.

Ҳосил бўлган суюқлик аралаштирилади ва сомон-сарик ранг ҳосил бўлгунча гипосульфит эритмаси билан титрланади. Кейин бир неча томчи крахмал эритмасидан солинади ва кўк

ранг йўқолгунича титрланади. Бу тажриба билан параллел ҳолда 5 мл хлороформ билан контрол тажриба олиб борилади.

Ҳисоблаш усули. Контрол ва тажриба учун титрлашга кетган эритмалар ҳажмининг фарқи аниқланади ($\Delta V = V_K - V_{II}$), шундан кейин йод сони қуйидаги формула ёрдамида ҳисобланади.

$$\text{Йод сони} = \frac{\Delta V \times K}{P} \times 0,00254 \times 100$$

Бу ерда P — липидларнинг грамлардаги миқдори.

K — гипосульфит эритмаси титрининг тузатмаси.

1 мл 0,02 л гипосульфат эритмасига 0,00254 г йод туғри келади (йод атом оғирлиги 127).

III. ЛИПИДЛАРНИ ФРАКЦИЯЛАШ

1. Липидларни колонкада ажратиш

Ҳар мл объектаардан ажратиб олинган липидлар узининг таркиби билан бир — биридан фарқ қилади, шунинг учун кейинги текширишлар учун улар фракцияланади.

Липидларнинг алоҳида синфлари ажратиб олинади, кейин улар кимёвий ва физик — кимёвий методлар билан текширилади.

Липидларни синфларга ажратиш учун улар колонкада ион алмаштирувчи (ДЭАЭ — целлюлозада) ёки адсорбцион (силикагелда) хроматография усули билан фракцияланади. Олинган фракциянинг гомогенлигини силикагелда ўтказиладиган юпқа қатламли хроматография усули билан текширилади. Охириги тозалаш учун юпқа қатламли хроматографиянинг препаратив варианты қўлланади. Колонка (2x20 см ёки 2,5x30 см) шилф ёрдамида ажратувчи воронкага (100 — 200 мл) уланади. Колонканинг пастки қисми шиша кран ёки қисқичли силикон шлангга уланган бўлиши керак. Колонканинг тагига шиша вата қўйилади, бу хлороформда ювилган бўлиши керак. 40 — 100 мкм шаклдаги силикагель, тозаланган ва қуритилган ҳолда 1 соат давомида 100 — 110°C температурада активлантирилади ва ишлатиладиган эритувчида сусдензияланади. Ташувчининг миқдорини ҳисоб қилиш учун 15 — 20 мг липид учун 1 г силикагель олиш мақсадга мувофиқ бўлади. Тайёрланган сусдензия бир солишда колонкага 10 — 15 см баландлик ҳажмида қўйилади. Бунда ҳажмининг ҳаммаси бир хил зичликда бўлиши ва орасида ҳаво пуфакчалари бўлмаслиги керак. Колонка 75 — 100 мл эритувчи билан ювилади.

Липидлар эритмаси (400–500 мг 2–3 мл хлороформда ёки гексаанда эритилган бўлиши керак) секинлик билан сорбонтнинг юзасига томизилади, колонканинг крапи очилади ва эритувчини сорбент ичига киришига имконият берилади. Колонканинг девори 2–3 мл эритувчи билан ювилади ва шундан кейин элюция қилувчи системага уланади.

Ажратиш учун одатда поғонали градиент қўлланилади. Коллектор ёрдамида фракциялар 5–10 мл қилиб йиғилади ёки ҳамма элюат битта поғонага тўпланади. Элюциянинг тугаганлигини аниқлаш учун силикагелли пластинкага бир томчи элюатдан солинади. Эритувчиси учиради ва доғлар йод буглари билан очилтирилади. Агар доғлар бўялмаса, элюция тугаган бўлади.

Элюция учун кетадиган эритувчининг ҳажми қилинган тажрибалар асосида аниқланади. Одатда 400 мг умумий липидларни ажратиш учун 200 мл атрофида элюция қилувчи аралашма олинади. Элюция тезлиги 1,5–3 мл/мин.

Кўпинча диэтил эфирнинг петрол эфирдаги ёки метанолнинг хлороформдаги эритмаси билан борадиган ўсувчи поғонали градиент қўлланилади. Диэтилэфир петрол эфирни билан аралаштирилиб градиентлар бўйича элюция қилинганда қуйдагилар қолда тарқалади:

1% ли диэтил эфирининг петрол эфирдаги эритмаси колонкадан каротиноидларни, мумларни, ёғ кислоталарининг эфирларини чиқаради.

4% ли эритмаси – триацилглицеридларни, ёғ кислоталарини, каротиноидларни.

10% ли эритмаси – ёғ кислоталарини, фитостеролларни, каротиноидларни.

25% ли эритмаси – 1,2 ва 1,3 – диацилглицеролларни.

60% ли эритмаси – хлорофилли, галактозилдиглицеролларининг бир қисминини.

100% ли эритмаси – моно ва дигалактозилдиглицеролларни, хлорофилли, фосфолипидларни, моноацетилглицеролларни чиқаради.

Қутубли липидларнинг бир қисми колонкада қолади ва уларни абсолют метанол ёки метанол градиентининг хлороформдаги аралашмаси билан элюция қилиш мумкин.

Умумий липидларнинг метанол градиентининг хлороформдаги аралашмаси ёрдамида ажралиши қуйдагича фракцияланади:

хлороформ нейтрал липидларни элюция қилади.

5–10% ли метанолнинг хлороформдаги эритмаси – цереброзидларни, дерамидларни, галактолипидларни, фосфатид кислотасини.

20–25% ли метанол – фосфатидилсеринни, фосфатиди лэтанололаминни 30–40% ли метанол – фосфатидил инозитолни.

40–50% ли метанол фосфотидилхолинни

50–60% ли метанол – лизофосфатидилхолинни, сфингомиелинни чиқаради.

Хлороформда элюция қилинган нейтрал липидларни силикагелни бошқа колонкада синфларга ажратиш мумкин. Элюция қилингандан кейин улар вакуумда қуюқлаштирилади, 2–3 мл гександа эритилади.

Колонкага 150 мг липидлар томизилади ва қуйдаги эритувчилар ёрдамида элюция қилинади.

Эритувчи	Ҳажми (мл)	Элюция бўлган модда
1. Гексан	45	Углеводлар
2. Гексан: диэтил эфир (99:1)	90	Стероидлар, метил эфирлари, ёғ кислоталари
3. Гексан: диэтил эфир (99:5)	60	Триацилглицероллар
4. Гексан: диэтил эфир (92:8)	75	ёғ кислоталари
5. Гексан: диэтил эфир (85:15)	115	Холестерол, диацетилаглицероллар
6. Диэтилэфир	45	Моноацетилаглицероллар

Олинган фракциялар вакуумда қуюқлаштирилади, хлороформда эритилиб, қора идишда совуқ муҳитда сақланади. Ҳар бир фракциядаги липид таркибини юққа қаватли хроматография усули билан силуфолда маълум эритувчилар системаси ёрдамида аниқланади.

2. ЛИПИДЛАРНИ ЮҚҚА ҚАВАТЛИ ХРОМАТОГРАФИЯСИ

Липидларни юққа қатламларга адсорбцияланишига асосланган метод ҳозирги кунда ҳам муҳим ҳисобланади ва липидларнинг мураккаб аралашмаларини ажратишда самарали натижа беради. Бу метод липидларни аналитик ва препаратив фракцияланишининг асосий методи бўлиб хизмат қилади.

Методнинг моҳияти. Липидларни юпқа қатламда хроматография қилиш адсорбциялашга қаратилган. Сорбент сифатида липидларни адсорбцион хроматография қилинганда асосан силикагель қўланилади. Шу билан бирга баъзан магний оксиди ёки алюминий оксиди ҳам ишлатилади. Силикагель ўзида ортокремний кислотасининг (H_4SiO_4) полимеризация маҳсулотини ва аммоний хлоридни тутати. У ҳар хил катталикдаги шарчалар шаклида чиқарилади. Силикагелнинг адсорбцион хоссаси унинг

юзасидаги силанол группасининг —Si-OH борлиги билан

белгиланади. Оддий шароитда бу гуппа сувнинг мономолекуляр қаватини ушлаб қолади. 100–110⁰C температурада сув буғланиб кетади «қаватнинг активланиши» ва силикагелнинг адсорбцион хоссаси ошади.

Липидларнинг силикагел шарчаларига адсорбцияланиши сорбентнинг қутбли группалари ва липидларнинг функционал группалари орасида водород боғининг ҳосил бўлиши билан тушунтирилади.

Ўзида ионоген гуруппалар (фосфо ва гликолипидлар) тутувчи липидлар сорбент билан электростатик боғланиш ҳисобига мустақкам боғ ҳосил қилади. Липидларни силикагелга адсорбцияланишида ван-дер-ваальс кучлари ва гидрофоб боғлар аҳамиятга эга бўлмайди.

Липидлар ўзида бириккан группаларнинг химиявий жиҳатдан гетероген бўлганлиги сабабли уларнинг силикагелга адсорбцияланиши ҳам уларнинг тузилишидан келиб чиқиб, жуда турли тумандир. Масалан тўйинган углеводородлар жуда бўш адсорбцияланади ёки бутунлай адсорбцияланмайди. Уларнинг молекуласида функционал группаларнинг ҳосил бўлиши билан мазкур бирикмаларнинг адсорбцияланиш қобилияти оша бошлаяди. Кўпгина липидларнинг молекуласида бир нечта функционал группалар бўлади ва бу уларнинг адсорбцияланишига сезиларли таъсир кўрсатади.

Уларнинг таркибидаги қўшбоғларнинг бўлиши уларнинг силикагелга бирикишини оширади.

Юпқа қатламли хроматографияда липидларнинг ажралиши органик эритувчиларни юпқа қаватдан ўтказилиши билан амалга оширилади ва бунда липидлар тутган аралашма юпқа қатламнинг маълум бир участкасига томизилади. Эритувчи капиллярлардан ўтаётганда липидларни эритади ва томизилган жойдан маълум узоқликкача олиб боради. Бунда эритувчи липидларнинг

адсорбцияланиш даражасига тескари пропорционал ҳолда ҳаракатланади.

Липидларнинг яхши ажралиши учун, эритувчини тўғри танлаш катта аҳамиятта эга ва уларнинг маълум қутублилигини белгилаб туради.

Шундай қилиб, нейтрал липидларни ажратиш учун монополяр эритувчилар (петрол эфири, гексан) ишлатилади, қутубланган липидларни ажратиш учун эса, анча қутубланган (хлороформ, метанол ва бошқалар) эритувчилар қўлланилади.

Органик эритувчилар ўзининг қутубланганлигининг ошиши билан жойлаштирилганда липидларнинг адсорбцияланишига қараб элюцияланиши ҳам ўзгариб боради ва қуйидаги тартибда эритувчилар жойлаштирилади. Жойлашиш тартиби: петрол эфири, циклогексан, углерод хлорид, бензол, хлороформ, дихлорэтан, дихлорэфир, этилацетат, этанол, метанол, сирка кислотаси. Липидларни эритиш учун кўпинча 2–3 хил органик эритувчилар аралашмасидан фойдаланилади.

ХРОМОГРАФИЯ ПЛАСТИНКАЛАРИНИ ТАЙЁРЛАШ

Силикагелни қайта ишлаш. Юпқа қатламли хроматография учун кўпинча КСК маркали силикагель ишлатилади. Уни шарли майдалагичда бир неча соат давомида майдаланади ва фракцияларга ажратилади. Бунинг учун №73 ли капрон элақдан ўтказилади.

Ишлатишдан аввал силикагелдаги темир ионларини йўқотиш учун 5 ҳажм 20% ли HCl эритмасидан солинади ва ҳона температурасида бир неча соат сақланади. Вақти–вақти билан аралаштирилиб турилади. Шундан кейин Бюхнер воронкасида филтрлаш йўли билан силикагель эритмадан ажратиб олинади. HCl билан ишлов бериш темир ионлари қолмагунча бир неча марта қайтарилади. Темир ионларининг йўқлиги қизил қон тузи билан реакция ўтказиб текшириб кўрилади. Охирида силикагель кўп марталаб сув билан ювилади. Хлор ионларининг бор йўқлигини билиш учун AgNO_3 билан реакция қилиб кўрилади. Ювилган силикагель кукуни филтр қоғози ёрдамида ҳавода қуритилади.

Пластинкаларни тайёрлаш. Юпқа қаватли хроматография учун турли катталиқдаги пластинкалардан фойдаланилади. Кўпинча предмет ойнаси ёки фотопластинкадан фойдаланилади. Ишлашдан олдин детергентлар ёрдамида ва хром аралашмаси билан ювилади. Шундан кейин сув ва дистилланган сув билан

ювилади. Пластинкалар яхшилаб қуритилиб, усти берк қутида сақланади.

Суспензия тайёрлаш ва уни пластинкага томизиш. Кўпинча силикагель оҳак билан аралаштирилиб пластинка устига ёпиштирилади. Бир текис аралашма олиш учун 6 г силикагель ва 0,3 г оҳак стаканга ёки ҳавончага солиб 7–10 минут давомида аралаштирилади. Аралашмага 10 мл сув солиниб 1 минут давомида аралаштирилади, кейин эса 2 мл сув солиниб, яна 1 минут давомида аралаштирилади. Ҳосил бўлган суспензия 1–2 минут давомида тезда пластинкага ёпиштирилади. Бунинг учун 2,5x7,5 см катталиқдаги пластинканинг ўртасига пипетка ёрдамида аралаштириб турилган ҳолда 2 мл суспензия томизилади ва бир маромда чайқатилади, ҳамда бир текис тарқалишига эътибор берилади. Шу усул билан зарур пластинкани тайёрлаш мумкин бўлади.

Шундан кейин пластинкалар текис жойда горизонтал ҳолда хона температурасида 30–60 минут давомида қуритилади. Охириги қуритиш ишлари ва активлантириш 100–110°C ли қуритиш шкафида 30–60 минут давомида олиб борилади.

Активлантирилган пластинкалар дарҳол ишлатилади ва сув тортиб олувчи моддали эксикаторда сақланади.

Юпқа қаватли хроматография учун тайёр ҳолдаги пластинка «Силуфол» ҳам ишлатилиши мумкин. Бунда силикагель алюминли қоғозга крахмал ёрдамида ёпиштирилган бўлади. «Силуфол» пластинкаларини ишга тайёрлаш учун, уларни фақатгина активлантириш керак.

ХРОМАТОГРАФИЯ ЎТКАЗИШ

Аралашмани томизиш. Текширилаётган аралашма томизилмасдан аввал пластинкалар текширилади. Сорбентнинг қатлами текис, ёрилмаган ва катта дончалари бўлмаслиги керак. Юпқа, қалин ёки текис бўлмаган сорбентнинг четлари чизғич қўйиб скальпел ёрдамида текисланади. Текширилаётган аралашма капилляр ёрдамида нуқталар шаклида томизилади. Бунда нуқталар пастдан 7–10 мм, ён томондан эса 5 мм оралиқда томизилади. Сорбент қатламини бутун сақлаш мақсадида қоғозга қалам билан нуқталар белгиланади, ундан кейин қоғоз сорбентли пластинкага қўйилади ва текширилаётган аралашма белгиланган жойга томизилади.

Текширилаётган аралашма билан бирга стандарт эритмалар яъни белгили модда томизилади ва шунга асосан аралашманинг таркиби идентификацияланади. Намуналардаги липидларнинг

миқдори сорбент сизими ва текшириш вазифаларига боғлиқ бўлиб, асосан 5 мкг дан 1000 мкг гача бўлади.

ХРОМОТОГРАФИЯНИ ҲОСИЛ ҚИЛИШ Намуналар томизилган пластинкалар оғзи зич беркиладиган хроматография камерасига жойлаштирилади. Бунга аввалдан эритувчи 5—7 мм баландликда қуйилган бўлиши керак. Эритувчига пластинка четидан 5 мм қолгунча бўлган масофага кутарилишига имкон берилади, кейин олинади, қалам билан эритувчининг чегараси белгиланади ва тортувчи шкаф остида қуритилади. Шундан кейин у ёки бу универсал ёки специфик реагент ёрдамида очилтирилади. Ҳосил бўлган доғлар белгиланади, уларнинг Rf ҳисобланади ва белгиларнинг тарқалишини ҳисобга олган ҳолда идентификацияланади.

Пластинкаларни сақлаш ноқулай бўлганлиги сабабли, уларнинг фото нусخаси чизиб олинади.

Нейтрал липидларнинг хроматографияси (синфларга ажратиш)

Бу мақсад учун қатлами яхши активлантирилган сорбент ва кучсиз қутбланган эритувчилар қўлланилади. Аниқловчи бели сифатида стерол, эритмалари (эргатерол, холестерол), ёғ кислоталари (олеин, линол ва бошқалар), углеводород (сквален), триацилглицероллар (ўрик, зайтун ва бошқа мойлар) томизилади. Энг яхши эритувчилар системаси петрол эфири, диэтил эфир ва сирка кислота бўлиб, улар 80:20:1 ҳажм миқдорида олинади. Бу ўсимлик липидлари учун олинади ёки 90:10:1 ҳажм миқдорида ҳайвон липидлари учун ишлатилади.

Липид экстрактининг компонентлари юқоридаги системаларда хроматография қилинганда қуйидаги тартибда жойлашади: тўйинмаган углеводородлар, стерол эфирлари, мумлар, юқори молекулали альдегидлар, триацилглицероллар, юқори молекулали спиртлар, ёғ кислоталари, 1,1—диацилглицероллар, оксикислоталар, моноацилглицероллар. Углеводородлар бунда эритувчи билан юра бошлайди, томизилган жойда липидлар қолмайди.

Ҳосил бўлган хроматограмма универсал ва специфик реагентлар билан очилтирилади ва липид экстрактининг компонентлари идентификация қилинади. Қутубли липидларни гамогенлигини аниқлаш учун 2 ўлчамли хроматограмма ўтказилади. Силуфол пластинкасининг (6х6 см) четидан 1 см қолдириб 10—20 мкг текширилаётган липид аралашмасидан

томизилади. Биринчи йўналиш бўйича хлороформ – метанол сув (65:25:4) эритувчидан ўтказилади. Кейин пластинкалар яшилаб қуритилади ва перпендикуляр ҳолатда хлороформ – метанол аммиак (14:6:1) эритувчилар системасида хроматография қилинади. Пластинкалар қуритилгандан кейин хроматограмма универсал реагент ёрдамида очиштирилади.

3. Липидларни препаратив юпқа қаватли хроматографияси

Турли фракцияли аралашмалардан гомоген липид препаратини олиш учун колонкадан олинган фракция препаратив хроматография қилинади. Айрим липидларни сезиларли миқдорда йиғиш учун катта (20x20 см) ва қалин сорбент (0,5 – 1,1 мм) ёпиштирилган пластинкалардан фойдаланилади. Бунинг учун сорбентнинг қуқоқ суспензияси (6 г силикагель, 0,3 г оҳак, 10 мл сув) тайёрланади. Хроматография олдиндан силуфолда ажратиш учун тайёрланган шароитда ўтказилади. Хроматограмма ҳосил бўлгандан кейин, у йод буғлари билан очиштирилади. Хроматограмманинг асосий қисми кўрингандан кейин усти шиша пластинка билан беркитилади ва хроматограмманинг чекка қисмлари очиштирилади. Бирикмалар идентификация қилинади. Липид тутган сорбентнинг қисмлари қириб олинади ва элюцияланади.

3–5 мг индивидуал липид олиш учун 5 тадан 10 тагача хроматограмма қўйилади. Хроматограммадан олинган сорбент ва бир синфга мансуб бўлган липидлар бирлаштирилади.

Нейтрал липидларни сорбентдан экстаркция қилиш учун қуйидаги эритувчилар системаси ишлатилади.

1. хлороформ: метанол (2:1 ёки 4:1)
2. хлороформ: метанол : диэтил эфир (1:1:1)
3. хлороформ

Фосфолипидлар қуйидаги аралашмаларда элюцияланади.

1. хлороформ: метанол (1:1)
2. хлороформ: метанол : аммиак (56:42:2)

Гликолипидлар ацетон ёки метанол билан элюцияланади. Элюция қилиш учун ўзида адсорбцияланган модда тутган сорбент колбага солинади, устига 2–3 ҳажм элюатдан солинади ва 3–5 минут давомида чайқатилади. Чўкмаси центрифуга йўли билан ажратилади. Сорбентдан моддани тўлалигича ажратилиши учун экстракция бир неча марта такрорланади (бу процесс йод билан текширилиб борилади). Бирлаштирилган экстракт

вакуумда қуритилади, гомогенлиги текширилади ва кейинги текшириш ишлари олиб борилади.

Хроматограммани очилтириш Хроматограммани очилтириш учун универсал очилтирувчилардан фойдаланиб ҳамма липид синфларини топиш мумкин ва специфик очилтирувчилар ёрдамида ўзида маълум функционал группалар тутган бирикмаларни аниқлаш мумкин бўлади.

Универсал реагентлар

1. Йод буглари. Герметик зич беркиладиган камера (ёки эксикатор) тагига Петри косачасида кристалл йод қўйилади. Камера йод буглари билан тўйингандан кейин унга 5–10 минутга пластинкалар жойлаштирилади. Тўйинмаган липидлар жигарранг доғ шаклида ҳосил бўлади. Уларни йодли муҳитта қўйиб, яна ҳосил қилиш мумкин.

2. Родамин В. Хроматограммага родамин В нинг 0,5% ли спиртдаги эритмасидан пуркалади ва тезда ультрахемископда кўрилади. Липидлар оч пушти рангли доғ ҳосил қилади. Спирт учиб кетиши билан доғнинг ранги ҳам йўқолади.

3.Родамин 6 ж. 0,1% ли спиртдаги эритмаси ишлатилади. Эритма пуркалгандан кейин, хроматограмма хўл ҳолда ультрахемископда (366 нм тўлқин узунлигида) кўрилади.

Нейтрал липидлар сариқ ёки салат рангли доғларни, кислотали фосфолипидлар ҳаворангли доғларни ҳосил қилади. Спиртли эритма ўрнига 0,01 % ли сувли эритма ҳам қўлланилади (Бошланғич 0,1% ли эритма қора идишда сақланади ва ишлатилишидан олдин 10 барабар сув билан суюлтирилади).

4.Сув билан ювиш. Хроматограммага сув пуркалгандан кейин липидлар хўл пластинкада ювилмаган доғ шаклида кўриниб туради.

5.Сульфат кислота ёрдамида куйдириш. Пластинкаларга 20–50% ли H_2SO_4 дан пуркалади ва 150–200°C температурада 10–20 минут давомида қиздирилади. Шундан кейин кулранг пластинкаларда липидлар қора доғ бўлиб кўринади. Силуфол пластинкалар ва $AgNO_3$ қўшилган пластинкалар шу реагент билан очилтирилмайди (баъзан $K_2Cr_2O_7$ нинг 50% H_2SO_4 даги тўйинган эритмасидан фойдаланилади).

6. 10–20% ли сульфат аммоний тутган сорбент қатлами 180°C да 10–15 минут қиздириш билан очилтирилади. 20% ли сульфат аммоний хроматограммани кейинги босқич қиздириш учун пуркалади.

7. Пластинкалар 5% ли фосфомолибден кислотанинг этанолдаги 5% ли эритмаси сепилгандан кейин 110°C температурада 20–30 минут давомида қиздирилади. Липидлар кўк ранга бўялади.

Стеролларни аниқлаш

1. 50 мг $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ 15 мл сувда эритилади ва унга 0,5 мл концентрланган сульфат кислота қўшилади. Уни хроматограммага пуркалгандан кейин, 5–10 минут 100°C температурада қиздирилади. Холестрол пушти рангли, эргостерол – кулранг – яшил рангли доғлар шаклида ҳосил бўлади. Узоқ қиздириш натижасида қора фон пайдо бўлади.

2. Учхлор сурманинг хлороформдаги эритмаси пластинкаларга пуркалади, кейин улар 10 минут давомида 100°C температурада қиздирилади. Стероллар рангли доғлар кўринишида УФ – светда аниқланади.

$SbCl_3$ ўрнига $SbCl_5$ – нинг тўртхлоруглероддаги 5–10 % ли эритмаси ҳам қўлланилади. Бу реактив аниқроқ ранг беради ва қиздиришни талаб қилмайди. Уф – светда кўринмайди.

3. Хроматограммага концентрланган сульфат ва сирка кислота (1:1) аралашмаси пуркалади ва 5–10 минут давомида 90°C температурада қиздирилади. Холестерол тутган бирикма қизил ранга бўялади, туйинмаган бирикмалар узоқ ушлангандан кейин пушти – жигарранг доғлар ҳосил қилади.

4. Хроматограммага ўзида 50 мг $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ нинг 90 мл сувдаги эритмаси, 5 мл сирка кислота ва 5 мл концентрланган сульфат кислота тутган реактив пуркалади, 2–3 минут давомида 100°C температурада қиздирилади. Шундан сўнг холестерол малина рангли бирикма ҳосил қилади. Холестеролнинг эфирлари кейинроқ ҳосил бўлади.

Аминогруппа тутган липидларни аниқлаш.

0,3 г нингидрин 100 мл сувга тўйинтирилган бутанолда эритилади ва унинг устига 3 мл сирка кислота қўшилади. Хроматограммага сепилгандан кейин 20 минут давомида 110°C температурада қиздирилади. Аминогруппа тутган липидлар оқ фонда пушти доғлар шаклида кўринади.

Гликолипидларни аниқлаш.

1. Хроматограмма α – нафтолнинг метанол: сув (1:1) аралашмасидаги 5 % ли эритмаси билан пуркалади, озгина куритилади ва 50 % ли сульфат кислота пуркалади. 5–10 минут

давонида 100°C температурада қиздирилади. Гликолипидлар кўк-бинафша ранг беради. Бошқа қутбли липидлар-сариқ, холестерол эса кулранг - қизил ранг ҳосил қилади.

2. Пластинкалар 20 мг нафторезорцин, 10 мл этанол ва 0,2 мл концентранган сульфат кислотадан иборат бўлган аралашма билан пуркалади. 5-10 минут давомида 90°C температурада қиздирилади.

Гликолипидлар кўк доғлар шаклида пайдо бўлади.

3. Хроматограмма 1,14 мл анилин ва 1,66 г о-фтал кислотанинг 100 мл сувга тўйинган бутанолдаги эритмасидан ташкил топган реактив билан пуркалади. 10 минут давомида 105°C температурада қиздирилади. Углевод тутган липидлар кулранг - жигаррангли бирикма ҳосил қилади.

Ганглиозидларни аниқлаш.

2 г резорцин 100 мл сувда эритилади(бу эритмани 3 ой сақлаш мумкин). Ишлатишдан 4 соат олдин 10 мл мазкур эритма ўзида 80 мл концентранган HCl ва 0,5 мл 0,1 М мис сульфат (2,5 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 100 мл сувда) тутган аралашмага қўшилади ва 100 мл гача сувда сукултирилади. Хроматограммага реактив пуркалади, устига тартиб билан шиша пластинка ёпилади ва 10 минут давомида қуритиш шкафида қиздирилади.

Ганглиозидлар (ва бошқа ўзида сиал кислотаси тутган бирикмалар) кўк - бинафша рангга бўялади.

Спирт ва углеводларни аниқлаш.

Хроматограммага кумуш нитратнинг аммиакли эритмаси пуркалади ва 10 минут давомида 100°C температурада қиздирилади. Шундан кейин қора фонда жигарранг доғлар ҳосил бўлади. (5 % ли AgNO_3 га сувда чўкма ҳосил бўлгунча аммиак қўшилади ва унинг бир қисми эритиш учун ҳам имкон берилади. Ишлаш вақтида эхтиёткор бўлиш керак, шу билан бирга эритма узоқ вақт сақланганда портловчи кумуш азид ҳосил бўлишини ҳисобга олиш керак).

Липидлар таркибидаги фосфорни аниқлаш.

1. 3 г аммоний молибдат 25 мл сувда эритилади, устига 30 мл 1н HCl ва 16 мл 57 % ли HClO_4 қўшилади. Ҳосил бўлган реактив хромограммага пуркалади ва 10-20 минут давомида 100°C температурада қиздирилади. Фосфолипидлар кулранг фонда ҳаворанг доғ ҳосил қилади.

2. Васьковский метод.

Эритма 1. 8,15 г аммоний молибдат 60 мл сувда эритилади.

Эритма 2. 25 мл 1-эритмага 12,5 мл концентрланган HCl қўшилади ва сув билан 50 мл гача суюлтирилади, 22 мл симоб қўшилади. Аралашма 30 минут давомида аралаштирилади ва қоғозли фильтр ердамида фильтрланади.

Эритма 3. 30 мл 1-эритмага 50 мл концентрланган HCl ва 56 мл концентрланган H₂SO₄ қўпилади. Ундан кейин секинлик билан 40 мл 2-эритма қуйилади. Аралашма сув билан 200 мл га етказилади. Эритма яшил рангли бўлиши керак.

Ишлатишдан олдин, керакли эритма 15 марта суюлтирилади. Хроматограммага тайёр реагентдан сепилади ва 5-10 мин. давомида 100°C да қиздирилади. Фосфор тутувчи липидлар кўк рангга бўялади.

Холинни топиш

1.Эритма А. 1г фосфомолибден кислота 50 мл хлороформ ва 50 мл этанол аралашмасида эритилади.

Эритма 2. 4 г калай хлоридни 100 мл 3н HCl да эритилади. (бу эритма ишлатишдан олдин тайёрланиши керак)

Пластинкалар аввал А-эритма билан пуркалади, куригилади ва Б-эритма сепилади. Холин тутувчи липидлар кўк рангга бўялади. Бу реакция тўлиқ специфик эмас, бунда тўйинмаган бирикмалар: моно ва дигалактозил диацилглицероллар ва бошқалар ҳам кўриниши мумкин.

2. Драгендорф реактиви.

Эритма А. 1,7 г висмут нитрат 100 мл 2% ли сирка кислотада эритилади.

Эритма Б. 40 г KI 100 мл сувда эритилади.

Сепиш учун 20 мл А эритма ва 5 мл Б эритма аралаштирилади, кейин 70 мл сув қўпилади. Сецилгандан кейин холин тутувчи бирикмалар қизгиш (қизил-қизгиш) ранг беради. Пластинкаларни қиздириш ҳам мумкин.

Жадвал 1

Нейтрал липидларнинг Rf кўрсаткичлари

Липидларнинг синфлари	Петрол эфери: диэтил эфир: сирка кислотаси эритмалари системасидаги Rf кўрсаткичи	
	90:10:1	80:20:1
Углеводородлар (парафинлар, олефин)	0,9 - 1,0	0,98
Сквален	0,95	0,98
Глицериннинг уч алкил эфирлари	0,90	0,85
Стеролларнинг эфирлари	0,90	0,94
Мумлар	0,90	0,88

0 – диалкилмоноацил глицероллар	0,7	0,88
Алкен – 1 – ил – диацил глицероллар	0,65	0,82
0 – моноалкилдиацил глицероллар	0,55	0,78
Ёғ кислоталарнинг метил эфирлари	0,65	0,77
Юқори ёғ метилкетонлар	–	0,63
Юқори ёғ альдегидлари	0,55	0,73
Альдегидларнинг диметил ацеталлари	–	0,73
Витамин К	0,55	–
Триацилглицероллар	0,3 – 0,4	0,60
Кознзим Q	0,25	–
α – токоферол	0,19	–
Ёғ кислоталари	0,18	0,39
Юқори ёғ спиртлари	0,15	0,30
Стероллар	0,10	0,19
Глицериннинг 0 – диалкил эфирлари	0,09	0,30
1,3 – диацилглицероллар	0,08	0,21
1,2 – диацилглицероллар	0,08	0,15
Глицериннинг 1 – 0 – моноалкилэфирлари	0	0,03
Моноацилглицероллар	0	0,02

Илова: 1,2 – , 1,3 – диацилглицероллар ва моноацилглицероллар изопропил эфири: сирка кислота (96:4) системасида ажралади ва ундан кейин гептан: изопропил эфири: сирка кислота (60:40:4) системада ажралади, бунда Rf кўрсаткичи 0,45, 0,25 ва 0,05 га мос келади.

Жадвал 2

Фосфо – ва гликолипидлар учун махсус очилтирувчилар ва Rf кўрсаткичи

Липид	Махсус реагентлар билан очилтириш Rf x 100									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Лизофосфатидилхолин	+	+	–	+	–	–	–	–	–	8
Фосфатидилинозитол	+	+	–	–	–	сариқ	–	–	23	11
Сфингомиелин	+	+	–	+	–	сариқ	–	–	16	22
Фосфатидилхолин	+	+	+	–	–	сариқ	–	–	–	20
Фосфатидилглицерин	+	+	–	–	–	–	–	–	48	37
Фосфатидилэтаноламин	+	+	+	–	–	сариқ	–	–	62	41
Фосфатидилсерин	+	+	+	–	+	сариқ	–	–	15	5
Фосфатидил – N – метил этаноламин	+	+	+	–	–	–	–	–	83	–
Фосфатидил – N,N –	+	–	–	–	–	–	–	–	52	–

диметил этаноламин												
Кардиолипин (дифосфатидилглицерин)	+	+	-	-	-	сарик	-	-	71	38		
Лизофосфатидная кислота	+	+	-	-	-	-	-	-	70	5		
Фосфатидная кислота	+	+	-	-	-	-	-	-	74	5		
Дигалактозил диглицерид	+	-	-	-	+	-	+	-	62	-		
Цереброзид	+	-	-	-	+	-	+	-	70	45		
									76			
Цереброзидсульфат	+	-	-	-	+	-	+	-	36	18		
Стеролярнинг гликозиллари	+	-	-	-	+	-	+	+	73	-		
Этерифицирланган стеролгликозид	+	-	-	-	+	-	+	-	78	-		
Моногалактозилдиглицерид	+	-	-	-	-	-	+	-	77	-		

Очилтирувчилар

1. Фосфолибден кислотаси
2. Васъковский реактиви
3. Нингидрин
4. Драгендорф реактиви
5. Кумуш нитрат
6. Родамин
7. Нафторезорцин
8. Марганец хлорид
9. Хлороформ: метанол: сув (65:25:4) системадаги Rf
10. хлороформ: метанол: 28% ли аммиак (65:25:4) системадаги Rf

Жадвал 3

Липидларни ажратиш учун ишлатиладиган эритмалар системаси

Эритувчилар	ҳажмлар нисбати
I. Липидларни синфларга ажратиш учун	
1. Петрол эфири: диэтил эфир: сирка кислота	90:10:1; 80:20:1; 70:30:2; 50:50:1
2. Гексан:диэтил эфири: сирка кислота	75:25:1; 70:30:1; 90:10:1
3. диэтил эфири: бензол : этанол: сирка кислота	40:50:2:0,5
4. диэтил эфир: гексан	6:95
II. Моно – ди – ва триглицеролларни ажратиш учун	
1. петрол эфири: диэтил эфир	7:3; 9:1; 2:1, 1:1

2. петрол эфири: этилацетат	7:3
3. гексан: диэтил эфир: сирка кислота	8:15:1
4. гексан: диизопропил эфир: сирка кислота	87:13:0,7
5. петрол эфири: диэтил эфири: сирка кислота: метанол	90: 7: 0,5:2
III. Стерооларни ажратиш учун	
1. хлороформ: ацетон	9:1
2. бензол: этилацетат	6:3; 9:1
3. циклогексан: этилацетат	7:3; 17:3
4. хлороформ	
5. бензол: хлороформ	4:6
6. циклогексан: хлороформ	50:50; 7:3
IV. Стерооларнинг эфирларини ажратиш учун	
1. петрол эфири: диэтил эфир	985:5
2. диэтил эфири: гексан	1:4 (5% $Al_2 O_3$ ли пластин каларда)
V. Ёғ кислоталари метил эфирлари ва эркин ёғ кислоталарини ажратиш учун	
1. петрол эфири: диэтил эфир	2:1, 9:1
2. гексан: диэтил эфири: сирка кислота	90:10:1; 85:15:1
VI. Фосфолипидларни ажратиш учун	
1. хлороформ: метанол: сув	65:25:4; 65:35:8; 60:20:3; 80:25:3
2. хлороформ: метанол: сув	75:22:8; 65:30:35; 65:30:5.
3. хлороформ: метанол: сирка кислота	7:3:1; 65:25:8; 70:20:2
4. хлороформ: метанол: 3% ли аммиак	14:6:1; 70:30:5; 13:5:1
5. хлороформ: метанол: 7% ли аммиак	65:35:5; 15:6:1; 230:90:15
6. н – пропанол: 12 н. Аммиак	4:1
7. изопропанол: сирка кислота: сув	3:1:1
8. изопропанол: 25% аммиак: сув	50:7:15
9. хлороформ: метанол: сирка кислота: сув	65:8:25:4; 50:6:25:4
10. хлороформ: сирка кислота: ацетон: сув	65:10:20:3:10; 5:1:2:0,5:1
11. хлороформ: этанол: чумоли кислота: сув	100:50:5:4
12. хлороформ: метанол: сирка кислота	65:25:8; 7:2:2
13. Икки ўлчамли системалар учун:	
I. йўналиш – хлороформ:	65:25:4

II. йўналиш – хлороформ: метанол: аммиак	14:6:1
VII. Фосфолипидлар ва гликолипидларни ажратиш учун	
1. хлороформ: метанол: сув	75:25:2
2. толуол: этилацетат: этанол	2:1:1
3. икки ўлчамли системалар учун	
I. йўналиш – хлороформ: метанол: сув	65:25:4; 30:10:0,5
II. йўналиш – хлороформ: метанол: сирка кислота: сув ёки	85:15:10:3
хлороформ: метанол: аммиак	30:10:0,4:1 15:5:1
VIII. Гликолипидларни ажратиш учун	
1. n – пропанол: 14 n аммиак: сув	7:3:1
2. n – пропанол: 12 n аммиак	4:1
3. хлороформ: метанол	9:1
IX. Галактолипидларни ажратиш учун	
1. хлороформ: метанол: сирка кислота	8:3:1; 60:35:8; 65:35:7
2. ацетон: сирка кислота: сув	100:2:1
3. хлороформ: метанол: сирка кислота: сув	65:25:10:10; 70:20:2:2; 65:25: 8:4
4. Кейин ўтказиш учун қўлланиладиган системалар	
а) ацетон: пиридин: хлороформ: сув	40:60:5:4
б) диэтил эфир: пиридин: этанол: 2 n аммиак	60:30:8:2
в) диэтил эфир: сирка кислота	100:3
5. 2 – поғонали ажратиш учун ишлатиладиган системалар	
а) хлороформ: метанол: сирка кислота: сув	70:20:2:2
б) гексан: диэтил эфири: сирка кислота	70:30:1
X. Сульфоллипидларни ажратиш учун	
1. хлороформ: метанол: сирка кислота: сув	85:15:10:3,5
2. хлороформ: метанол: сирка кислота:	65:25:10
3. бутанол: пропион кислота: сув	6:3:4
4. n – пропанол: 12,5% ли аммиак	4:1
5. хлороформ: метанол: этилацетат: 2n аммиак	50:25:25:1,5
XI. Цереброзидларни ажратиш учун (силикагелга 4% ли бор кислота қўпилади)	
1. хлороформ: метанол: сув	24:7:11
2. хлороформ: метанол	9:1
3. хлороформ: метанол: аммиак (бор кислотасиз)	80:20:0,4
4. хлороформ: метанол: сирка кислота: сув	65:25:8:4 65:25:8:0

4. Ажратилган липидларнинг характеристикаси Липидларнинг ишқорий гидролизи

Ажратилган липидларни структурасини аниқлаш учун, улар ишқорий гидролиз қилинади. Ҳосил бўлган гидролиз маҳсулоти ажратилади, унинг сифат таркиби хроматография методи билан аниқланади. Аниқланаётган липид компонентларининг миқдорий нисбати аниқланади. Олинган натижалар бирикмаларнинг структура формуласини аниқлаш имконини беради.

1—5 мг гача липид тутган эритма гидролиз қилиш учун колбага солинади, эритувчиси вакуумда ҳайдаб йўқотилади. Қолдиқ устига 3—10 мл 0,3 н КОН нинг спиртдаги эритмаси қуйилади ва қайтар совитгич ёрдамида қайнаб турган сув хаммонида 1 соат давомида гидролизланади. Гидролизат ажратувчи варонкага ўтказилади ва 3 ҳажм сув билан суюлтирилади.

Стерооларнинг эфирлари гидролизланганда ёғ кислоталарининг тузлари ва эркин стероолар ҳосил бўлади. Гидролиз маҳсулотларининг ажралиши шунга асосланганки, калийли совун сувда яхши эрийди, стероолар эса органик эритувчиларда яхши эрийди, шунинг учун аввал стероолар диэтил эфири билан экстракцияланади. Кейин эса гидролизат кислотали ҳолга ўтказилади ва ёғ кислоталари органик эритувчилар ёрдамида чиқарилади.

Стерооларни экстракциялаш учун сув ёрдамида 2 марта суюлтирилган гидролизат устига 5—10 мл диэтил эфир қўйилади, аралаштирилади ва устки фазаси йиғилади. Бу процесс 2—3 марта қайтарилади. Ўзида стерооларни тутувчи қўшилган экстрактлар 2 марта сув билан ювилади (5—7 мл сарфланади).

Ювилган сувлар гидролизатнинг сувли фазаси билан қўйилади. Эфир вакуумда ҳайдалади, ҳайдалгандан кейинги қолдиқ бензол билан қуритилади ва оз миқдордаги хлороформда эритилади, совуқда сақланади.

Ёғ кислоталарини тузларини ўзида тутувчи гидролизатнинг сувли фазаси стероолардан тозалангандан кейин 0,1 н HCl билан кислотали ҳолга ўтказилади. ёғ кислоталари 10 мм эфир билан бир неча марта экстракцияланади. Эфирли эритма нейтрал ҳолга келгунча сув билан ювилади, вакуум ёрдамида қуюқлаштирилади, бензол ёрдамида қуритилади ва хлороформда эритилиб, совитгичда сақланади.

Олинган бирикма юпқа қаватли хроматография усули билан «Силуфол» пластинкасидан фойдаланиб, петрол эфири : эфир: сирка кислота системасида (90:10:1) текширилади. Бу метод билан

гидролизнинг тўлиқ амалга ошганлигини ва гидролизатдаги стероллар ҳамда ёғ кислоталарнинг борлигини текшириш мумкин. Хроматограммага маркер сифатида текширилаётган липиднинг гидролизланмаган намунаси, холестерол, ёғ кислота томизилади. Ҳосил бўлган фракцияларда стероллар миқдори аниқланади.

Ишқорий гидролизда моно-, ди- триацетилглицеридлар, фосфо ва гликолипидлардан ёғ кислоталарининг тузлари (совулар) ва гидролизланаётган липиднинг структурасига кура — глицерин, глицерофосфат, моносакхаридлар ҳосил бўлади. Гидролиздан кейин ва гидролизатни сув билан суюлтирилгандан сунг, уни 0,1 н HCl билан 3–5 рН га келгунча кислотали муҳитга ўтказилади. Ёғ кислоталари экстракцияланади ва юқорида ёзилгандай қилиб ишланади. Гидролизатни сувли қисми ювилган сувлар билан қўшилади ва кейинги тажрибаларда ишлатилади. Текширилаётган липидларнинг гидрофил таркибини (триглицеридлар, фосфатидилэтаноламин ва бошқалар) идентификация қилиш ва миқдорий аниқлаш учун гидролизатнинг сувли қисмидаги миқдори бўйича ҳисоб қилинади. Эритма вакуумда 1–5 мл гача қуюқлаштирилади. Гидролизатнинг миқдорий таркибини текшириш юпқа қатламли хроматография усули билан активлантирилмаган «Сулуфал» пластинкалари ёрдамида амалга оширилади. Хроматограммага ўзида 3–5 м кг тутган аниқланаётган намуналар ва маркерлар тутувчи гидролизатдан томизилади. Глицеринни, глицерофосфатни, углеводларни аниқлаш учун н-пропанол: этилацетат: сув (7:1:2) системасида ажратиш олиб борилади. Хроматограмма Ag NO₃ нинг аммиакли эритмаси билан очилтирилади.

Азот тутувчи бирикмалар гидролизатни бутанол : сирка кислота : сув (4:1:1) системасида ажратиш билан аниқланади. Хроматограмма нингидрин эритмаси билан (этаноламин ва серинни очилтириш учун) ёки Драгендорф реактиви билан (холин учун) очилтирилади. Гидрофил таркибини табиати аниқлаб бўлингандан кейин, уларни миқдорий аниқлаш ўтказилади.

Глицеринни аниқлаш учун пробиркага ўзида 10–15 мл глицерин тутган гидролизатнинг маълум ҳажмдаги миқдори солинади, сув билан 2 мл гача етказилади ва глицерин период оксидланиш усули билан аниқланади.

Фосфатни аниқлаш учун ўзида 2–4 мкг фосфат (0,1–0,2мл) тутган гидролизат аликвотидан иссиқликка чидамли бўлган пробиркага солинади, устига 0,5 мл 57 % ли HClO₄ дан солинади

ва минералланиши учун 100°C температурада сув учиради, ундан кейин 200°C температурада 8–10 соат давомида органик моддалар куйдирилади. Ортофосфатнинг миқдори Пануш усули билан аниқланади.

Гидролизатдаги этаноламиннинг миқдори амин азоти миқдори бўйича нингидрин билан аниқланади. Гидролизатдаги холин миқдори қуйида келтириладиган усул билан аниқланади.

Липид таркибидаги ҳамма компонентлар (глицерин, ёр кислоталари, фосфор, этаноламин ёки холин) аниқлангандан кейин бу компонентлар микромолга ҳисоб қилинади ва текшириладиган липиддаги уларнинг нисбати ҳисобланади.

Глицеринни аниқлаш.

Методнинг моҳияти: Перйоднатрий тузи глицерин молекуласидаги биринчи спиртли группаларни формальдегидгача оксидлайди. Бу бирикма эса хромотроп кислоталар билан бўялган бирикма ҳосил қилади.

Реактивлар: 1. 0,1 Н перйод натрий (Na IO_4), 2. 10 н H_2SO_4 , 3. 10 % ли Na HSO_4 ёки 9,2 % ли $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$. 4. Хромотроп кислота эритмаси (1 г хромотроп кислота 100 мл H_2O да эритилади, унинг устига 450 мл 24 н H_2SO_4 солинади, яхшилаб аралаштирилади ва 2 хафтагача қора идишда сақланади.) 5. Тиомочевина эритмаси. (4,59 г тиомочевина 100 мл сувда эритилади).

Аниқлаш йўли: Орзи эич беркиладиган пробиркага текшириладиган глицерин эритмасидан 2мл солинади, устига 0,1 мл 10н H_2SO_4 , 0,5 мл 0,1н перйод натрий эритмасидан солинади, кейин яхшилаб аралаштирилади ва 5 минут хона температурасида ушланади. Аралашмага 0,5 мл 10 % ли бисульфат натрийдан қўшилади ва аралаштирилади. Кейин бу эритмадан 1 мл олиниб, қуруқ пробиркага солинади, унинг устига 5 мл хромотроп кислотадан солинади, 30 мин. қайнатилади. Аралашма совитилади ва 0,5 мл тиомочевина эритмасидан солинади.

Тиомочевина эритмаси солингандан кейин аралашма рангсизланади. Шундан кейин 570 н м тўлқин узунлиги остида контролга нисбатан нур ютиш даражаси ўлчанади.

Колибрлаш эгри чизиғи глицериннинг стандарт эритмаси бўйича тузилади. Бу методнинг сезгирлиги 5–50 мк г. бўлади.

Хромотроп кислоталарни тозалаш

10 гр хромотроп кислота 100 мл сувда эритилади ва эрмай қолган қисмидан тозалаш учун филтрланади, 10 мл қолгунча буғлантирилади ва 250 мл этанол қўшилади. Кислотанинг кристаллари филтрланиб олинади ва қуритилади.

Холинни аниқлаш

Реактивлар: 1. 15,7 г кристалл ҳолдаги йод ва 20 г калий йодид 100 мл сувда доимий аралаштириб турилган ҳолда эритилади. Аралашма 40°C температурада сақланади. 2. Дихлорэтан 0,2 М K_2CO_3 эритмаси билан аралаштирилади, $CaCl_2$ билан қурилади ва филтрланади. 3. 0,07–0,6 мкМ хлоргидрат холин эритмаси.

Липидлар гидролизатидан ёғ кислоталари олиб ташлангандан кейин, 1–2 мл суви фазасидан (10–70 мкг холин) олиниб, центрифуга пробиркасига солинади. Унинг устига 1 томчи 1 н HCl солинади ва эритма азот ёрдамида буғлантиради. Қолган қисмига 0,5 мл сув солиниб, яхшилаб аралаштирилади, унинг устига 0,2 мл 1–реактивдан солинади ва яна аралаштирилади. Сув хаммомида 20 минут давомида қайнатилади. Совитилиб, 15 минут давомида 5000 об/мин остида 0°C температурада центрифугаланади. Супернатант олиб ташланади. Перйодит холиннинг кристаллари 10 мл дихлорэтанга эритилади. Нур ютиши 365 нм да ўлчанади. Колибрлаш эгри чизиги холиннинг стандарт эритмаси бўйича тузилади.

ҲОЙДАЛАНИЛГАН АДАБИЁТЛАР РҲЙҲАТИ

1. Дэвини Т., Гергей Я. «Аминокислоты, пептиды и белки» М., «Мир», 1976.
2. «Малый практикум по биохимии». М., Изд – во МГУ, 1979.
3. Гааль Э., Медьеша Г., Верецкей Л. «Электрофорез в разделении биологических макромолекул» М., «Мир», 1982.
4. Уильямс Б., Уилсон К. «Методы практической биохимии». М., «Мир», 1978.
5. Плещков Б.П., «Практикум по биохимии растений» М., «Колос», 1976.
6. Филипович Ф.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. «Практикум по общей биохимии», М., «Просвещение», 1982.
7. Мусил Я., Новакова О., Кунц К., «Современная биохимия в схемах», М., «Мир», 1981.
8. Грин Н., Стаут У., Тейлор Д. «Биология» в 3–х томах, М., «Мир», 1990.
9. Тўрақулов Ё.Х. «Молекуляр биология». Т., «Ўқитувчи», 1993.
10. Ленинджер А. «Основы биохимии» в 3–х томах, М., «Мир», 1985.
11. Страйер Л. Биохимия. М., «Мир» 1984.
12. Бреслер С.Я. Введение в молекулярную биологию. Наука, 1985.
13. Кейте М. Техника липидологии. М., «Мир», 1970.
14. Берильсон Л.Д., Дятловицкая Э.В. и др. Препаративная биохимия липидов. М., Наука, 1981.

МУНДАРИЖА

Оқсиллар	3 бет
Оқсилларнинг хоссалари	8 бет
Оқсилларни ажратиш ва тозалаш	10 бет
Ҳужайра оқсиллини ажратиш	11 бет
Оқсилларни қисман тозалаш	12 бет
Оқсилларни $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ёрдамида чўктириш	13 бет
Гель – фильтрация	15 бет
Қон зардобини гель – фильтрация услуги бўйича фракцияларга ажратиш.	19 бет
Оқсил эритмаларини тузсизлантириш.	21 бет
Сефадекс ёрдамида оқсил эритмаларини қуюлтириш.	22 бет
Ион алмашинув хроматографияси.	22 бет
Қон зардоби оқсиллини ион алмашинув хроматографияси ёрдамида фракцияларга ажратиш.	23 бет
Электрофорез.	27 бет
Диск – электрофорез.	3 бет
Оқсилни миқдорий жиҳатдан аниқлаш усуллари.	36 бет
Лоури услуги.	38 бет
Углеводлар	40 бет
Углеводлар таркибини қоғоздаги хроматография усули билан аниқлаш	44 бет
Моносахаридларни миқдорий аниқлаш методлари	51 бет
Оксидланиш йўли билан олиб бориладиган методлар. Вознисенский методи.	51 бет
Хогедорн – Иенсен методи	57 бет
Липидлар	57 бет
Липидларнибиологик материаллардан ажратиб олиш.	59 бет
Материални ва эритувчини тайёрлаш.	63 бет
Липидларни экстракция қилиш.	61 бет
Липидларни қуритиш.	61 бет
Липидларни тухум саригидан ажратиб олиш.	62 бет
Липидларни юрак мускулидан ёки жигардан ажратиб олиш.	62 бет
Липидларни миқдорий аниқлаш усуллари	63 бет
Липидларни колориметрик метод билан аниқлаш.	63 бет
Ёғ кислоталарини аниқлаш.	64 бет
Либерман – Бухардт методи бўйича стеролларни аниқлаш. Стеролларни темир хлорид билан борадиган реакция ёрдамида аниқлаш.	65 бет
Липидларни йод сонини аниқлаш.	66 бет
Липидларни фракциялаш. Липидларни колонкада	

ажратиш.	67 бет
Липидларни юпқа қаватли хроматографияси.	69 бет
Хроматография пластинкаларини тайёрлаш.	71 бет
Хроматография ўтказиш.	72 бет
Нейтрал липидларни хроматографияси.	73 бет
Липидларни препаратив юпқа қаватли хроматографияси.	74 бет
Универсиал реагент.	75 бет
Стерооларни аниқлаш.	76 бет
Аминогруппа тутган липидларни аниқлаш.	76 бет
Гликолипидларни аниқлаш.	76 бет
Ганглиозитларни аниқлаш.	77 бет
Спирт ва углеводларни аниқлаш.	77 бет
Холинни товиш.	78 бет
Ажратилган липидларнинг характеристикаси.	
Липидларнинг ишқорий гидролизи.	83 бет
Фойдаланилган адабиётлар рўйхати.	86 бет
Мундарижа	87 бет

Босишга рухсат этилди 20.06.2003. Ҳажми 5,5 босма табоқ.
 Бичими 60×84 1/16. Адади 250 нусха. Буюртма 136
 М.У.Ўзбек номидаги Ўзбекистон Миллий Университети
 босмахонасида чоп этилди.