

## **2-Laboratoriya ishi**

### **XROMATOGRAFIK ANALIZ USULLAR**

Moddalarni tozalash, ularni bir–biridan ajratish va aniqlash usullaridan biri xromatografik analizdir.

Xromatografik analizni 1903 yilda mashhur rus olimi M.S.Svet (1872—1919) kashf etgan. Bu usulni hozirgi zamon kimyosida qo‘llanib kelinayotgan eng ko‘zga ko‘ringan metodlari bilan bir qatarga qo‘yish mumkin.

Ma’lumki, fiziologik faol moddalar ko‘pincha aralashma holida bo‘ladi, ularni bir–biridan ajratish va tozalashda ancha qiyinchiliklarga duch kelinadi. Bunday hollarda xromatografiya usulidan foydalanib yaxshi natijalarga erishish mumkin. Masalan, o‘simlik va hayvon organizmida juda kam miqdorda uchraydigan turli moddalar: aminokislotalar, oqsillar, peptidlar, nuklein kislotalar, uglevodlar, oligosaxaridlar, polisaxaridlarga va boshqalarni ajratib olishda xromatografiya usulidan foydalaniladi.

Shunday qilib, M.S.Svet tomonidan kashf qilingan bu usulning har xil turlari hozirgi vaqtda laboratoriyada va sanoatda organik moddalarni bir–biridan ajratish va tozalashda keng ko‘lamda qo‘llanilmoqda.

Haydash usulida moddalarni qaynash temperaturalari orasidagi farqdan, ekstraksiyada moddalarning har xil eruvchanligidan foydalanib ajratib olinadigan bo‘lsa, xromatografiya usulida esa aralashma holidagi moddalarning adsorbent yuzasiga yutilishi va ishlatilayotgan erituvchida moddalarning surilishi turlicha bo‘lishidan foydalaniladi.

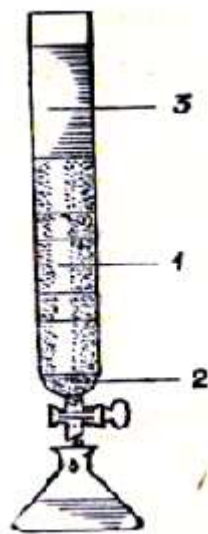
Xromatografik analiz asosan uch turga bo‘linadi:

- 1) Adsorbsion xromatografiya.
- 2) Ionalmashinish xromatografiyasi.
- 3) Taqsimlash xromatografiyasi.

### **ADSORBSION XROMATOGRAFIYA**

Bu usul bilan moddalarni aralashmalardan ajratish va tozalash, ularning adsorbent yuzasida adsorbsiyalanish va erituvchi bilan desorbsiyalanish protsesslari turlicha bo‘lishiga asoslangan.

Adsorbsion xromatografiya maxsus xromatografik kolonkalarda olib boriladi. Xromatografik kolonka sifatida (tozalanishi kerak bo'lgan moddaning miqdoriga qarab) turli o'lchamdagi shisha naylar ishlatiladi (9– rasm).



**9– rasm. Xromatografik kolonka. 1– adsorbent, 2– paxta, 3– erituvchi.**

Kolonkaning tubiga ozroq paxta joylashtirilib, vertikal holatda shtativga o'rnatiladi. So'ngra xromatografik kolonkaning  $\frac{2}{3}$  yoki  $\frac{3}{4}$  qismi bir xil o'lchamdagi ma'lum adsorbent bilan to'ldiriladi. Xromatografiyada adsorbent sifatida, asosan, alyuminiy oksid, silikagel, gilmoya kukuni, sellyuloza, poliamid va boshqalar ishlatiladi. Moddalarni xromatografik kolonkalarda ajratishda ko'pincha maxsus «Xromatografiya uchun» deb belgilangan turli markadagi alyuminiy oksid va silikagellardan foydalaniladi. Bu adsorbentlarni ishlatishdan oldin teshiklari 0,25 mm o'lchamdagi elakdan o'tkazib olinadi. Kolbaga adsorbent va xromatografiya uchun tanlangan erituvchidan solib, yaxshilab chayqatiladi. So'ngra hosil qilingan alyuminiy oksid suspenziyasi kolonkaga oz–ozdan quyiladi va adsorbentni yaxshi joylashtirish uchun kolonka vaqti–vaqti bilan yo'g'on bir bo'lak vakuum rezina bilan urib turiladi. Kolonka devoriga yopishib qolgan adsorbent esa erituvchi bilan yuvib tushiriladi. Kolonka shu tarzda adsorbent bilan to'ldirilgandan so'ng tozalanishi lozim bo'lgan aralashma eritma holida yoki alyuminiy oksid bilan aralashgan holda kolonkaga asta–sekin solinadi, kolonka erituvchi bilan yuviladi. Kolonkadan erituvchining oqib o'tish tezligi jo'mrak yordamida boshqarib turiladi. Bunda kolonkadan oqayotgan erituvchining tezligi minutiga 30 – 40 tomchidan

o'shmashligi kerak. Yuvilish natijasida moddalar adsorbent ustuni – xromatografik kolonkaning yuqori qismidan pastga surilib, moddalar aralashmasi bir–biridan ajralib, halqalar hosil qila boshlaydi. Shu tarzda moddalar oldinma–keyin erituvchi bilan birga yuvilib tushadi. Yuvilib tushayotgan moddalar eritmasi fraksiyalarga bo‘lib yig‘iladi va har qaysi fraksiya alohida–alohida tekshiriladi. Agar xromatografiya uchun ishlatilayotgan moddalar eritmasi erituvchi kolonkada qolgan moddani yuvib chiqara olmay qolsa, u holda elyutrop qatorida bu erituvchidan keyin kelgan erituvchi qo‘llaniladi. Quyidagi jadvalda erituvchilar adsorbentga adsorbsiyalangan (yutilgan) moddalarni yuvib chiqarish xususiyatiga qarab oldinma–ketin bir qatorga joylashtirilgan. Bu erituvchilarning elyutrop qatori deyiladi (2.1.1-jadval). Eng kuchli adsorbsiyalangan moddalar ko‘pincha etil yoki metil spirt bilan yuvib olinadi.

### 2.1.1–jadval

#### Erituvchilarning elyutrop qatori

Petroley efir	Xloroform	Etil spirt
Siklogeksan	Etil efir	Metil spirt
Uglerod sulfid	Tetragidrofuran	Suv
Uglerod (IV)–xlorid	Etilatsetat	Sirka kislota
Dixloretilen	Atseton	Piridi
Benzol	Metiletilketon	
	n–Butil spirt	

Agar xromatografiya qilinayotgan aralashma rangli moddalardan iborat bo‘lsa, tanlangan erituvchida yuvilganda kolonkada turli balandlikda har xil rangli halqalar hosil qiladi. Shuning uchun bunday hollarda yana erituvchi bilan yuvish to‘xtatilib, kolonkaning rangli halqalar hosil qilgan qismlari kesgich bilan kesib olinadi yoki ehtiyotlik bilan tushirib olinadi.

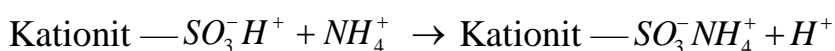
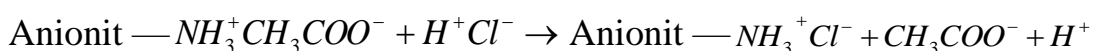
## IONALMASHISH XROMATOGRAFIYASI

Komponentlarning dissotsiatsiyalanish darajasini bir xilda bo‘lmasligi va ionalmashuvchi bilan moddalarning ionlari orasidagi bog‘lanishni turlicha

bo'lishidan foydalanib ionalmashuvchi smolalar yordamida ham ba'zi aralash moddalarni bir-biridan ajratiladi.

Ionalmashish xromatografiyasi tekshirilayotgan aralashma, ya'ni eritilgan moddaning ionlari bilan adsorbentda adsorbsiyalangan ionlar orasida yuz beradigan reaksiyaga asoslangandir.

Ionalmashuvchi smolalar (ionitlar) yuqori molekulali organik birikmalar bo'lib, asosli (tarkibida  $\text{—NH}_2$ ,  $\text{—NH}$ ,  $\text{—N}$  bo'lgan) yoki kislotali (tarkibida  $\text{—SO}_3\text{H}$ ,  $\text{—COOH}$ ,  $\text{—CN}$  bo'lgan) xususiyatga egadirlar. Asos xossasiga ega bo'lgan va eritmada bo'lgan anionni biriktiruvchi ionalmashuvchi smolalarga anionitlar, kislota xususiyatiga ega bo'lgan va eritmadagi kationlarni biriktiruvchi smolalarga kation-almashuvchi smolalar yoki kationitlar deyiladi. Ionalmashish protsessini qisqacha quyidagicha ko'rsatish mumkin:



Ionitlar ishlatilishidan oldin, ular ma'lum darajagacha maydalanib, distillangan suv bilan bo'ktirib qo'yiladi, so'ngra aralashmalardan yuvib tozalanadi. Buning uchun ionitlarni kislota, ishqor yoki tuz eritmalari bilan ishlanadi. Shunday qilib, ionitlar aralashmalardan tozalangach, kislota yoki ishqor bilan ishlanib kislotali ionit  $\text{—H}$  yoki ishqoriy ionit  $\text{—OH}$  formada olinadi.

### QOG'OZ XROMATOGRAFIYASI

Qog'oz xromatografiyasi ham yupqa qatlam xromatografiyaning bir ko'rinishi bo'lib, u ko'p hollarda oqsillar, uglevodlar, yog'lar, antibiotiklar, gormonlar va boshqa tabiiy moddalarni ajratish va aniqlashda keng qo'llaniladi. Bu usulda sorbent, yani qog'ozalmas faza sifatida maxsus tayyorlangan, g'ovaklarida suvni tutib turadigan gidrofil va organik suyuqliklarni tutib turadigan gidrofob qog'ozlar qo'llaniladi. Harakatchan faza sifatida suv va suv bilan aralashadigan erituvchilar yoki erituvchilar aralashmasi ishlatiladi. Tekshiriladigan eritmadagi moddalarni

ajralish darajasi qog'oz bilan erituvchi orasida ularning taqsimlanish koeffitsiyentiga bog'liq.

Qog'oz xromatografiyasida yuqoriga ko'tariluvchi elyuirlashdan tashqari pastga tushuvchi va radial xromatografiyalash usullari ham ko'p qo'llaniladi.

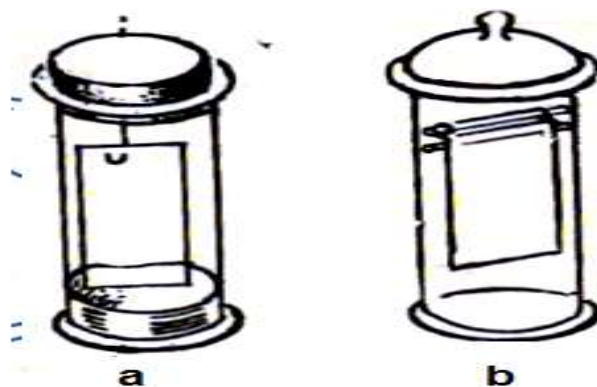
Takroriy tahlillarda  $R_f$  qiymatni bir xil natijalar olish uchun xromatografiya o'tkazish sharoiti (elyuent–eritmalar sistemasining tarkibi, harorat, plastinka yoki qog'ozning sifati, jarayonning borish vaqti, kameraning germetiklik darajasi va boshqalar) bir xil bo'lishi kerak.

Yuqoriga ko'tariluvchi va pastga tushuvchi qog'oz xromatografiyasida tekshirilayotgan moddalar eritmasi shisha kapillyar yoki pipetka yordamida qog'oz chetidan 2–3 sm yuqorida, radial xromatografiyada esa qog'oz markazidagi qog'oz pilikdan 1,5–2 sm masofada bir–birdan ma'lum oraliqlar qoldirib, bir necha tomchidan tomiziladi. Qog'oz namuna bilan quritiladi va maxsus kameralardagi erituvchi sistemasiga modda tomizilgan tomchilar hosil qilgan dog'lar tegmaydigan qilib joylashtiriladi. Yuqoriga ko'tariluvchi va pastga tushuvchi xromatografiyalashlarda kamera devorlariga uni to'yintirish uchun erituvchi sistemasi shimdirilgan qog'oz tikka qilib qo'yiladi.

Yuqoriga ko'tariluvchi elyuirlashda erituvchining yuqoriga ko'tarilishi qiyinroq bo'lganligi sababli  $R_f$  qiymati kichik moddalarni ajratish qiyin bo'ladi.

Pastga tushuvchi elyuirlashda kameraning yuqori qismiga o'rnatilgan idishdagi erituvchi qog'oz bo'ylab yuqoridan pastga siljiydi, bu ancha tez amalga oshadi. Bunda eng asosiy jarayon, erituvchi qog'ozdan pastga oqib tushishi hisobiga  $R_f$  qiymati kichik bo'lgan moddalarni ham ajratish mumkin. Bunday usulning kamchiligi xromatografiyalash qurilmasining murakkabligidir.

Taqsimlanish xromatografiyasining bu turi murakkab moddalarni, ayniqsa oqsillar, uglevodlar, yog'lar, antibiotiklar, garmonlar, glyukozidlar, alkaloidlar va boshqa tabiiy moddalarni analiz qilishda keng qo'llaniladi. Bu xromatografiya uchun maxsus filtr qog'ozlar ishlatiladi.

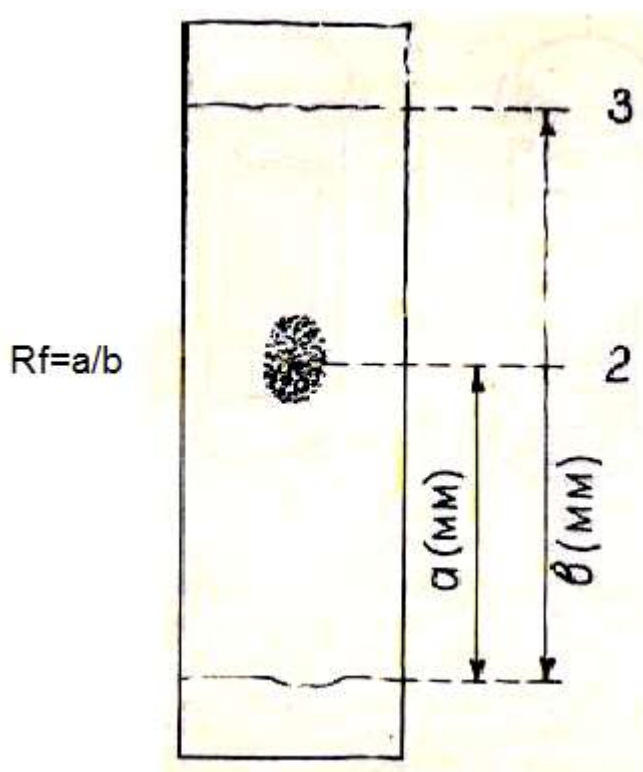


**10 – rasm. Qog‘oz xromatografiyasi uchun ishlatiladigan asboblari: a– yuqoriga suriluvchi xromatografiya uchun, b– pastga suriluvchi xromatografiya uchun.**

Qog‘oz xromatografiyasida, qog‘oz adsorbent vazifasini bajaradi. Oldindan suv bilan to‘yintirilgan erituvchilar yoki erituvchilar aralashmasi ham suriluvchi faza hisoblanadi. Qog‘oz xromatografiyasini erituvchining yo‘nalishiga qarab yuqoriga suriluvchi (a), pastga suriluvchi (b) (10–rasm), ikki tomonlama hamda gorizontaal – aylanma xromatografiya kabi har xil turlari mavjud. Quyida biz amalda keng qo‘llaniladigan yuqoriga suriluvchi qog‘oz xromatografiyasining ish texnikasi bilan tanishib chiqamiz. Maxsus xromatografik qog‘ozni xromatografiya uchun ishlatiladigan silindrning diametridan bir oz kichik, uzunligi 40 – 60 sm oralig‘ida qirqib olinadi va qog‘ozning pastki qismidan 2 – 4 sm yuqorida qalam bilan gorizontaal chiziq o‘tkaziladi. So‘ngra qog‘ozdagi bu chiziqqa (2 – 2,5 sm oraliqda) tekshirilayotgan aralashmaning eritmalaridan va shu aralashmada bo‘lishi taxmin qilingan aniq toza moddalar eritmasidan kichkina shisha kapillyar yordamida bir necha tomchi tomiziladi. Qog‘oz quritilib, ichida erituvchilar sistemasini bo‘lgan maxsus xromatografiya uchun ishlatiladigan silindrga tushirilib, qog‘oz silindr devorlariga tegmaydigan qilib shisha ilgichga osib qo‘yiladi. Qog‘ozning moddalar aralashmasi tomizilgan dog‘lardan pastroq qismi erituvchilar sistemasiga tegib, erituvchi qog‘ozga shimiladi va ma’lum balandlikka ko‘tarilgach, xromatogramma kameradan olinadi va erituvchi yetib borgan yuqori chegara belgilanadi. Shundan keyin, qog‘oz quritilib, pulverizator yordamida maxsus tanlab olingan rang beruvchi moddalar bilan ishlanadi. Buning natijasida xromatografik qog‘ozda har xil rangli dog‘lar hosil bo‘ladi. Bu dog‘lar xromatogramma deb ataladi (11–rasm).

Xromatogrammada hosil bo'lgan dog'larni tezda qalam bilan doira shaklida belgilab olish kerak, chunki bu dog'lar vaqt o'tishi bilan yo'qolishi mumkin. Tekshirilayotgan toza modda yoki moddalar aralashmasini hosil bo'lgan xromatogrammada identifikatsiyalash uchun shu moddalar uchun ishlatiladigan erituvchilar sistemasidagi taqsimlanish koeffitsiyenti ( $R_f$ ) dan foydalaniladi (11-rasm).  $R_f$  quyidagi formula asosida hisoblanadi. Bunda:  $a$  – modda tomizilgan nuqta (start) dan dog' markazigacha bo'lgan masofa,  $b$  – start chizig'idan erituvchi chegarasigacha bo'lgan masofa.

Ma'lum bir erituvchilar sistemasida aniqlangan  $R_f$  ning qiymati qaysi moddaga to'g'ri kelishi toza moddalar uchun tuzilgan ma'lum jadvalga solishtirib topiladi. Lekin  $R_f$  ning qog'ozning turiga, tomizilgan moddaning miqdoriga va boshqa omillarga bog'liq.



11-rasm. Qog'oz xromatogramma: 1–start chizig'i. 2– modda dog'i. 3– front chizig'i.

**Aminokislotalarni qog'oz xromatografiyasi usulida aniqlash**

Tekshirilayotgan aminakislotalar aralashmasining spirtli eritmasidan va «guvoh» moddalar – valin, glitsin, fenilalaninlarning ham spirtli eritmalaridan xromatografik qog‘ozning start chizig‘iga bir necha tomchidan ( yuqorida bayon qilingan usulda ) tomizilib, so‘ng quritiladi va n–butanol – suv – sirka kislota ( 4 : 5 : 1) dan iborat erituvchilar sistemasida solingan maxsus silindrga tushiriladi. 15 – 18 soatdan so‘ng xromatografik qog‘oz silindrdan olinib, qalam bilan front chizig‘i belgilanadi va xromatogramma mo‘rili shkafda yoki maxsus quritish kamerasida quritiladi. So‘ngra xromatogrammaga pulverizator bilan xningidrinning spirtli eritmasi sepiladi va bir soat davomida qorong‘i joyda yoki 5 – 10 minut 100 °S temperaturadagi quritkich shkafda quritiladi. Natijada xromatografik qog‘ozda binafsha rangli dog‘lar hosil bo‘ladi. Tekshirilayotgan aminakislotalar eritmasidan xromatogrammada hosil bo‘lgan dog‘larning taqsimlanish koeffitsiyenti hisoblanib, guvoh moddalar – valin, glitsin va fenilalaninlarning taqsimlanish koeffitsiyenti ( $R_f$ ) bilan solishtiriladi. Bu aminakislotalarni – n –butanol – suv – sirka kislota (4:5:1) sistemasidagi taqsimlanish koeffitsiyenti  $R_f$  : glitsin – 0,13, valin 0,36 va fenilalanin uchun 0,46 ga teng.

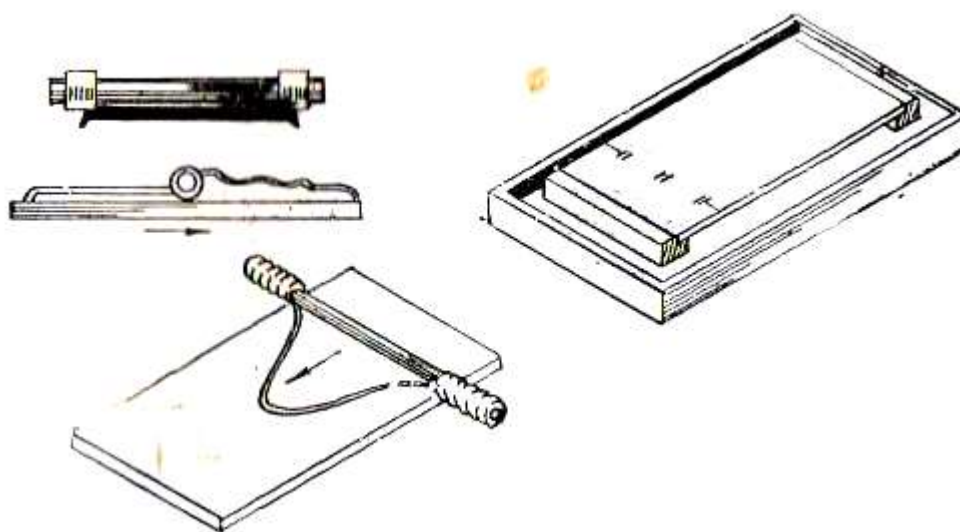
### **YUPQA QAVATDA XROMATOGRAFIYALASH**

Hozirgi vaqtda sintetik, hamda tabiiy moddalarni analiz qilishda xromatografiyaning ancha qo‘lay va tez bajariladigan turlaridan biri yupqa qavatda xromatografiyalash keng qo‘llaniladi. Bu usulda xromatografiyalashning afzalligi shundan iboratki, bunda kimyoviy reaksiyalarning borishini kontrol qilish, kolonka yordamida ajratilayotgan murakkab aralashmalarni ayrim komponentlarga ajralishini kuzatish va xromatografik plastinkalarni tezda tayyorlab, moddalarni tezroq identifikatsiyalash mumkin. Moddalarni yupqa qavatda bir marta xromatografiyalash uchun 10 – 30 minut vaqt sarf bo‘ladi, xolos.

Bu xromatografiyaning ish texnikasi dastlab turli o‘lchamdagi ( 8x15, 10x20 va hakazo shisha plastinkalarda yupqa adsorbentning qatlami hosil qilishdan boshlanadi. Buning uchun shisha plastinkaning ustida adsorbentlardan (alyuminiy oksid, silikagel va hokazo) birini olib, uning ustidan maxsus yupqa qatlam hosil qiluvchi asbob yurgiziladi (12 – rasm) . So‘ngra tekshiriladigan modda eritmasidan



yupqa qatlam hosil qilingan plastinkaga bir necha tomchi shisha kapillyar orqali tomiziladi va plastinka maxsus erituvchilar sistemasi solingan eksikatorga tushiriladi. Erituvchi plastinkadagi adsorbentning barcha yuzasiga shimilgandan so'ng, xromatogramma eksikatoridan olinadi va quritilib, yod bug'lari bilan yoki boshqa rang beruvchi modda eritmalari bilan ishlanadi. Bu usulda tayyorlangan yupqa qatlam shisha yuzasida yopishmagan yupqa qatlamli xromatografiya deyiladi. Bunday yupqa qatlamli xromatogramma tezda buziladi. Shuning uchun ko'pincha shisha yuzasida adsorbent mustahkam yopishgan yupqa qavatli xromatografiyadan foydalaniladi.



**12–Rasm. Xromatografiyalash uchun oyna yuzasida adsorbentdan yupqa qatlam tayyorlash.**

Bunday yopishgan yupqa qavatli plastinkalar tayyorlash uchun 5 % gips qo'shilgan adsorbentning suvli suspenziyasi hosil qilinib, maxsus katok yordamida yupqa qavat hosil qilinadi. Tayyorlangan yupqa qavat shisha yuzasiga yaxshi yopishgan bo'lib, uni har qanday yo'nalishda bir tomonlama yoki ikki tomonlama xromatografiyalashda ishlatish mumkin. Ko'pincha bu usul bilan bir necha plastinkalar tayyorlanib, bular alohida eksikatorlarda saqlanadi. Yupqa qatlamda xromatografiyalash bilan moddalarni faqat identifikatsiyalash emas, balki aralashmadan kamroq miqdorda toza individual modda ajratib olish ham mumkin.

Gidrolizat tarkibidagi aminokislotalar aralashmasini ajratish va ayrim aminokislotalarning sifat va miqdorini aniqlashda qog'ozda o'tkaziladigan taqsimlovchi xromatografiya usuli keng qo'llaniladi. Bu usul M.S.Svetning 1903 yilda taklif qilgan xromatografiya analizining o'zgartirilgan ko'rinishidir.

Aminokislotalarni ajratish ularni ikkita aralashmaydigan eritmada (biri suv, ikkinchisi suv bilan to'yintirilgan organik eritma) erish xususiyatini aniqlash orqali amalga oshiriladi. Hozirgi vaqtda xromatografiya usulining quyidagi xillari mavjud: adsorbsion usul aminokislotalarning turli adsorbentlarda adsorbsiyalanishiga bog'liq; ion almashtiruvchi xromatografiya usuli aminokislotalarning zaryadiga qarab kationit yoki anionitlardan foydalaniladi. Afin xromatografiya – xususiyligini bog'lanish holatiga ega bo'lgan fermentlar, immunoglobulinlar, retseptor va gormonlardan foydalanib tegishli birikmalar ajratiladi.

Ushbu usul mahsus tayyorlangan xromatografiya – filtr qog'ozida o'tkaziladi. Namlangan kameraga joylashtirilgan xromatografiya qog'ozida 20-22% suvni ushlab qolish xususiyatiga ega. Demak, suv harakatlanmaydigan faza, chunki u qog'ozga shimilgan, harakatlanuvchi faza sifatida organik erituvchilardan foydalaniladi. Ularga suv bilan to'yintirilgan izopropil, izobutil, butil spirtlari, fenol va boshqalar kiradi. Xromatografiya qog'oziga bir tomchi aminokislota aralashmasidan tomiziladi, qog'ozning ikkinchi uchi tegishli organik erituvchiga tushiriladi. Erituvchi qog'oz bo'lakchasi bo'ylab shimila boshlaydi va erigan aminokislota o'zi bilan birga yo'naltiradi. Aminokislotalarning qog'oz bo'lakchasidagi harakatlanish tezligi uning eruvchanligiga bog'liq. Aminokislota suvda qancha yaxshi erisa, organik erituvchida shuncha yomon eriydi va organik erituvchiga nisbatan harakatlanish tezligi sust bo'ladi. Shu yo'l bilan aminokislotalar turli masofada taqsimlanadi.

Aminokislotalarni xromatografiya qog'ozida harakatlanishiga qarab; yuqoriga, pastga va doira bo'ylab harakatlanuvchi xromatografiya turlari tafovut qilinadi.

Aminokislotalarning xromatografiya qog'ozida taqsimlanish masofalari  $\alpha$ -aminokislotalar uchun o'tkaziladigan ningidrin reaksiyasi yordamida aniqlanadi.

Aralashmadagi muayyan aminokislotalarni aniqlash uchun xromatografiya qog'oziga guvoh aminokislotalar tomiziladi va shu aminokislotalarning masofasiga ko'ra tegishli aminokislota taqsimlanish koeffitsienti  $R_f$  ga ko'ra aniqlanishi mumkin.

$R_f = a/b$ . Bunda  $a$ -aminokislotalarning tomizilgan joydan o'tgan masofasi,  $b$  – eritmaning o'tgan masofasi. Masofalar mm da o'lchanadi.

Koeffitsient  $R_f$  har qanday aminokislota uchun tajriba o'tkazilayotgan sharoitda xususiy kattalikdir.

**Tekshiriluvchi material:** gidrolizlangan aminokislota aralashmasi.

**Reaktivlar:** tirozinning 0,4% li eritmasi, glutamin kislotaning 0,6% li eritmasi, leysinning 0,5% li eritmasi, ningidrinning atsetondagi 0,2% li eritmasi va yuqoridagi aminokislotalar aralashmasi, erituvchi sistemalari 15:15:10 nisbatda olingan butil spirti, sirka kislota va suv aralashmasi.

**Kerakli anjomlar:** xromatografiya filtr qog'oz, Petri kosachasi, xromatogrammalarni ilish uchun moslama, purkagich, 105°C li quritgich shkaf, qaychi, skalpellar, shisha tomizgichlar, qalin nina.

**Bajariladigan ish tartibi.** Xromatografiya usuli bilan aminokislotalarni ajratish uchun ishlatiladigan kameralar 10-rasmda keltirilgan (yuqoriga, pastga va aylana harakatlanadigan aminokislotalar xromatografiyasi).

Pastga (a) va yuqoriga (b) yo'naltirilgan xromatografiya kameralari (10-rasm).

1. Xromatografiya filtr qog'ozidan 11x11 sm li to'rtburchaklar yasaladi. To'rtburchak oddiy qora qalam bilan to'rt qismga bo'linadi. Chiziqlar kesishgan nuqtadan radiusi 10 mm bo'lgan aylana chiziladi. To'rtburchakning tomonlari tartib raqamlari bilan belgilanadi. Shundan so'ng xromatografiya qog'ozini Petri kosachasiga (10-rasmdagi kabi) o'rnatiladi. Uning chetlari Petri kosachasining ustida bo'lishi kerak.

2. Har qaysi bo'linmaga ingichka tomizgich yordamida sinama aminokislota va ularning aralashmasi ehtiyotlik bilan tomiziladi (17-rasm). Erituvchilarning shimilishi uchun xromatografiya qog'ozining o'rtasidagi teshikchaga filtr ustunchasi o'rnatiladi. Xromatografiya kameraga shu teshikcha orqali qalin nina bilan 10-15ml erituvchi solinadi. Idishning tubi erituvchi bilan to'ldirilgan bo'lishi

kerak. Kamera qopqoq bilan berkitiladi. Filtr orqali erituvchi sekin-asta xromatografiya qog'ozining yuqorisiga qarab yo'naladi. Erituvchi xromatogramma chegarasiga yaqinlashganda jarayon tugatiladi, erituvchi yetgan chegara qalam bilan belgilanadi. Shundan keyin xromatogramma maxsus moslamaga joylashtirilib, 100-120°C li quritilgich shkafda quritiladi, shunda ajratilgan aminokislotalar qog'ozga o'rnatiladi. Quritish jarayoni 5-10 daqiqa, ya'ni erituvchining hidi atrofga tarqalguncha davom ettiriladi. Quritilgan xromatogramma aminokislotalarni aniqlash uchun ningidrin eritmasi purkaladi va yana quritiladi. Natijada aminokislotalar o'rnatilgan joyda bog' hosil bo'ladi (21-rasm).

3. Har qaysi aminokislotalarning «Rf» si topiladi va sinama aminokislotalar bilan aralashmadagi aminokislotalar solishtiriladi (22-rasm)..

**Olingan natijalarni rasmiylashtirish.** Xromatografiya usulining asoslanishini, turini hamda olingan natijalarni daftarga yozib, tegishli xulosa chiqaring. Aminokislotalarni aniqlashning ahamiyatini eslab qoling.

#### ***Quyidagi savollarga javob bering***

1. Hayvon va odam oqsillariga aminokislotalar misol bo'ladi?
2. Oqsil molekulasidagi aminokislotalar qanday bog' bilan bog'langan?
3.  $\alpha$ -aminokislotalar qanday reaksiya bilan ochiladi? Ushbu reaksiyaning asosi va kimyoviy tenglamasi qanday?
4. Oqsillarga o'tkaziladigan rangli reaksiyalar nimaga asoslangan?
5. Aromatik aminokislotalar qanday reaksiya bilan ochiladi? Uning asosi va kimyoviy tenglamasi qanday?
6. Kuchsiz va mustahkam bog'langan oltingugurt tutuvchi aminokislotalar qanday reaksiya bilan ochiladi? Uning ahamiyati va kimyoviy tenglamasi qanday?
7. Oqsil gidrolizi nima? Oqsil gidrolizi uchun qanday sharoitlar kerak? Oqsil gidrolizining sxemasini tuzing?
8. Oqsil gidrolizatidagi aminokislotalar aralashmasi qaysi usul bilan ajratiladi? Usulning ahamiyati qanday? Usulning turlarini ayting?