

**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ ОЛИЙ ВА ЎРТА
МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ
НИЗОМИЙ НОМИДАГИ ТОШКЕНТ ДАВЛАТ
ПЕДАГОГИКА УНИВЕРСИТЕТИ**

**П. МИРҲАМИДОВА, А. ЗИКИРЯЕВ,
С.Н.ДОЛИМОВА**

БИОКИМЁ

Амалий машғулотлар

**Тошкент
“Университет”
2002 .**

Ушбу қўлланма университетлар ва педагогика институтларининг биология факультети ва Фармацевтика институтининг агробиотехнология факультети талабалари учун ёзилган. Бу китобда биокимёдан амалий машғулотлар ўтказиш хусусидаги билимлар жамланган.

Қўлланмада келтирилган кўпгина методлардан талабалар илмий-тадқиқот ишларида ҳам фойдаланишлари мумкин.

Тақризчилар: биология фанлари доктори,
проф. ЎзРФА академиги Т.С.Соатов,
биология фанлари доктори,
проф. М.Н.Валиханов.

**ПАРИДА МИРХАМИДОВА,
АБДУКАРИМ ЗИКИРЯЕВ,
СУРАЙЁ НЎЪМАНОВНА ДОЛИМОВА**

БИОКИМЁ

(амалий машғулотлар)

Муҳаррир З.Ахмеджонова

Босишга рухсат этилди 23.03.2002 й. Бичими 60x84¹/₁₆. Нашриёт ҳисоб табоғи 12,3. Шартли босма табоғи 18,8. Адади 1000 нусха. Баҳоси келишилган нархда. Буюртма № 194.

“Университет” нашриёти. Тошкент — 700174. Талабалар шаҳарчаси, ЎзМУ, маъмурий бино.

“Гротекс” қўшма корхонаси босмахонасида босилди.

© “Университет” нашриёти -2002

КИРИШ

Ушбу қўлланма университетларнинг, педагогика институтларининг биология факультетининг ва Фармацевтика институтининг агробιοтехнология факультетининг талабалари учун мўлжалланиб ёзилган. Қўлланмада биокимёдан амалий машғулотлар ўтказиш борасидаги билимлар жамланган.

Қўлланма 14 та бобдан иборат:

1) Буфер эритмалар; водород ионларининг концентрациясини аниқлаш методлари; 2) Оксиллар; 3) Мураккаб оксиллар; 4) Липидлар; 5) Углеводлар; 6) Нуклеин кислоталар; 7) Ферментлар; 8) Витаминлар; 9) Органик кислоталар; 10) Гормонлар; 11) Қон; 12) Сут; 13) Мускул тўқимаси; 14) Биологик объектларда фосфорни аниқлаш.

Қўлланмада оксиллар, нуклеин кислоталар, углеводлар, ёғлар, витаминлар, гормонлар ва биологик суюқликларни аниқлашда ишлатиладиган сифат реакциялари билан биргаликда микдорий анализ қилиш методлари ҳам келтирилган. Микдорий анализ қилиш учун бир қатор замонавий методлар, яъни электрофорез, спектрофотометрия, хроматография, фотоколориметрия ҳақидаги билимлар ёритилган. Баъзи бир лаборатория ишларидан олинган маълумотлар жадвал ҳолатида тўлдирилади ва хулосалар ёзилади.

Қўлланмадаги методлардан талабалар илмий-тадқиқот ишларида ҳам фойдаланишлари мумкин.

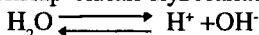
Назарий курсга оид айрим жадваллар китоб охирида иловада келтирилган.

Қўлланмада келтирилган ҳар бир амалий машғулотлар мавзуси биокимё курсининг тегишли назарий боблари билан узвий боғлиқ. Ҳар қайси амалий машғулотга назарий тушунчалар берилган, ҳар бир методнинг моҳияти ва қўлланилиши кўрсатилган, бу эса ўз навбатида фанни янада чуқурроқ ўзлаштиришга имкон беради.

І БОБ. ВОДОРОД КЎРСАТКИЧИ. БУФЕР ЭРИТМАЛАР. ВОДОРОД ИОНЛАРИНИНГ КОНЦЕНТРАЦИЯСИНИ АНИҚЛАШ МЕТОДЛАРИ

Водород кўрсаткичи

Ҳамма сувли эритмалар кислотали ёки ишқорий эритмалар бўлишидан қатъи назар, уларда водород ионлари H^+ , гидрооксил ионлари OH^- иштирок этади. Сув-кучсиз электролит бўлиб, унинг молекулаларининг жуда оз қисми H^+ ва OH^- ионларига диссоцияланади, бу ионлар диссоцияланмаган молекулалар билан мувозанатда бўлади:



Бу тенгламадан кўриниб турибдики, сувда $[H^+]$ ва $[OH^-]$ қийматлари бир хил бўлади. Сувдаги водород ионлари билан гидрооксил ионлари концентрацияларининг кўпайтмаси сувнинг ион кўпайтмаси (K_c) дейилади. Муайян ҳароратда K_c –ўзгармас катталиқ. Унинг 22° даги сон қиймати 10^{-14} га тенг.

$$[H^+] \cdot [OH^-] = 10^{-7} \cdot 10^{-7}$$

Эритманинг кислотали ёки ишқорийлиги водород ионларининг концентрацияси орқали ифодаланади, нейтрал эритмада $[H^+] = 10^{-7}$, кислота-ли эритмада $[H^+] < 10^{-7}$ ва ишқорий эритмада $[H^+] > 10^{-7}$. Водород ионларининг концентрацияси водород кўрсаткичи, яъни рН билан белгиланади. Эритмаларнинг муҳитини рН билан аниқлаш мумкин: нейтрал рН=7, кислотали рН<7, ишқорий рН>7.

Водород ионлари концентрациясининг тескари ишора билан олинган ўнли логарифми водород кўрсаткичи деб аталади.

$$pH = -Lg [H^+]$$

Бунда $[H^+]$ -водород ионларининг концентрацияси, грамм эквивалент/литрда ифодаланади.

Буфер эритмалар

Буфер эритмаларда водород ионларининг концентрацияси доимий бўлади. Буфер эритмалар қуйидагича ташкил топган бўлиши мумкин:

1) Кучли кислота ва шу кислотани кучли диссоцияланадиган тузидан, масалан, ацетат буфери-сирка кислотаси/натрий ацетат (CH_3COOH ва $CH_3COO Na$); гидрокарбонатли буфер/карбонат кислота натрий гидрокарбонат (H_2CO_3 ва $NaHCO_3$);

2) кучсиз асос ва шу асоснинг кучли диссоцияланадиган тузи, масалан, аммонийли буфер-аммоний гидроксиди/аммоний хлорид ($NH_4 OH$ / $NH_4 Cl$);

3) бир алмашган ва икки алмашган кўп асосли кислотанинг тузлари, масалан, фосфатли буферлар $-NaH_2 PO_4 / Na_2 HPO_4$.

Буфер эритмаларнинг рН ундаги кислота ва тузларнинг нисбатига боғлиқ бўлади, шу ҳолда эритманинг рН доимо бир хил бўлади. Буфер

эритмаларнинг pH назарий ҳолда қуйидаги формула билан ҳисобланади.

$$[H^+] = \frac{C_{\text{кислота}}}{C_{\text{туз}}} K \quad \text{ёки} \quad [OH^-] = \frac{C_{\text{асос}}}{C_{\text{туз}}} K$$

Бу ерда $C_{\text{кислота}}$ —кислотанинг концентрацияси; $C_{\text{туз}}$ —тузнинг концентрацияси; $C_{\text{асос}}$ —асоснинг концентрацияси; K —кислота (асос)нинг электролитик диссоцияланиш нуқтаси.

Водород кўрсаткичини маълум даражада сақланиши физиологик аҳамиятга эга: барча биокимёвий жараёнлар учун реакция муҳити доимий бўлиши керак, туҳит pH ининг ўзгариши моддалар алмашинуви жараёнининг ўзгаришига олиб келади.

Тўқима ва биологик суюқликларнинг буфер системаларини ҳосил қилишда минерал тузлар муҳим роль ўйнайди ва pH ини доим бир хил даражада сақлаб туради. Оксиллар, натрий ва калий бикарбонатлар, фосфат буферлари организм учун гоят зарур моддалардир. Масалан, оксиллар амфотер хоссага эга ва шунинг учун H^+ ионларини ҳам, OH^- ионларини ҳам бириктира олади. Шунинг учун оксиллар муҳим буфер системалар ролини ўйнайди ва организмда қандай бўлмасин бирор эркин кислота ёки асос пайдо бўлганида pH нинг ўзгаришига тўсқинлик қилади.

Бикарбонатлар билан фосфатларнинг эритмалари ҳам pH нинг ўзгаришига қарши таъсир кўрсатади. Масалан, натрий бикарбонат ($NaHCO_3$) қандай бўлмасин бирор кислота билан ўзаро таъсир қилганда H_2CO_3 ҳосил қилади. Бу кислота карбоангидраза иштирокида H_2O ва CO_2 га парчаланиб кетади, натижада муҳитнинг pH ўзгармайди.

Шундай қилиб, ҳужайраларнинг энг муҳим физиологик функцияси водород ионлари концентрацияси ва уларнинг нисбатига ҳам боғлиқ. Биологик суюқликлардаги бирор туз концентрациясининг ўзгариши бир қанча муҳим физиологик функцияларнинг бузилишига олиб келади.

Буфер сиғими

Ҳар бир буфер эритма маълум буфер сиғими билан характерланади. Буфер сиғими-буфер эритманинг таъсир кучидир. Кислота ва ишқор г.э.кв. (грамм-эквивалент) миқдор билан белгиланади, 1 л буфер аралашманинг водород кўрсаткичи бирлигини ўзгартириш учун кўшилади.

Буфер сиғими, буфер аралашмадаги компонентларнинг концентрациясига боғлиқ, одатда буфер эритмалар суюлтирилганда уларнинг концентрацияси камаяди.

Буфер сиғимини ҳисоблаш учун қуйидагиларни билиш керак:

V_c —буфер эритманинг ҳажми; V_i —кўшилган кислота ёки ишқорнинг ҳажми; N —кўшилган ишқор ёки кислотанинг нормаллиги; pH_0 —буфер эритмани дастлабки pH; pH_i —буфер эритманинг ишқор ёки кислота

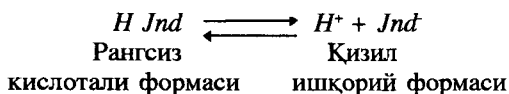
кўшилгандан кейинги рН. Буфер сиғими қуйидаги формула билан ҳисобланади:

$$\beta = \frac{N \cdot V_1}{(pH_1 - pH_o) \cdot V_c}.$$

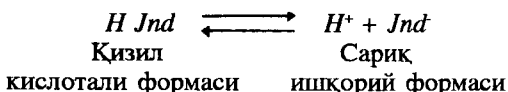
Индикаторлар ёрдамида водород ионларининг концентрациясини аниқлаш

Водород ионларининг концентрациясини (рН) индикаторлар ёрдамида аниқлаш мумкин. Индикаторлар кучсиз органик кислоталар ёки асослар бўлиб, уларнинг диссоцияланмаган формалари ранги, диссоцияланган формаларидан фарқ қилади. Индикаторларнинг диссоцияланиши реакциянинг муҳитига боғлиқ.

Масалан: фенолфталеин бир хил ранг берувчи индикатор бўлиб, фақат анион сифатида бўялади, диссоцияланмаган молекула рангсиз бўлади:



Икки хил ранг берувчи индикатор, масалан метилрот, диссоцияланмаган молекуласи ва анионларнинг ранги бир-биридан фарқ қилади:



Текширилаётган эритмага индикатор қўшиб, ҳосил бўлган рангга қараб муҳитнинг рН ини аниқлаш мумкин.

Реактивлар: 1. KH_2PO_4 нинг 0,15 М эритмаси. 2. $NaHPO_4$ нинг – 0,15 М эритмаси. 3. Метилрот, бромтимол индикаторлари. 4. Универсал индикатор.

Индикаторлар муҳит рН ига қараб турлича ранг ҳосил қила олади. Буни қуйида кўрсатилган мисолдан кўриш мумкин:

т/с	Индикатор	Рангнинг ўзгариш чегараси	Ранги	
			Кислотада	Ишқорда
1.	Тўксарик метил	3,1-4,4	қизил	сарик
2.	Метилрот	4,2-6,2	қизил	сарик
3.	Бромтимол	6,0-7,6	сарик	қўқ
4.	Фенолфталеин	8,0-9,8	рангсиз	бинафша-қизил
5.	Тимолфталеин	9,3-10,5	рангсиз	тўқ сарик-жигарранг

Ишнинг бориши. Тўртта пробирка олиб, уларга 0,15 М KH_2PO_4 ва $NaHPO_4$ эритмаларидан қуйида кўрсатилган нисбатларда олиб, турли

pH га эга бўлган буфер эритмаларни тайёрлаймиз. Эритмаларни аралаштириб, ҳар бир пробиркадаги буфер иккига бўлинади.

Биринчи қатордаги пробиркаларга метилрот индикаторидан қўшилади. Иккинчи қатордаги пробиркаларга эса бромтимол индикаторидан қўшиб, ҳосил бўлган ранглар кузатилади.

Эритмалар	Пробиркаларнинг номери			
	1	2	3	4
0,15 М KH_2PO_4 , мл	9,5	8,0	6,0	3,0
0,15 М Na HPO_4 , мл	0,5	2,0	4,0	7,0
Тайёрланган эритма pH	5,59	6,24	6,64	7,17

Универсал индикатор ёрдамида pH нини аниқлаш

Универсал индикатор бир неча индикаторларнинг аралашмасидан иборат бўлиб, эритма pH нга қараб ўзининг мос рангини ҳосил қилади. Универсал индикаторнинг таркиби қуйидаги жадвалда кўрсатилган.

I ва II универсал индикаторлар таркиби

Индикаторлар	Микдори, граммларда	
	1	2
Тимол	1	-
Бромтимол	0,8	0,4
Диметиламиноазобензол	0,6	-
Метилрот	0,4	0,2
Фенолфталеин	0,2	0,8
Этил спирти	1000,0	1000,0

I-универсал индикатори рангининг ўзгариши pH 1-10 оралиғида бўлади; II-универсал индикатори рангининг ўзгариши pH 4-10 оралиғида бўлади. Универсал индикатори рангининг ўзгариши турли pH да қуйидагичадир:

I индикатор		II индикатор	
pH	ранги	pH	ранги
2	қизил	4	қизил
4	тўқ сарик	5	тўқ сарик
6	сарик	6	сарик
8	яшил	7	яшил
10	кўк	8,5	кўк
		10	бинафша

Етти та пробирка олиб, қуйидаги кўрсатилган буфер эритмалар тайёрланади. Тайрланган буфер эритмаларга 2 томчидан универсал

индикатордан қўшилади ва ҳосил бўлган рангга қараб ҳар бир аралашманинг рНни аниқланади:

Эритмалар	Пробиркаларнинг номери						
	1	2	3	4	5	6	7
Na_2HPO_4 -0,1М	0,40	4,11	7,71	10,30	12,63	15,45	19,45
Эритманинг миқдори, мл							
Лимон кислотасининг 0,1 м эримаси миқдори, мл	19,60	15,89	12,29	9,70	7,37	4,55	0,55
Буфер эритмаларининг рН и	2,2	3,0	4,0	5,0	8,0	6,8	8,0

Потенциометрик усул билан эритманинг рН ини аниқлаш

Бу усул махсус электродлар ёрдамида текшириладиган эритмалардаги водород ионлари концентрациясининг таъсирида гальваник элементларнинг электр юритувчи кучини ўлчашга асосланган. Бу усул билан ҳар қандай суюқликларнинг рН ини аниқ ўлчаш мумкин. Махсус асбоблар турли потенциометр ёрдамида эритмалардаги рН ни ўлчаш мумкин. Бу асбобларнинг умумий тузилиши ва эритмаларнинг рН ини ўлчашда бажарадиган барча операциялари потенциометрларга (рН-метрлар) қўшиб бериладиган паспортда ёзилган.

Асбобда ишлаш қоидаси. Эритманинг рН ини ўлчашдан 15-20 минут олдин асбоб ёқиб қўйилади. Электродлар янги тайёрланган дистилланган сув билан 3-4 марта ювилади. Эритмаларнинг рН ини ўлчашда автоматик ҳарорат компенсациясидан фойдаланилади.

Эритманинг рН аввал асбобнинг катта -2 – $+14$ диапазолида, кейин кичик диапазолида ўлчанади, сўнгра асбоб электродлари 7-10 марта сув билан ювилади. Электродлар ювилгач, бошқа эритманинг рН ини ўлчаш мумкин. Ювилган электродлар сувда қолдирилади.

1. ОКСИЛЛАР

Оқсиллар ёки протеинлар — юқори молекуляр органик бирималар бўлиб, молекулалари α -аминокислоталардан тузилган. Оқсил таркибига қуйидаги элементлар киради (%): углерод-50,1-54,5, кислород-21,5-23,5, водород —6,5-7,3, азот-16,6-17,6, олтингугурт-0,3-2,5, фосфор-0,1-2. Баъзи бир оқсилларнинг таркибида оз миқдорда йод, темир, мис, бром, марганец, рух, кальций ва бошқа моддалар учрайди.

Оқсиллар ҳужайраларнинг энг муҳим таркибий қисмидир. Организмда оқсиллар турли хил функцияларни бажаради: ҳужайранинг структура материали сифатида хизмат қилади; тўқимадаги моддалар алмашинуvinинг ҳамма реакцияларини катализлайди; оқсиллар энергия манбаи ҳисобланади, уларнинг оксидланиши натижасида энергия ажралиб чиқади.

Оқсиллар иккита синфга бўлинади: оддий оқсиллар ва мураккаб оқсиллар. Оддий оқсилларга альбуминлар, глобулинлар, гистонлар, протаминлар киради. Мураккаб оқсиллар таркибига фосфопротеинлар, гликопротеинлар, хромопротеинлар, нуклеопротеинлар, липопротеинларни киритиш мумкин.

Оқсил эритмаларини тайёрлаш. Рангли реакциялар ва чўкмага тушириш реакциялари учун тухум оксилининг эритмаси тайёрланади. Битта тухумнинг оксигени сариғидан ажратиб олиниб, 15-20 мл дистилланган сувда эритилади. Эритма 3-4 қават дока орқали филтрланади. Эритма холодильникда сақланади.

Диализ учун тухум оксигенининг эритмасини тайёрлаш. Учта товук тухумининг оксигени сариғидан ажратиб, 700 мл дистилланган сувда эритилади, сўнгра 300 мл натрий хлорид тузининг тўйинган эритмасидан қўшилади. Эритма 3-4 қават дока орқали филтрланади ва холодильникда сақланади.

ОҚСИЛ ВА АМИНОКИСЛОТАЛАРГА ХОС РАНГЛИ РЕАКЦИЯЛАР

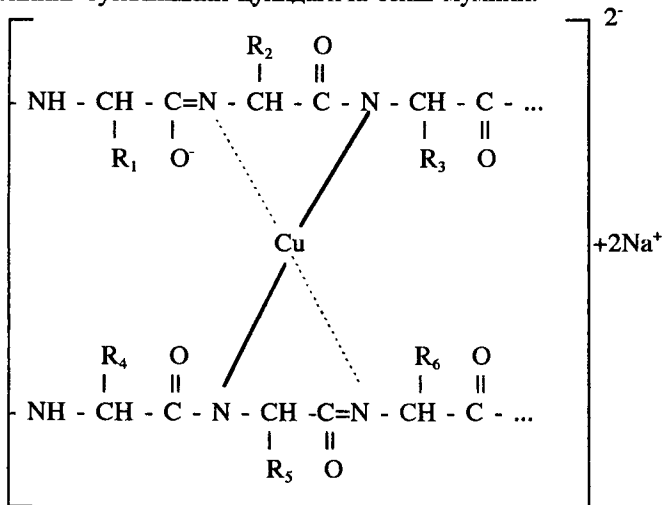
Оқсил гидролизлангандан аминокислоталаргача парчаланади. Оқсил таркибидаги аминокислоталар ўзаро пептид боғлари орқали бирикади. Айрим аминокислоталар бир-биридан таркибидаги турли-туман функционал гуруҳлари билан фарқланади. Бу гуруҳларга хос рангли реакциялар ёрдамида оқсиллар, биологик суюқликлар ва аралашмалар таркибидаги аминокислоталарни аниқлаш мумкин. Оқсил ва аминокислоталарнинг сифат ва миқдор жиҳатдан аниқлашда қўлланадиган рангли реакциялар икки гуруҳга бўлиб ўрганилади: биринчи гуруҳга оқсил таркибидаги ҳар хил химиявий боғлар билан ҳосил қилинадиган рангли реакциялар (биурет реакцияси), иккинчи гуруҳга эса аминокислоталарнинг функционал гуруҳлари билан ҳосил қилинадиган рангли реакциялар киради.

Биурет реакцияси

Оқсиллар ишқорий шароитда мис сульфатнинг эритмаси билан мураккаб комплекс бирикма ҳосил қилади. Реакция молекулада 2 та



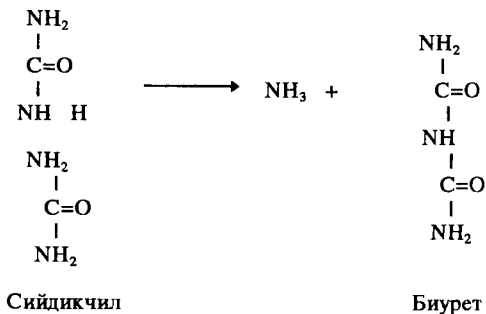
ёки ундан ортиқ пептид боғлар -C - N - гуруҳлари бўлишига боғлиқ. Пептидлар ва оқсилларни мис натрийли тузлари билан ҳосил қилган комплексининг тузилишини қуйидагича ёзиш мумкин.



Бу ерда -R₁, R₂, R₃, R₄...-аминокислоталарнинг қолдиқлари.

Реакция натижасида ҳосил бўлган рангнинг интенсивлиги пептидларнинг узунлигига боғлиқ бўлиб, қўқ бинафшадан то қизил бинафшагача ва қизил ранг оралиғида бўлади.

Сийдикчил (мочевина) қиздирилганда унинг икки молекуласидан NH₃ ажралиб чиқиб реакция натижасида биурет ҳосил бўлади:



Керакли асбоблар: пробиркалар билан штатив; 1,2 ва 5 мл ли пипеткалар; спирт лампаси.

Реактивлар. 1.Соя уни оксиди; тухум оксидининг эритмаси. 2.Натрий ишқорининг 10% ли эритмаси. 3. Мис сульфатининг 1% ли эритмаси. 4.Сийдикчил.

Ишнинг бориши. 1.Пробиркага 100-200 мг сийдикчил кристаллидан солиб, аммиак ҳиди ҳосил бўлгунча қиздирилади. Ҳосил бўлган масса совигандан кейин пробиркага 2 мл натрий ишқоридан, 1-2 томчи мис сульфатдан солинади. Реакция натижасида пушти ранг ҳосил бўлади.

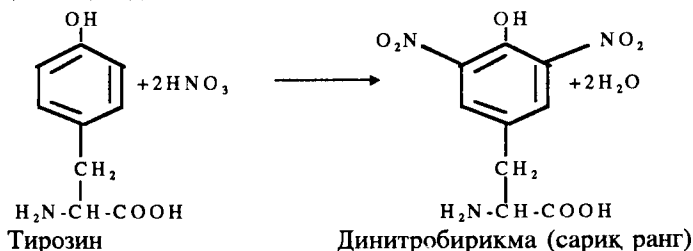
2. Пробиркага 2 мл тухум оксидидан солиб, кейин шунча ҳажмда натрий ишқоридан, 1-2 томчи мис сульфатнинг эритмасидан қўшилади.

Реакция натижасида қизил-бинафша ранг ҳосил бўлади.

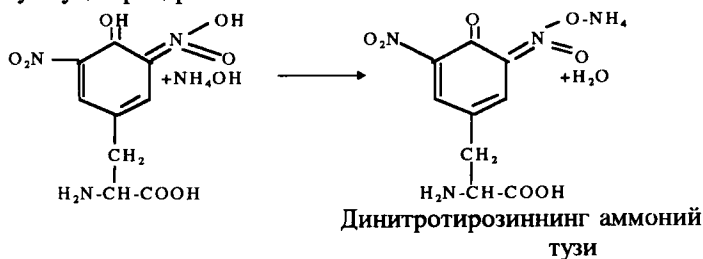
Ксантопротеин реакцияси

Кўпчилик оксид эритмалари концентрланган нитрат кислота билан реакцияга киришиб, сариқ ёки тўқ сариқ (зарғалдоқ) ранг беради. Бу реакция оксид молекуласидаги ароматик (ҳалқали) аминокислоталар (фенилаланин, тирозин, триптофанлар)га хос бўлиб, улар нитрат кислота билан ўзаро реакцияга киришиб, сариқ рангли нитробирикмаларни ҳосил қилади:

“Ксантос”- бу грекча сўз бўлиб, сариқ деган маънони беради. Тирозин концентрланган нитрат кислота таъсирида динитротирозинни (сариқ ранг) ҳосил қилади.



Динитротирозинга натрий ишқори ёки аммоний гидроксиди таъсир эттирилса, динитротирозиннинг натрийли ёки аммонийли тузи ҳосил бўлади, бу туз тўқ сариқ рангга эга.



Бу реакция таркибида ароматик аминокислота тутувчи барча оксилларга хосдир. Желатина оксили таркибида ароматик аминокислоталар бўлмаганлиги сабабли у ксантопротеин реакциясига киришмайди.

Ксантопротеин реакцияларини оддий ароматик бирикмалар - бензол ва унинг гомологлари ҳам беради.

Реактивлар. 1.Тухум оксилининг эритмаси; соя уни оксили. 2.Желатинанинг 1%ли эритмаси. 3.Концентрланган нитрат кислотаси. 4. Натрий ишқорининг 20% ли эритмаси ёки концентрланган аммиакли эритмаси (20-25%). 5.Фенолнинг 0,1% ли эритмаси.

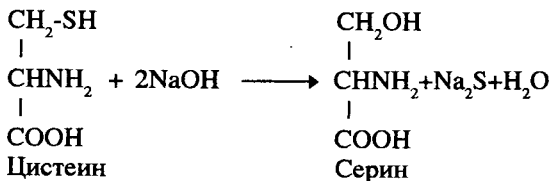
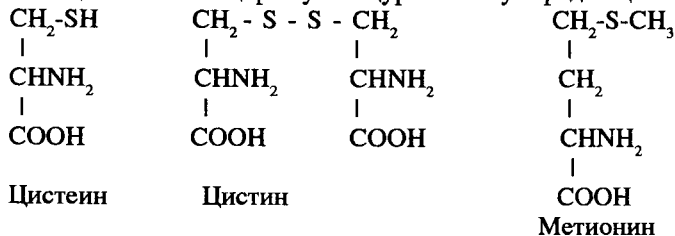
Ишнинг бориши. Пробиркага 2-3 мл фенол эритмасидан солинад ва 1-2 мл концентрланган нитрат кислотаси пробирка деворлари орқали қуйилади. Эҳтиёткорлик билан қиздирилганда сариқ ранг ҳосил бўлади. Пробиркага 1-2 мл тухум оксидан солиб, унга 8-10 томчи концентрланган нитрат кислотадан қўшиб қиздирилганда чўкма сариқ рангга киради. Совигандан кейин пробиркага эҳтиёткорлик билан аммиак эритмасидан ёки натрий ишқорининг эритмасидан қўшилади.

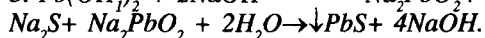
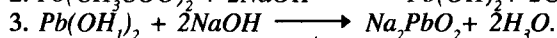
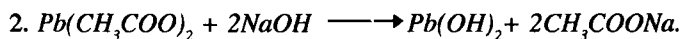
Пробиркага 1-2 мл желатинанинг 1 % ли эритмаси, 8-10 томчи концентрланган нитрат кислотаси эритмасидан қўшиб қиздирилади. Желатина ароматик аминокислоталарни таркибида сақламаганлиги учун бундай реакцияни бермайди.

Олтингурут тутувчи аминокислоталар учун реакция

Кўпгина оксиллар молекулалари таркибида олтингурут тутувчи аминокислоталар цистеин, цистин ва метионин сақлайди.

Оксилга ишқор қўшиб қиздирилганда, бу аминокислоталардан олтингурут водород сульфид ҳолда ажралиб чиқади. Водород сульфид қўрғошин ацетати билан қора чўкма-қўрғошин сульфидни ҳосил қилади.



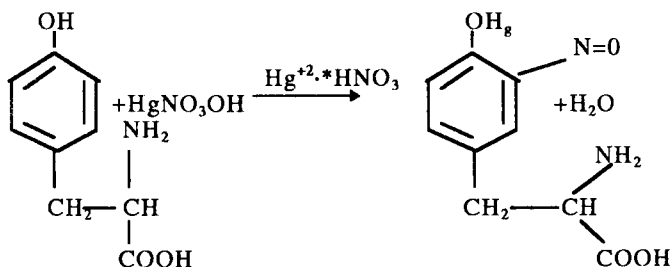


Реактивлар. 1. Соя уни оксиди. Тухум оксиди. 2. Нарий гидроксидининг 20 % ли эритмаси. 3. Кўрғошин ацетатининг 0,5 % ли эритмаси.

Иш тартиби. Пробиркага 1-2 мл оксид эритмасидан солинади ва тенг ҳажмда натрий ишқоридан қўшилади, қайнагунча қиздирилади ва совуғач 1-2 томчи кўрғошин ацетатли тузининг эритмасидан қўшилади. Натижада қора чўкма PbS ҳосил бўлади.

Тирозин реакцияси

Реакция оксид молекуласидаги тирозин аминокислотасига хос бўлиб, унинг таркибида фенол группаси бор. Унга миллон реактивидан қўшиб қиздирилганда қизил рангли чўкма ҳосил қилади.



Тирозин

Нитротирозиннинг
симобли бирикмаси

Деярли ҳамма оксиллар Миллон реакциясини беради, чунки улар таркибида тирозин аминокислотасини сақлайди. Шунингдек, бу реакция ҳамма феноллар учун ҳам характерлидир.

Керакли асбоблар: Пробиркалар билан штатив; пипеткалар.

Реактивлар. 1. Фенолнинг 0,1% ли эритмаси. 2. Миллон реактиви; бу реактивни тайёрлаш учун 40 г симоб олиб, 57 мл концентрантланган нитрат кислотасида (хона ҳароратида) эритилади.

Тайёрланган эритмага икки ҳажмда сув қўшиб суялтирилади ва ҳосил бўлган чўкма тўқиб юборилади. 3. Оксид эритмаси. 4. Желатинанинг 0,1% ли эритмаси.

Ишнинг бориши. Машғулот аввал фенол билан бажариб кўрилади. 1-пробиркага 2 мл фенол эритмасидан ва 1 мл Миллон реактивидан солиб, аста-секин қиздирилади, натижада пушти ранг ҳосил бўлади. Сўнгра оксид билан шу реакция бажарилади. 2-пробиркага 2 мл оксид эритмасидан солиб, 6-8 томчи миллон реактивидан қўшилади, реакция натижасида оқ чўкма ҳосил бўлади, қиздирилганда тўқ қизил рангли чўкмани ҳосил

қилади. 3-пробиркага 2 мл желатина эритмасидан солиб, 6-8 томчи Миллон реактивидан қўшиб реакция бажариб кўрилганда миллон реакцияси рўй бермайди.

Адамкевич реакцияси

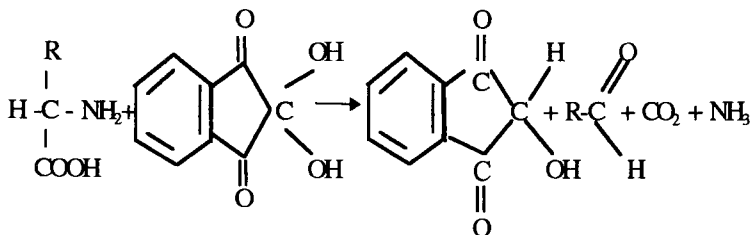
Триптофан аминокислота эритмасига концентрланган ацетат кислота қўшиб, пробирка девори бўйлаб пипеткадан секин концентрланган сульфаткислота қуйилади. Бунда икки суюқлик чегарасида қизил-бинафша ҳалқа ҳосил бўлади. Бу, ацетат кислота таркибида аралашма сифатида учрайдиган глиоксилат билан триптофан кислотали муҳитда рангли маҳсулотлар ҳосил қилиш хусусиятига эга эканлигидан далолат беради.

Иш тартиби. Пробиркага 1 мл 0,05 %ли триптофан ва 1 мл концентрланган ацетат кислотадан қуйилади. Пробиркани бир оз қиздириб, тенг ҳажмда пробирка девори бўйлаб яна концентрланган ацетат кислотадан қўшилади (суюқликлар бир-бири билан аралашмаслиги керак), 10 минут ўтгач ҳар иккала суюқлик чегарасида қизил-бинафша ранг ҳосил бўлади.

Реактивлар: концентрланган ацетат кислота, концентрланган сульфат кислота ва 0,05% ли триптофан эритмаси.

Нингидрин реакцияси

Оқсил эритмасини ва полипептидларини нингидрин реактиви билан қиздирилганда кўк-бинафша ранг ҳосил қилади. Нингидрин реакцияси аминокислоталарни α -ҳолатдаги аминогуруҳлари ҳисобига содир бўлади. Реакциянинг моҳияти шундан иборатки, α -аминокислоталар ва пептидлар, нингидрин таъсирида дезаминланиш ва декарбоксилланиш жараёнлари боради. Реакция натижасида CO_2 , NH_3 , альдегид ва қайтарилган нингидрин ҳосил бўлади. Қайтарилган нингидрин, аммиак ва бир молекула нингидрин ўзаро реакцияга киришиб, кўк-бинафша рангли бирикма ҳосил қилади.

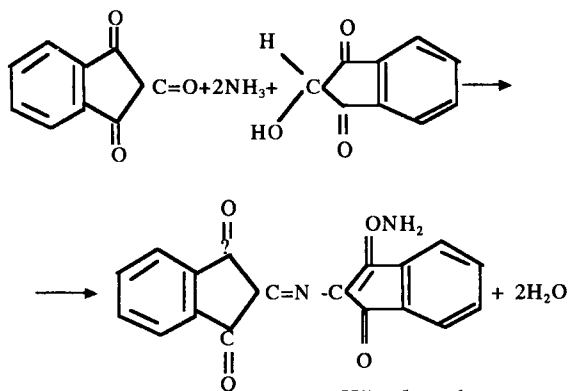


α -аминокислота

Қайтарилган нингидрин

Керакли асбоблар: пробиркалар билан штатив; пипеткалар; сув ҳаммоми.

Реактивлар. 1. 0,2% ли нингидриннинг спиртдаги ёки ацетондаги эритмаси. 2. Оқсил эритмаси. 3. 0,1 % ли глициннинг сувдаги эритмаси.



Кўк-бинафша рангли бирикма

Ишнинг бориши. Пробиркага 2 мл глициннинг эритмаси, 5-6 томчи нингидрин эритмаси солиниб, сув ҳаммомида қиздирилади. Натижада бинафша ранг ҳосил бўлади. Бошқа пробиркага 2-3 мл оксил эритмаси ҳамда 10-12 томчи нингидрин эритмаси солинади. Эритмалар аралаштирил-гач бир неча минут сув ҳаммомида қиздирилади. Реакция натижасида кўк-бинафша ранг ҳосил бўлади.

Оксилларнинг физик ва химиявий хусусиятлари.

Оксилларни чўктириш реакциялари

Турли реактивлар оксил моддаларининг физик-химиявий хосса-ларига таъсир этиб, макромолекула структурасини ўзгаришига олиб кела-ди. Оксилларнинг чўктириш реакцияларини иккита гуруҳга бўлиш мумкин: оксилларни денатурациясиз чўктириш (нейтрал ишқорий металл тузлари) ва денатурация йўли билан чўктириш (ҳарорат, минерал ва органик кислоталар, оғир металл тузлари, алкалоид реактивлари).

Оксилни чўкмага тушиши унга боғланган сув пардасининг бузили-шига боғлиқ. Гидрофил моддалар, органик эритувчи-ацетон, этил спирти, ишқорий металллар-нейтрал тузларнинг концентрланган эритмалари оксил-нинг сув пардасини бузиб, унинг эрувчанлигини камайтиради. Органик эритувчилар, аммоний сульфат, натрий хлорид, натрий сульфат, натрий фосфат ва бошқа эритмалар оксилга таъсир эттирилганда, оксил чўкмага тушади.

Оксил эритмаларига турли тузлар қўшилганда, унинг чўкмага тушириш реакциялари **оксилларни тузлаш** дейилади. Бу жараёнда оксил молекулалари гидрат пардаларидан холи бўлиб, бир-бири билан осон қўшилади. Оксил тузланиш натижасида кўпинча табиий ҳолатни ўзгартир-майди. Чўкмадан туз ионларини диализ йўли билан четлатилганда оксил қайтадан эритмага ўтади. Бундай реакциялар *қайтар реакциялар* деб аталади.

Аммоний сульфат ва натрий сульфат билан тузлаш усули оксилларни натив ҳолатини бузмай ажратиб олишда қўлланилади. Масалан, қон зардобдаги оксиллар аммоний сульфат билан чала тўйинтирилганда, глобулинлар ажралиб чиқади, глобулинлар чўкмасини филтрлаб, эритмага тўла тўйингунча туз кристаллидан қўшилса, альбуминлар фракцияси чўкмага тушади.

Оғир металл (мис, симоб, рух, кумуш, кўрғошин ва ҳоказо) тузлари оксил эритмасига таъсир этганда, улар оксил молекуласидаги сульфидрил гуруҳ- SH билан бирима ҳосил қилиб, оксил молекуласининг структурасини ўзгартиради. Оксилларни оғир металл тузлари билан чўктириш, қайтарилмайдиган жараёнлардир, яъни чўкмага тушган оксилни қайтадан эритма ҳолига келтириб бўлмайди.

Оксилларни нейтрал тузлар ёрдамида чўктириш

Оксилларни натив (табiiй) ҳолда ажратиб олиш учун тузлаш реакциялари яхши натижа беради. Нейтрал тузлар ҳар хил муҳитда турлича таъсир кўрсатиш хусусиятига эга. Масалан сульфат аммоний тузи таъсирида оксиллар нейтрал шароитда, натрий хлорид таъсирида эса нордон шароитда чўкма яхши тушади.

Оксилларни аммоний сульфат таъсирида чўктириш

Керакли асбоблар: пробиркалари билан штатив, филтър қоғоз; воронка; 2,5 мл ли пипеткалар.

Реактивлар. 1. Қон зардобы ёки тухум оксилининг эритмаси; соя уни оксили; 2. Аммоний сульфатнинг тўйинган эритмаси. 3. Аммоний сульфатнинг кристалл тузи. 4. Натрий ишқорининг 10 %ли эритмаси. 5. Мис сульфатнинг 1 %ли эритмаси.

Ишнинг бориши. Пробиркага 2-3 мл қон зардобидан ёки суюлтирилган тухум оксидан солиб, тенг ҳажмида аммоний сульфатнинг тўйинган эритмасидан қўшилади ва яхшилаб аралаштирилади. Натижада глобулин оксиллари чўкмага тушади. 8-10 минутдан кейин филтърланади. Глобулин оксиллари чўкмада, альбуминлар филтратда қолади. Филтратдаги альбуминларни чўктириш учун аммоний сульфатнинг кристалларидан тўйингунча қўшилади, натижада альбуминлар чўкмага тушади, сўнг чўкма филтърланади.

2-3 мл филтратдан олиб, биурет реакцияси бажарилади. Агар оксиллар тўлиқ чўкмага тушган бўлса, филтрат билан биурет реакцияси ҳосил бўлмайди. Глобулин ва альбумин чўкмалари сувда эритилади ва биурет реакцияси бажарилади.

Оқсилларни натрий хлорид таъсирида чўктириш

Реактивлар. 1. Натрий хлорид тузининг кристали. 2. Сирка кислотасининг 2 %ли эритмаси.

Ишнинг бориши. Пробиркага 2-3 мл қон зардоби ёки тухум оксидидан солиб, натрий хлорид тузининг кристалларидан тўйингунча қўшилади. 3-5 минутдан кейин пробиркада глобулинлар чўкмаси ҳосил бўлади. Сўнгра чўкма филтрланади. Филтратда альбуминлар қолади. Альбуминлар тўйингунча нейтрал эритмаларда чўкмага тушмайди. Филтратга 4-6 томчи сирка кислотасининг 2 % ли эритмасидан қўшилади, натижада альбуминлар чўкмага тушади, орадан 10 минут ўтгач чўкма филтрланади. Чўкмалар сувда эритилиб, биурет реакцияси бажариб кўрилади.

Оқсилларни минерал кислоталар таъсирида чўктириш

Оқсиллар концентрланган минерал кислоталар (ортофосфат кислотадан ташқари) таъсирида чўкмага тушади. Бу реакция қайтмас реакция ҳисобланади, чунки оқсилнинг коллоид заррачалари дегидратацияланади ва уларнинг зарядлари нейтралланади, натижада комплекс бирикмалар ҳосил бўлади. Бундай ҳолда оқсиллар қайтмас денатурацияга учрайди. Ортикча минерал кислоталар (нитрат кислотадан ташқари) чўкмага тушган оқсилларни эритиб юборади.

Реактивлар. 1. Концентрланган хлорид кислотаси. 2. Концентрланган сульфат кислотаси. 3. Тухум оксидининг эритмаси; соя уни оқсил.

Ишнинг бориши. Учта пробиркага эҳтиёткорлик билан 1 мл кислота: биринчисига-хлорид, иккинчисига-сульфат ва учинчисига-нитрат кислотасидан солинади. Сўнг ҳамма пробиркаларга 1 мл дан оқсил эритмасидан қўшилади. Шунда оқсил билан кислота чегарасида оқ халқа ҳосил бўлади. Ҳар бир пробирка секин-аста чайқатилади. Ортикча хлорид ва сульфат кислотаси бўлганлиги учун биринчи ва иккинчи пробиркалардаги чўкма эриб кетади, учинчи пробиркадаги нитрат кислотаси билан ҳосил қилинган чўкма эриб кетмайди, чунки ҳосил бўлган чўкма ортикча нитрат кислотасида эримайди.

Оқсилларни органик эритувчилар билан чўктириш

Органик эритувчилар (спирт, эфир, ацетон ва бошқалар) таъсирида оқсил макромолекулаларининг сувли қобиғи (гидросфералари) бузилади, яъни денатурацияга учрайди, натижада эритмадаги оқсилларнинг эрувчанлиги камайди ва оқсил чўкмага тушади. Оқсил эритмасида туз иштирок этса (*NaCl*), коллоид заррачаларининг зарядини ўзгаришига олиб келади, бу ҳол оқсил эритмаларининг чидамлилигини янада камайтиради. Чўктириш спирт (хлороформ) билан совуқ шароитда олиб борилса, ҳосил бўлган оқсил чўкмаси сувда эрийди, яъни бунда оқсил хоссалари ўзгармайди, денатурацияга учрашга улгурмайди. Агар оқсил узок вақт спиртда

турса, денатурацияга учрайди ва ҳосил бўлган чўкма сувда, нейтрал тузлар эритмасида эримайди.

Реактивлар. 1. Оксил эритмаси. 2. 96 % ли этил спирти. 3. Ацетон. 4. Хлороформ. 5. Натрий хлорид тузининг кристали.

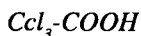
Ишнинг бориши. Учта пробиркага 1-2 мл дан оксил солинади ва 0,2-0,3 г натрий хлорид тузидан қўшиб, яхшилаб аралаштирилади.

Биринчи пробиркага томчилаб 2-3 мл спирт, иккинчи пробиркага 2-3 мл ацетон ва учинчи пробиркага 2-3 мл хлороформ солинади. Пробиркалар чайқатилади ва 5-6 минутдан кейин оксил чўкмаси ҳосил бўлганлигини кўриш мумкин.

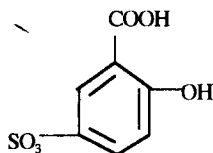
Оксилларни органик кислоталар билан чўктириш

Органик кислоталар оксилларни эритмадан қайтмас чўкмага туширади. Турли кислоталарнинг таъсир қилиш кучи бир-биридан фарқ қилади.

Энг самарали ва ўзига хос таъсир қилувчи сульфосалицил ва трихлорсирка кислотасидир.



**Трихлорсирка
кислота**



**Сульфосалицил
кислота**

Трихлорсирка кислота таъсирида фақат оксиллар, сульфосалицил кислота таъсирида эса оксиллардан ташқари, пептонлар ва полипептидлар ҳам чўкмага тушади.

Реактивлар. 1. Тухум оксилининг эритмаси; соя уни оксили. 2. Сульфосалицил кислотасининг 10 %ли эритмаси. 3. Трихлорсирка кислотасини 10 % ли эритмаси.

Ишнинг бориши. Иккита пробирка олиб 2 мл дан оксил эритмасидан солинади ва биринчи пробиркага 5-8 томчи сульфосалицил кислотасидан, иккинчи пробиркага 5-8 томчи трихлорсирка кислотасидан қўшилади. Пробиркалар чайқатилади ва оксиллар чўкмага тушганлиги кузатилади.

Оксилларни оғир металл тузлари таъсирида чўктириш

Оксиллар мис, қўрғошин, симоб, рух, кумуш ва бошқа оғир металлларнинг тузлари таъсирида чўкмага тушади.

Оксиллар билан оғир металл ионларининг ўзаро таъсири жуда мураккаб бўлади. Аввало сувда эримайдиган комплекс бирикмалар ҳосил бўлади, ортикча тузнинг эритмасида ($AgNO_3$, $HgCl_2$) эрийди. Оғир металл тузлари таъсирида оксиллар денатурацияга учрайди. Оксил макромолекула-

сининг иккиламчи ва учламчи структураси бузилади, пептид занжирининг ҳолатлари ўзгаради, улар орасидаги боғларда узилиш ҳоллари рўй беради (дисульфид боғлари). Дисульфид боғлари оксилларнинг иккиламчи ва учламчи структура тузилишида катта роль ўйнайди. Занжирлар орасидаги узилиш оксил структурасини ўзгаришига – оксилларни қайтмас денатурациясига олиб келади./

Реактивлар. 1.Тухум оксили; соя уни оксили. 2.Мис сульфатнинг 5%ли эритмаси. 3.Қўрғошиннинг сирка кислотали тузининг 5 %ли эритмаси. 4. Кумуш нитратнинг 3 %ли эритмаси.

Ишнинг бориши. Учта пробиркага 1-2 мл дан оксил эритмаси солинади. Биринчи пробиркага томчилаб мис сульфат эритмасидан, иккинчи пробиркага қўрғошиннинг сирка кислотали тузи эритмасидан, учинчи пробиркага эса кумуш нитрат эритмасидан қўшилади. Пробиркалар чайқатилганда, ҳамма пробиркаларда оксил чўкмаси ҳосил бўлади. Ортиқча реактивдан қўшилса, биринчи ва иккинчи пробиркага кумуш нитрат эритмасидан ортиқча қўшилганда ҳам чўкма эримади.

Оксилларни алколоидлар реактиви билан чўктириш

Алколоидлар – азот тутувчи моддалар бўлиб, кучли физиологик таъсир қилиш хусусиятига эга. Алколоидларга қуйидагилар: морфин, папаверин, атропин, кофеин, эфедрин ва бошқа бирикмалар кириб, булар даволаш практикасида кўп ишлатилади.

Кўп алколоид реактивлари таъсирида оксиллар чўкмага тушади. Буларга қуйидагилар киради: танин, йодни калий йоддаги эритмаси (Бушард реактиви), висмут йодни калий йоддаги эритмаси (Драгендорф реактиви), пикрин кислотаси ва бошқалар.

Оксил моддаларини алколоид реактивлари билан чўкма ҳосил қилишнинг асосий сабаби шундан иборатки, аминокислоталар ва алколоидлар таркибига кирадиган гетероциклик гуруҳларнинг ўхшашлигидир (индол, имидазол ва бошқалар). Алколоид реактивлари оксиллар билан эримайдиган бирикмаларни ҳосил қилади. Оксилни алколоид реактивлари билан чўктиришга кучсиз органик кислоталар (масалан, сирка кислотаси) яхши таъсир қилади, аксинча кучли кислоталар бу жараёнга қаршилиқ кўрсатади. Чўкма ишқорий шароитда эриб кетади.

Реактивлар. 1.Тухум оксили; соя уни оксили. 2.Пикрин кислотасининг 1 % ли эритмаси. 3. Таниннинг 10 % ли эритмаси. 4.Бушард реактиви: 1 г йод, 2 г калий йод, 50 мл сув. Бу реактивни тайёрлаш учун калий йоди бир неча мл сувда эритилади. Шу эритмада йод эритилади, сўнгра ҳажми дистилланган сув билан 50 мл га етказилади. 5. Драгендорф реактиви висмут йодининг калий йоддаги эритмаси: 13,5 г калий йоди 20 мл дистилланган сувда эритилади. 2,5 г висмут нитрат 10 мл нитрат кислотасида алоҳида эритилади. Сўнгра идишда қолдирилади. Бунда идиш

тагига калий нитратнинг кристаллари чўкади. Тиниқ эритма эҳтиёткорлик билан бошқа идишга қуйилади ва ҳажми сув билан 50 мл га етказилади. 6.Сирка кислотасининг 1 % ли эритмаси.

Ишнинг бориши. Тўртта пробиркага 1-2 мл оксил эритмаси, сўнгра ҳар бир пробиркага 3-5 томчи 1 % ли сирка кислотасидан солинади. Шундан кейин биринчи пробиркага 4-5 томчи пикрин кислота эритмасидан, иккинчи пробиркага 2-4 томчи танин эритмасидан, учинчи пробиркага 2-4 томчи Бушард реактивидан, тўрттинчига 2-4 томчи Драгендорф реактивидан қўшилади. Натижада оксил чўкмаси ҳосил бўлади.

Оксилларни юқори ҳарорат таъсирида чўкмага тушириш

Барча оксиллар юқори ҳарорат таъсирида чўкмага тушади. Оксиллар кучсиз кислотали муҳитда осон чўкади. Кучли ишқорий ва кислотали муҳитда юқори ҳарорат таъсирида оксиллар чўкмага тушмайди, чунки оксил молекулалари кучли мусбат ёки кучли манфий зарядга эга бўлади.

Реактивлар. 1.Тухум оксидининг эритмаси; соя уни оксиди. 2.Сирка кислотасининг 2 % ли эритмаси. 3. Натрий ишқорининг 10 % ли эритмаси. 4. Натрий хлориднинг тўйинган эритмаси.

Ишнинг бориши. 1.Олтита пробирка олиб, 10 томчидан оксил эритмаси солинади. 2-3-пробиркаларга 2 томчи сирка кислотасининг 2% ли эритмаси томизилади. 4-5-пробиркаларга 10 томчи сирка кислотасининг эритмасидан қўшилади. 6-пробиркага 2 томчи натрий ишқорининг 10 %ли эритмасидан солинади. Энди 3 ва 5-пробиркаларга 4 томчи натрий хлориднинг тўйинган эритмаси қўшилади. Ҳамма пробиркалар қайнагунча қиздирилади. Пробиркаларда чўкма ҳосил бўлиш тезлиги белгилаб берилади.

Тажрибада олинган натижалар асосида жадвал тўлдирилади:

Пробиркаларнинг номери	Пробиркаларга моддалар томчилаб солинади			
	Оксил	CH_3COOH	Na OH	NaCl
1	10	-	-	-
2	10	2	-	-
3	10	2	-	4
4	10	10	-	-
5	10	10	-	4
6	10	-	2	-

Оқсилларни диализ қилиш

Оқсиллар диализ усулида турли хил тузлар ва кичик молекулали бирикмалардан тозаланади. Бу усулда улар махсус диализ қилувчи халтачаларга солиниб, оқар сувга узоқ вақт ботириб қўйилади. Диализ қилувчи халтачалар махсус материаллардан тайёрланади. Бу материаллар кичик молекулали бирикмаларни ва ионларни яхши ўтказадиган бўлиши керак. Ярим ўтказгич мембраналар сифатида целлофан ва ҳайвонларнинг сийдик пуфакчидан фойдаланиш мумкин. Диализ учун кўпинча целлофан халтачалар ишлатилади. Агар оқсиллар турли хил тузлар ёрдамида ажратиб олинган бўлса, улар таркибидаги туз диализ йўли билан тозаланади.

Реактивлар: тухум ёки соя уни оқсилнинг эритмаси, ош тузининг тўйинган эритмаси, кумуш нитратнинг 1%ли эритмаси, натрий гидроксиднинг 20% ли эритмаси, мис сульфатнинг 2% ли эритмаси.

Ишнинг бориши. Узунлиги 10-12 см, диаметри 0,7 см бўлган шиша найнинг бир томонини целлофан билан беркитилади. Шиша найчага 5-6 томчи оқсил эритмасидан ва 2-3 томчи ош тузи эритмасидан қўйилади. Кейин шиша найча 2-3 мл суви бўлган пробиркага туширилади. 10-15 минут ўтгач шиша найча олинади ва дистилланган сувда хлоридлар ва оқсил бор ёки йўқлиги текширилади.

Хлоридларни аниқлаш учун дистилланган сувда 0,5 мл пробиркага солиб, устига кумуш нитратнинг 1% ли эритмасидан 0,2 мл қўйилади. Бунда кумуш хлорид чўкмага тушади.

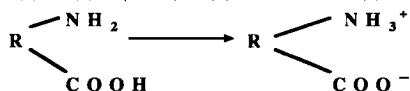
Оқсилларни аниқлаш учун биурет реакциясидан фойдаланилади. Бунинг учун дистилланган сувдан 0,5 мл олиб, унинг устига натрий гидроксиднинг 20% ли эритмасидан 0,5 мл ва мис сульфатнинг 2%ли эритмасидан 5-10 томчи қўйилади. Бинафша ранг ҳосил бўлмаганлиги оқсил йўқлигидан дарак беради.

Оқсилларнинг изоэлектрик нуқтасини аниқлаш

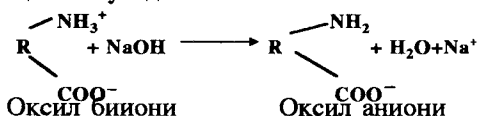
Оқсиллар химиявий хоссаларга кўра амфотер моддалар ҳисобланади, уларнинг молекуласида эркин карбоксил ва амин гуруҳлари бор. Оқсилларнинг кислотали хоссалари полипептид занжирлари охиридаги карбоксил гуруҳларига ва дикарбон аминокислоталар ҳисобига намоён бўлади. Кислотали муҳитни ҳосил қилишга таркибидаги фенол гидроксиглини тутувчи тирозин ва сульфгидрил гуруҳини тутувчи аминокислоталар таъсир қилади. Оқсилларнинг ишқорий хоссалари амин, имин ва диамино-монокарбон аминокислоталарнинг гуруҳлари ҳисобига боради.

Ҳам манфий, ҳам мусбат зарядли гуруҳлар мавжудлиги туфайли оқсиллар ҳам аминокислоталарга ўхшаш амфотерлик хусусиятга эга. Сувли эритмада оқсилларнинг ишқор ва кислота гуруҳлари орасида протонларнинг кўчиш туфайли, таркибида кўп $-NH_3^+$ ва $-COO^-$ гуруҳ тутувчи амфион ҳосил бўлади. Агар манфий ва мусбат зарядларнинг сони

тенг бўлса, оксил молекуласининг заряди амалий жиҳатдан нолга тенг бўлиб, электр майдонида ҳеч қайсқа силжимайди.



Ишқорий муҳитда оксиллар ортиқча COO^- гуруҳларга эга бўлиб, анион ролини ўйнайди. Масалан, натрий ишқори билан оксилларнинг натрийли тузи ҳосил бўлади:



Аксинча, кислотали муҳитда оксил ортиқча NH_3^+ гуруҳларига эга бўлади ва мусбат ион сифатида катодга қараб ҳаракат қилади:



Амфионлар шаклида оксил молекуласи заряддан маҳрум бўлади ва бундай коллоид заррача эритмада турғунлигини йўқотади. Оксилларнинг мусбат ва манфий зарядлари йиғиндиси нолга тенг бўлиб, электр майдонида на катод ва на анод томонга силжимайдиган эритманинг рН оксилларнинг **изоэлектрик нуқтаси** деб аталди. Турли оксилларнинг изоэлектрик нуқтаси рН нинг ҳар хил ўлчамига тўғри келади, чунки оксил молекуларида ишқор ва кислота характериға эга бўлган гуруҳларнинг сони бир-бирига тенг эмас, рН нинг турли кўрсаткичларида уларнинг диссоциланиш даражаси баъаварлашиб, молекула, умуман, электронейтрал ҳолатига келади. Масалан, казеиннинг рН-4,2; тухум альбуминининг оксили -4,8; желатинаники 4,9; зеин (жўхори оксили)ники -6,2 га тенг. Протаминлар ва гистонларнинг изоэлектрик нуқтаси кучсиз ишқорий муҳитга тўғри келади.

Оксилларнинг изоэлектрик нуқтасида чўкмага туширишни тезлаштиш учун сувни тортиб олувчи моддалар (спирт, ацетон, эфир) ёки танин қўшилади. Органик эритувчилар оксил макромолекуласининг сув қобиғини бузиб юборади, масалан, танин билан азотли гетероциклик гуруҳлар сувда эримайдиган бирикмаларни ҳосил қилади.

Керакли асбоблар: пробиркалар билан штатив; 2 ва 10 мл ли пипеткалар.

Реактивлар. 1. Желатинанинг 1 %ли эритмаси. 2. Сирка кислотасининг 0,1 н эритмаси. 3. Сирка кислотаси натрийли тузининг 0,1 н эритмаси. 4. 96 %ли этил спирти. 5. Таниннинг 0,1 %ли эритмаси.

Ишнинг бориши. Бешта пробиркада турли рН ли буфер эритмалар тайёрланади, яъни сирка кислотасининг эритмасидан ва сирка кислотаси-

нинг натрийли тузи эритмасидан, жадвалда кўрсатилган микдорда солинади. Сўнгра ҳар бир пробиркага 1 мл желатина эритмасидан солиб яхшилаб аралаштирилади. Шундан сўнг пробиркаларга 4 мл дан спирт қўшилади (ёки 1 мл танин эритмасидан) ва аралаштирилади. 15-20 минутдан кейин пробиркаларда лойқа ҳосил бўлади, лойқаланиш даражаси пробиркалардаги буфер аралашмага боғлиқ. Маълумки, рН аралашманинг энг юқори лойқаланиши желатинанинг изоэлектрик нуқтасига тўғри келади. Желатинанинг изоэлектрик нуқтаси рН-4,7. Жадвалда қуйқум ҳосил бўлган пробиркаларга қўйилган + ишораси қуйқум ҳосил бўлиш даражасини кўрсатади.

Оқсилларнинг изоэлектрик нуқтасини аниқлаш:

Пробиркалар номери	Буфер аралашмаларнинг миқдори, мл		Аралаш- малар- нинг рН и	Желатинанинг 1% ли эритмаси, мл	Этил спирти, мл	Қуйқум ҳосил бўлиш даражаси (+)
	0,1n CH_3COOH	0,1n CH_3COONa				
1	1,8	0,2	3,8	1	4	
2	1,4	0,6	4,4	1	4	
3	1,0	1,0	4,7	1	4	
4	0,6	1,4	5,1	1	4	
5	0,2	1,8	5,7	1	4	

Аминокислоталарнинг қоғоз хроматографияси ёрдамида ажратиш

Аминокислоталарни бир-биридан ажратишда энг оддий, осон ва нисбатан аниқ усул қоғоз хроматографиясидир. Хроматография усули 1903 йилда рус олими М.С.Цвет томонидан кашф этилган. Қоғоз хроматографияси учун юқори сифатли ҳар қандай филътр қоғоздан фойдаланиш мумкин.

Аминокислоталарнинг ажратиш ва аниқлаш усули, уларнинг аралашмасини филътр қоғозга томизишдан ва қоғознинг бир учини тегишли органик эритувчига туширишдан иборат. Эритувчи филътр қоғозида шимилади ва ўзи билан аминокислоталарни кўчиради (илаштиради). Аминокислоталарни қоғоз бўйлаб кўчирилиш тезлиги уларнинг химиявий тузилишига, эритувчиларда эриш даражасига боғлиқ бўлади. Айрим аминокислоталар турли хил эритмаларда турлича эриш хусусиятига эга. Одатда бу эритмалардан бири сув, иккинчиси эса сувда тўйдирилган органик эритувчи бўлади (фенол, бутил спирти ва бошқалар). Одатда сув билан аралашмайдиган ёки қисман аралашадиган органик эритувчилардан фойдаланилади.

Аминокислота босиб ўтган масофанинг (а) эритма босиб ўтган масофага (в) бўлган нисбати аминокислоталарнинг ажратиш коэффициенти деб аталади. Аминокислоталарнинг ажратиш коэффициенти (R_f) ҳар

бир аминокислота учун берилган эритмада доимий бўлиб, у қуйидагича аниқланади.

$$Rf = \frac{a}{b}$$

Қоғоз хроматографиясида аминокислоталар икки усул ёрдамида ажратилади. Бу пастга ва юқорига ҳаракат қилувчи хроматография усулидир.

Бундан ташқари яна бир томонлама ва икки томонлама хроматография усули ҳам мавжуд. Бир томонлама хроматография усулида моддаларнинг ажралиши бир йўналишда бўлади. Бунда Rf яқин бўлган аминокислоталар бир-бирига қўшилиб 2-3 тадан бўлиб ажралади. Уларни бир-биридан ажратиш учун икки томонлама хроматография усулидан фойдаланилади. Бунда иккита органик эритувчи иштирок этади. Ажратиш кетма-кет иккита ўзаро перпендикуляр йўналишда олиб борилади.

Иш тартиби. Филтър қоғоздан узунлиги 12-14 см ва эни 1,5 см келадиган лента қирқилади. Бу лентанинг юқори томонидан игна билан 15-20 см ип ўтказилади. Қоғозни пастки қисмидан 1 см қолдириб тўғри чизик ва унинг ўртасига диаметри 0,5 см бўлган айлана чизилади. Айлана ўртасига капилляр ёрдамида 2-3 томчи аминокислота аралашмаси томизилади. Томчи томизилган жой ҳавода қуритилади. Узунлиги 18-20 см ва диаметри 2 см бўлган пробирканинг тубига секин-асталик билан пробирка деворларига текизмасдан сув билан тўйинтирилган фенол эритмасидан 2 мл қўямиз. Тайёрланган қоғоз ипини ушлаб туриб пробиркага туширамыз, бунда қоғознинг учи эритувчига 2-3 мм ботиб, қатъий равишда вертикал туриши керак. Пробиркани пробка билан беркитиб 40-50 °С ҳароратда 1,5-2 соат давомида термостатга қўямиз. Пробиркадаги эритма қоғоз лента бўйлаб 10-12 см кўтарилгандан кейин хроматограммани олиб 100°С да 10-15 минут давомида қуритилади. Хроматограммада рангли доғлар ҳосил бўлади. Доғларнинг R_t и аниқланиб жадвал (иловага қаранг) дан қайси аминокислота эканлиги аниқланади. Аминокислоталарнинг бир-биридан ажралиши аниқ бўлиши учун одатда R_f бир-биридан кўпроқ фарқ қилувчи аминокислоталар аралашмаси олинishi керак.

Реактивлар: сув билан тўйинтирилган фенол эритмаси, нингидриннинг 0,1% ли эритмаси, аминокислоталар аралашмасининг 0,1% ли эритмаси (80 % ли этил спиртида эритилади).

III БОБ. МУРАККАБ ОҚСИЛЛАР

Мураккаб оқсиллар макромолекуласи таркибига аминокислоталардан ташқари оқсил бўлмаган бошқа компонентлар (простетик гуруҳ) ҳам киради. Мураккаб оқсиллар простетик гуруҳларининг (нуклеин кислоталар, углевод, липид, витамин, металл ва бошқалар) химиявий табиатига кўра қуйидаги гуруҳларга бўлинади: нуклеопротеинлар, хромопротеинлар, гликопротеинлар, липопротеинлар, металлопротеинлар ва фосфопротеинлар.

Нуклеопротеинлар

Нуклеопротеинлар простетик гуруҳлари нуклеин кислоталари-ДНК ёки РНК дан иборат. Нуклеопротеинлар ишқорий шароитда яхши эрийди ва кислоталар таъсирида чўкмага тушади. Дезоксирибонуклеопротеинлар кичик концентрацияли туз эритмасида чўкади, юқори концентрацияли тузлар эритмасида эса эрийди.

Нуклеопротеинлар суюлтирилган кислоталар билан чала гидролиз қилинганда улардан оқсил ва нуклеин кислота ажралиб чиқади. Нуклеин кислоталарнинг ўзи гидролизланганда бирин-кетин қуйидаги парчаланиш маҳсулотлари ҳосил бўлади:



Керакли асбоблар: пробиркалар билан штатив; пипеткалар; сув ҳаммоми.

Реактивлар. 1.Нуклеопротеинларнинг чўкмаси. 2.Сульфат кислотасининг 5% ли эритмаси. 3. Концентрланган сульфат кислотаси. 4. Натрий ишқорининг 10% ли эритмаси. 5.Аммиакнинг концентрланган эритмаси. 6.Натрий ишқорининг 10 %ли эритмаси. 7.Мис сульфатнинг 1% ли эритмаси. 8.Кумуш нитратни аммиакли эритмаси: кумуш нитратнинг 1-2% ли эритмасига аммиак эритмасидан қўшилади, натижада чўкма ҳосил бўлади, сўнгра молибден реактиви: 3,75 г аммоний молибдат 50 мл сувда эритилади ва 50 мл 32 % ли нитрат кислота қўшилади.

Дезоксирибонуклеопротеинларни жигар ва талокдан ажратиб олиш

Нуклеопротеинларнинг бу тури ҳужайра ядросининг энг муҳим таркибий қисми ҳисобланади. Шунингдек, улар ядронинг оксиллари деб ҳам аталади. Жигар, талок, ошқозон ости беzi, буйрак нуклеопротеинларга бойдир. Ядро оксилларининг характерли хоссаси — тузларнинг кучли эритмаларида (натрий хлорид ва бошқалар) яхши эрийди ва кислотали эритмаларда эса чўкмага тушади.

Керакли асбоблар: центрифуга; қайчи; ҳавонча; 300 ва 400 мл ли стакан; 100 мл ли цилиндр; техник тарози.

Реактивлар: 1. Мол, қуён, чўчқанинг жигари ёки талоғи, янгиси ёки музлатилгани. 2. Натрий хлориднинг 5 %ли эритмаси. 3. Ёғоч таёқча.

Ишнинг бориши. 2-2,5 г жигар ёки талок олиб, қайчи билан яхшилаб майдаланади, сўнгра ҳавончага 5 %ли натрий хлорид эритмасидан озгина солиб эзилади. Шундан кейин ҳавончага оз-оздан 70-80 мл ош тузи эритмасидан солиб, 10-15 минут давомида эзилади. Ҳавончадаги гомогенат центрифуга стаканларига солинади ва 10-15 минут 2500 айл/минут тезликда центрифугаланади, сўнгра чўкмаси ташлаб юборилади ва суюқлик қисмининг ҳажми цилиндр билан ўлчанади.

Суюқлик ҳажмидан олти марта кўп сув ўлчаб стаканга солинади ва уни ёғоч таёқча билан айлантириш давомида сувга суюқлик қуйилади. Дезоксирибонуклеопротеинлар ипсимон ҳолатда чўкмага туша бошлайди, уларни ёғоч таёқча билан ўраб олинади ва пробиркага солинади. Улар нуклеопротеинлар билан олиб бориладиган сифат реакциялари учун ишлатилади.

Нуклеопротеинларни ачитқидан ажратиб олиш ва уларни гидролизлаш

Нуклеопротеинларни ўрганиш учун кўпинча ачитқи замбуруғларидан фойдаланилади. Қисқа муддат давомида ачитқи замбуруғлари кислотали гидролиз қилинса, улар полипептидлар, пурин ва пиримидин асослари ҳамда рибоза, дезоксирибоза ва фосфор кислотасига парчаланadi. Натижада ҳосил бўлган маҳсулотлар махсус реакциялар ёрдамида аниқланади.

Ишнинг бориши. 2 г ачитқи замбуруғини чинни ҳовончага солиб, 3-4 томчи эфир ва 2-4 мл дистилланган сув қўшиб эзилади. Яхши эзилиши учун бир оз шиша қуқунларидан қўшиш мумкин. Ачитқи бир хил масса ҳосил бўлгунича 1-2 минут давомида эзилади. Натрий гидроксиднинг 0,4 % ли эритмасидан 8 мл қўшиб, 10-15 минут давомида эзилади. Сўнгра ҳовончадаги аралашма филтрдан ўтказилиб, филтратга 2-3 мл 5% ли ацетат қўшилади. Бунда нуклеопротеинлар чўкмага тушади. Чўкмани центрифугалаш ёки филтрлаш усули билан ажратиб олинади ва гидролиз қилинади. Чўкмани кенг пробиркага солиб, устига 6-10 мл сульфат

кислотанинг 10 % ли эритмасидан қўшилади. Совиткич сифатида узунлиги 25-30 см шиша найча ўрнатилган пробка билан беркитиб, қайнаб турган сувда 1 соат давомида гидролизланади. Гидролизатдан қуйидаги ишларни бажаришда фойдаланилади.

Элатма. Нуклеопroteinларни ачитқилардан ажратиб олмасдан, уларни гидролитик парчалаш мумин. Бунинг учун 1 г прессланган ачитқи колбага солиниб, унга 30-40 мл 5 % ли сульфат кислота эритмасидан қўшилади ва колба шиша трубка ўрнатилган тикин билан беркитилиб, 1-1,5 соат қайнатилади. Шундан сўнг колба совутилиб фильтрланади. Фильтрат билан кўрсатилган реакциялар бажарилади.

1. Полипептидлар учун фильтрат билан биурет реакцияси бажариб кўрилади. Пробиркага 1-2 мл фильтрат, 1-2 мл натрий ишқорининг 10% ли эритмаси солинади ва 3-4 томчи 1% CuSO_4 қўшиб аралаштирилади, натижада оксиллар таркибидаги пептид боғи учун хос бинафша ранг ҳосил бўлади.

2. Пурин асосларини билиш учун пробиркага 2 мл фильтратдан солинади, 5-6 томчи концентрланган аммиак томизилади, сўнг 0,5 мл кумуш нитратнинг аммиакли эритмасидан қўшилади. Бир неча минутдан сўнг, пурин асослари кумушли тузининг чўкмаси ҳосил бўлади.

3. Пентозалар учун Троммер реакцияси бажарилади. Рибоза ишқорий шароитда мис сульфатни мис гидроксидигача (CuOH) қайтаради. Пробиркага 1-2 мл фильтратдан ва шунга тенг ҳажмда натрий ишқоридан солиб аралаштирилади, 2-3 томчи мис сульфатдан қўшиб қиздирилади.

Реакция натижасида мис гидроксидининг (CuOH) қизил чўкмаси ҳосил бўлади.

4. Фосфат кислотаси учун реакция. Фосфат кислота молибдат реактиви билан сариқ кристалл фосфолибдат кислотасининг аммонийли тузини ҳосил қилади:

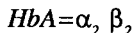


Пробиркага 1-2 мл фильтратдан солиб, тенг ҳажмда молибдат реактивидан қўшилади ва 2-3 минут қайнатилади. Натижада фосфолибдат кислотасининг аммоний тузи сариқ чўкма ҳосил бўлади.

Хромопротеинлар

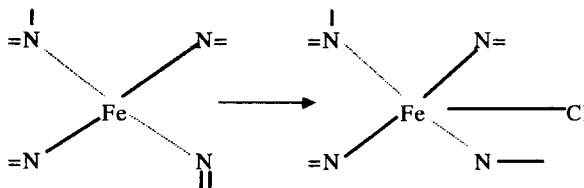
Хромопротеинлар (хромо-грекча ранг, бўёк) мураккаб оксил бўлиб, оддий оксил глобулинлар, простетик гуруҳ (оксил бўлмаган қисм) ва рангли бирикма (пигмент)дан тузилган. Турли хромопротеинларнинг оксил билан боғланган рангли гуруҳи ҳар хил органик бирикмалар синфига киради ҳамда таркиби турли металлар - темир, мис, магний, молибден ёки рух, кобальт ва бошқаларга бой. Шунинг учун улар металлопротеинлар ҳам деб аталади. Хромопротеинларнинг энг муҳим вакили - простетик гуруҳи пиррол ҳалқаларининг қўшилишидан ташкил топган порфирин структурали мураккаб оксиллардир. Бу қаторга ўсимликларнинг яшил пигменти - хлорофилл билан оксил бирикмаси, ҳайвон ва одам қони таркибидаги гемоглобин, мускул нафас олиш пигменти-миоглобин ва бир қатор нафас олиш ферментлари киради.

Гемоглобин, оксил-глобин (гистон) ва простетик гуруҳи гем деб аталадиган темир протофторфириндан иборат бўлган металлопротеин бўлиб, қизил қон таначалари-эритроцитлар таркибида бўлади. Унинг физиологик функцияси кислородни ўпкадан тўқималарга ташишдан иборат. Деярли барча умуртқалилар эритроцитларида гемоглобиннинг молекула оғирлиги тахминан 66000 га тенг. Гемоглобин тўртта айнан ўхшаш жуфт суббирликлардан ташкил топган. Катта ёшдаги одамларда асосан гемоглобин HbA структура тузилишига эга, суббирликлар α ва β деб белгиланади ва қуйидагича ёзиш мумкин.



α -суббирликлар 141 та, β -суббирликлар эса 146 та аминокислоталар қолдигидан иборат.

Шу занжирларнинг ҳар бири гем деб аталувчи простетик гуруҳга боғланган. Гем-мураккаб молекула бўлиб, тўртта азот тутувчи гетероциклик пиррол ҳалқасидан тузилган. Пиррол ҳалқалари бир-бири билан метил (-CH) туркумлари орқали боғланган, порфирин склети гем таркибида икки валентли темир атоми билан координацияловчи алоқада бўлади. Шунингдек, темир атоми гистидин қолдигидаги азот билан боғланган. Бундан ташқари пропионил қолдиқлари электростатик кучлари ҳисобига асосий аминокислоталар қолдигларидан кўпинча лизин қолдиқлари боғланади. Шундай қилиб, гем билан глобин орасидаги боғ етарли даражада мустаҳкамдир.



Тажриба микроскопик ойна устида ўтказилади, ҳосил бўлган гемин кристаллари жуда характерли кўринишда бўлганлигидан, бу реакция қонни текширувчилар учун қулай ҳисобланади.

Химиявий тузилишига кўра гемоглобинга яқин яна бир қатор темир-порфиринли протеинлар мавжуд. Улар қаторига умуртқалилар ва умуртқасизларнинг мускулларидаги нафас олиш пигменти-миоглобин киради. Бу металлопротеиннинг молекула оғирлиги 17000 га тенг, у ягона полипептид занжиридан иборат бўлиб, темир атомини тутати. Миоглобин ҳам гемоглобинга ўхшаш кислород билан қайталама бирикиш хоссасига эга. Бу қатордаги бошқа муҳим темир протеинлар ҳужайранинг цитохромлар деб аталадиган нафас олиш пигментлари гуруҳидан иборат.

Цитохромларнинг тўла ўрганилган вакили-цитохром С нинг молекула оғирлиги 13000 га тенг бўлиб, у таркибида битта темир тутати. Организмда кенг тарқалган ферментлар-масалан, каталаза таркибида тўртта темир атоми, пероксидазанинг таркибида бир атом темир бор.

Оксигемоглобин кристалларини ажратиб олиш

Керакли асбоблар: пробиркалар билан штатив; пипеткалар; центрифуга; 100 мл ли стаканлар; диаметри 6-8 ли воронка; предмет ва қоплогич ойна.

Реактивлар. 1.Янги сўйилган қуён, от ёки бошқа турдаги ҳайвон қони. 2.Диэтил эфири. 3.Аммоний сульфатнинг тўйинган эритмаси. 4.Натрий хлориднинг 0,9 % ли эритмаси. 5. 96 %ли этанол. 6. 0,1 %ли натрий хлориднинг сирка кислотасидаги эритмаси (0,1 г натрий хлорид 100 мл кислотада эритилади).

Ишнинг бориши. Пробиркага 5 мл қон олиб, унга 1 мл сув билан эфир (1:1) аралашмасидан солинади ва тўлиқ гемолиз ҳосил бўлгунча аралаштирилади. Ҳосил бўлган қизил суюқлик гемолизланган қон деб аталади. Шу суюқликка тенг ҳажмда (6 мл) аммоний сульфатнинг тўйинган эритмасидан солиб аралаштирилади ва центрифугаланади ёки филтрланади. Филтратни пробкали колбага солиб 1 соатга ёки 1 сутка совуқда қолдирилади.

Сўнгра бир томчи филтратдан предмет ойнасига томизилади ва қоплагич ойна билан ёпилган микроскопда кўрилади. Қизил рангда оксигемоглобин кристаллари призма ёки турли формадаги пластинка шаклида кўринади (бу шакл ҳайвонларнинг турига боғлиқ).

Геминни олиш реакцияси

Гемоглобин кислотали шароитда қиздирилганда парчаланади ва натрий хлорид таъсирида гем геминга айланади, яъни темир атоми билан хлор боғланади. Бунда икки валентли темир уч валентлига айланади.

Керакли асбоблар: предмет ва қоплагич ойнаси; микроскоп.

Реактивлар. 1.Натрий хлориднинг кристалли. 2.Сирка кислота.

Ишнинг бориши. Предмет ойнасига бир неча томчи қон томизилади ва 60° С дан юқори бўлмаган ҳароратда қуритилади. Қуритилган қонга бир неча натрий хлориднинг кристаллидан, 1-2 томчи сирка кислотасидан қўшиб аралаштирилади, сўнгра қоплагич ойна билан ёпилади ҳамда қайнагунча эҳтиёткорлик билан қиздирилади.

Совигандан сўнг микроскопда кўрилади, бунда гемин кристаллари ромбик шаклда (жигар рангли) кўринади.

Геминни амидопирин билан аниқлаш

Керакли асбоблар: пипеткалар, пробиркалари билан штатив.

Реактивлар. 1.Дефибринланган қон. 2.Амидопирин (пирамидон)нинг 5% ли спиртдаги эритмаси. 3.Сирка кислотасини 30% ли эритмаси. 4.Водород пероксидининг сувдаги 3% ли эритмаси ишлатишдан олдин тайёрланади.

Ишнинг бориши. Пробиркага суюлтирилган дефибринланган қоннинг эритмасидан 1-2 мл солинади ва тенг ҳажмда амидопириннинг

спиртдаги эритмасидан 10-15 томчи сирка кислотаси ва водород пероксидининг эритмасидан қўшилади. Натижада кўк-бинафша ранг ҳосил бўлади.

Гликопротеинлар

Гликопротеинлар - мураккаб оқсил бўлиб, простетик гуруҳи углеводлар ва уларнинг ҳосиласидир. Гликопротеинларнинг оқсил бўлмаган қисмларининг таркибига моносахаридлардан-глюкоза, галактоза, фруктоза; аминокислоталардан - глюкоурон, сирка, нейрамин, сульфат ва бошқалар киради.

Гликопротеинлар ҳайвон организмда кенг тарқалган. Улар деярли ҳамма тўқималарда учрайди. Уларнинг бир қисми механик функцияларини бажаришда иштирок этади, бошқалари овқатнинг ошқозонга сирғаниб тушишини ва овқат ҳазм қилишни енгиллаштиради. Шунингдек, гликопротеинларга қондаги бир гуруҳ моддалар, ферментлар, масалан, холинэстераза ва бошқалар киради. Гликопротеинлар бир қатор ўсимликлар (арпа, буғдой ва бошқалар)нинг уруғларида ҳам учрайди. Бир қатор гликопротеинларнинг простетик гуруҳи мукополисахаридлардан иборат ва улар **мукопротеинлар** деб аталади.

Бу гуруҳнинг асосий вакиллари барча тўқималарда ҳам учрайди. Улар суяк, тоғай, кўзнинг мугуз пардаси ва шишасимон танасида, сўлакда кўп учрайдиган муцинлар ва мукоидлардир. Бир қатор мукополисахаридлар (гиалурон кислота, хондроитинсульфат кислота, гепарин) организмда катта роль ўйнайди.

Сўлакдан муцинни ажратиб олиш

Сўлакда ва турли шилимшиқ безларнинг секретлари таркибида учрайдиган муцин-суюқлик юқори даражада ёпишқоқлик хусусиятига эга бўлиб, овқатнинг ошқозонга тушишини енгиллаштиради, оғизнинг шилимшиқ пардасини зарарли механик, термик ва химиявий таъсирлардан сақлайди.

Муцин-кислотали хоссага эга бўлган оқсил бўлиб, сувда яхши эримайди, ишқор ва хлорид кислотада эса осон эрийди. Муциннинг ишқорий эритмаси сирка кислота таъсирида чўкмага тушади.

Керакли асбоблар: пробиркалар билан штатив; шиша таёқча; пипеткалар.

Реактивлар. 1.Сирка кислотасининг 1% ли эритмаси. 2.Натрий ишқорнинг 10 % ли эритмаси. 3. Хлорид кислотасининг 0,1% ли эритмаси. 4.Мис сульфатнинг 1% ли эритмаси. 5.Альфа-нафтолнинг 0,2% ли эритмаси. 6.Концентрланган сульфат кислотаси.

Ишининг бориши. Учта пробиркага 2-3 мл сўлак қуйилади ва ҳар бир пробиркага 1% ли сирка кислотасидан муцин чўкмаси ҳосил бўлгунча томчилаб солинади. Кейинги жараёнда чўкма сув билан ювилади.

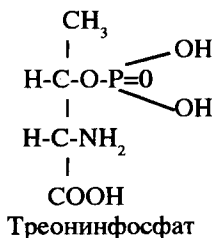
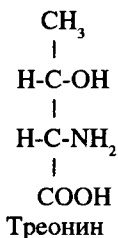
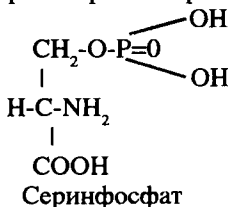
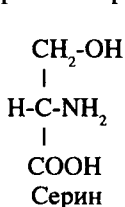
Биринчи пробиркадаги муциннинг чўкмасига 1 мл натрий ишқорининг 10% ли эритмасидан қўшиб аралаштирилади ва чўкма бутунлай эриб кетгандан сўнг биурет реакцияси бажарилади. Бунинг учун яна 10 томчи натрий ишқори ва 1-2 томчи мис сульфатнинг эритмасидан қўшилади ҳамда пробирка чайқатилади. Реакция натижасида пушти ёки бинафша ранг ҳосил бўлади.

Иккинчи пробиркага 1 мл хлорид кислотасининг 0,1% ли эритмасидан қўшилса чўкма эриб кетади.

Учинчи пробиркадаги муциннинг чўкмасига 6-8 томчи альфа-нафтол қўшиб аралаштирилади ва эҳтиёткорлик билан 1-2 мл концентрланган сульфат кислотаси қўшилади. Иккала суюқликнинг чегарасида бинафша ранг ҳосил бўлади. Бу реакция муциннинг простетик гуруҳи моносахаридлар ва уларнинг ҳосиласи ҳисобига ҳосил бўлади, яъни сульфат кислотаси таъсирида фурфурол ва оксиметилфурфол ҳосил бўлиб, альфа-нафтол билан бинафша рангли бирикмани беради.

Фосфопротеинлар

Бу оксиллар таркибида фосфат кислота (0,40-0,88 %) қолдиғини сақлайди. Оксиаминокислоталар (серин, треонин) фосфат кислота билан эфирли боғ орқали боғланиб, фосфорли бирикмаларни ҳосил қилади.



Фосфопротеинларга муҳим биологик роль ўйнайдиган қуйидаги оксиллар киради: сутдаги казеиноген (казеин), тухум сариғи оксиллари вителлин, ветиллинин ва витин, балиқ увилдириклари оксиллари, ферментлар, пепсин, фосфорилаза, фосфоглюкомутаза ва бошқалар.

Хужайра ядроси фосфопротеинлари: гистонлар ва гистон бўлмаган хроматин оксиллари протеинкиназа ферменти ва АТФ иштирокида

фосфорланиди. Бу фосфорланиш хроматин регуляциясида катта роль ўйнайди.

Фосфопротеинлар кислотали эритмаларда чўкмага тушади, сувда эримайди, суолтирилган ишқор эритмаларида эрийди.

Казеин таркибидаги фосфатни аниқлаш

Казеин-фосфопротеинларнинг вакили бўлиб, сутдан ажратиб олинади. Казеин ишқорий гидролиз қилингандан оксилга ва фосфат кислотасининг қолдиғига парчаланади.

Керакли асбоблар: пипеткалар; пробиркалар билан штатив.

Реактивлар. 1. Натрий ишқорининг 10% ли эритмаси. 2. Сульфат кислотасининг 10% ли эритмаси. 3. Молибден реактиви: 3,75 г аммоний молибдат 50 мл сувда эритилади ва 50 мл нитрат кислота қўшилади. 4. Мис сульфатнинг 1% ли эритмаси. 5. Казеин (янчилган).

Ишнинг бориши. Казеиннинг гидролизи. Пробиркага 0,1 г казеин солиб, 10 мл натрий ишқорининг 10% ли эритмасидан қўшилади ва ҳаво холодильникли пробка билан беркитилади. Кейин 10-15 минут қайнатилади ва совутилгач гидролиз маҳсулотлари учун реакция бажарилади.

1. Оксилларни аниқлаш. Оксилларни аниқлаш учун биурет реакцияси амалга оширилади. бунинг учун пробиркага 1-2 мл гидролизат 1-2 мл натрий ишқорининг эритмаси ва 2-3 томчи мис сульфатнинг эритмасидан солинади. Реакция натижасида бинафша ранг ҳосил бўлади.

2. Фосфат кислота қолдиғини аниқлаш. Пробиркага 1-2 мл гидролизатдан ва 8-10 томчи сульфат кислота эритмасидан солиб аралаштирилади, сўнгра унга 10 томчи молибден реактивидан қўшиб, қайнагунча қиздирилади. Суюқлик сариқ рангга киради-аммоний фосфомолибдатнинг сариқ чўкмаси ҳосил бўлади, бу ҳол гидролизатда фосфат кислотасининг қолдиғи борлигидан далолат беради.

Биологик объектлардан оксилларни ажратиб олиш

Оксилларнинг сифатини аниқлаш учун аввало уларни тоза ҳолда ажратиб олиш керак. Бу оксилларни биологик қийматини характерловчи белгиларидан бири. Унинг аминокислотали таркиби, уни ажратиб олинган умумий оксилларда кўрилади.

Ўсимликлардан оксилларни ажратиб олишда Т.Б.Плешков методидан фойдаланамиз.

Реактивлар: ўсимлик материали, суюқ азот, борат буфери (рН-10), натрий бисульфатнинг 0,2 % ли эритмаси, оксил спирти, сирка кислотанинг 1 %ли ва 10 %ли эритмаси, ўювчи натрийнинг 0,2 %ли эритмаси, трихлор ацетат кислотанинг 50 %ли эритмаси, ацетон, этил спирти, диэтил эфири.

Ўсимликлардан умумий оксилларни ажратиб олиш

Ўсимликларнинг турли органларида оксилларни ажратиб олишнинг турли усуллари мавжуд. Янги шифобахш сано ўсимлик материалидан, яъни барг, поя, мева ёки бошқа вегетатив органлардаги оксилларни ажратиш учун 50 - 100 г намуна олиб, совитгичда ёки суяк азот ёрдамида музлатилади. Сўнгра музлатилган намуна гомогенизаторда ёки чинни ҳовончада борат буфер эритмаси (рН-10) билан 1:4 нисбатида бир хил масса ҳосил бўлгунча эзилади. Эзиш давомида оксилларнинг эрувчанлигини ошириш мақсадида бир оз натрий бисульфатнинг 0,2 %ли эритмасидан ва кўпик ҳосил бўлмаслиги учун 3-4 томчи октил спирти кўшилади. Ҳосил бўлган гомогенат совитгичда музлатилади, сўнгра эритиб тебратувчи асбоб ёрдамида 1-2 соат давомида чайқатилади. Вақт тугагач минутага 3000 айланма тезлик билан 10-15 минут центрифугаланади. Эритма ҳажми 500 мл бўлганича ўлчов колбага қуйилади. Чўкма эса кам ҳажмдаги буфер эритма билан яна 5-6 марта экстракция қилинади. Ҳар сафар гомогенат центрифугаланиб эритмалар ўлчов колбага қуйилади. Экстракция колбадаги эритманинг умумий ҳажми дистилланган сув билан чизикчақа тўлдирилади.

Эритмага ўтган азот миқдори, ўсимлик таркибидаги умумий азотнинг 90 - 95% ини ташкил қилиши керак. Эритмадаги оксилни аниқлаш учун ундан 20 мл олиб Кьелдал бўйича азот миқдори топилади, шу билан бирга тўғридан-тўғри текширилаяётган ўсимлик материалидаги умумий азот ҳам аниқланади.

Эритмага ўтган оксилларни чўктириш учун эритма 1000 мл ли стаканга қуйилади ва сирка кислотанинг 10 % ли эритмаси ёрдамида рН 4,4-4,5 га келтирилади. Эритма рН ини қоғоз индикатор ёрдамида аниқланади. Агар муҳит кислотали бўлиб кетса, ишқор ёрдамида унинг рН ини 4,4-4,5 га келтириш мумкин. Эритма солинган стакан сув ҳаммомида 70°C да қиздирилади ва чўкмага тушган оксиллар центрифугаланиб ажратилади. Чўкмага тушган оксилларни сирка кислота билан ювилади. Бунинг учун центрифуга пробиркасига сирка кислотанинг 1%ли эритмасидан қуйиб чўкма аралаштирилади, центрифугаланади ва чўкма устидаги эритма тўкиб юборилади .

Оксилларни янада тозароқ ҳолда ажратиб олиш учун уларни қайта чўктирилади. Бунинг учун центрифуга пробиркаларига ўювчи натрийнинг 0,2 н эритмасидан қуйилади ва чўкма яхшилаб аралаштирилиб, суяклик пробиркадан стаканга қуйилади. Пробирка яна бир неча марта ўювчи натрийнинг 0,2 н эритмаси билан ювилади ва улар ҳам стакандаги суякликка қўшилади. Стакандаги суяклик сув ҳаммомида 50°C да оксиллар тўлиқ эригунга қадар аралаштириб турилади. Эритмаган заррачалар центрифугалаш йўли билан ажратилади.

Оксилларни қайта чўктириш учун оксил эритмаси бўлган стаканга 50 % ли трихлорацетат кислотасидан, эритмадаги охириги концентрация

5% бўлгунча қўшилади. Бунда чўкмага тушган оксиллар центрифугалаш билан ажратиб олинади. Центрифуга пробиркасидаги оксил чўкмасини ацетон (5-6 марта), иссиқ этил спирти (1-2 марта) ва эфир (2-3 марта) билан ювилади (эфир билан центрифуга қилинганда, центрифуга қопқоғи очик бўлиши керак). Хар гал центрифугалашдан сўнг чўкма устидаги суюқлиги тўкиб юборилади. Шу йўл билан олинган оксил препаратлари уй ҳароратида, вакуум эксикаторда қурилади ва сақланади. Оксил препаратлари таркибидаги умумий азот Кьелдал методи бўйича аниқланади. Олинган оксил препаратлари оқ ёки оч кулранг порошок бўлиб, таркибида 14-16% азот бўлади.

Оксилларни айрим фракцияларга ажратиш

Оксилларни янада чуқурроқ ўрганиш учун уларни фракцияларга ажратиш керак. Оксилларни фракцияларга ажратиш, уларни турли хил эритувчиларда эришига асосланган.

Ўсимлик тўқималаридан ажратиб олинган оксиллар кетма-кет равишда сув (альбулинлар), спирт (проламинлар) ва ишқорий эритмалари (глутенинлар) ёрдамида экстракция қилинади. Оксилларни фракцияларга ажратиш ҳам совуқ хоналарда 4° С атрофида олиб борилади.

Ишинг тартиби. Текшириладиган ўсимлик материалдан 25-50 г олиб, суюқ азот билан фиксация қилинади ва совиткичда музлатилади. Сўнгра музлатилган материал сув билан (1:4) нисбатда гомогенизация қилинади ёки чинни ҳовончада бир хил масса ҳосил бўлгунча майдаланади. Ҳосил бўлган гомоген масса қолбага ўтказилади ва махсус тебратувчи асбоб ёрдамида 1 соат чайқатилади. Бунда оксилларни эритмага тўлиқ ўтиши таъминланади. Сўнгра қолба 15-18 соатга 0°Сда совиткичда қолдирилади.

Ўсимликларнинг уруғларидан оксилларни ажратишда эса уруғлар аввал майин ун ҳолига келгунгача майдаланади. Уларнинг таркибидаги мой ва мойсимон моддалар эфир ва ацетон ёрдамида ажратилади. Ацетон порошоклар эксикаторда қурилади. Ацетон порошокдан 5-10 г олиб, 30-60 мл сув билан аралаштирилади ва механик тебраткич ёрдамида 1 соат давомида чайқатилади. Сўнгра қолба 15-18 соатга 0°С ли совиткичда қолдирилади.

Сувда эрувчи оксилларни экстракция қилиш. Бундан кейинги иш тартиби ўсимлик материали қандай бўлишидан қатъи назар бир хилда олиб борилади. Оксил эритмалари совиткичдан олингандан сўнг центрифугаланади ва чўкма устидаги суюқлик қатта стаканга қуйилади. Центрифуга пробиркасидаги чўкма эса массага нисбатан уч баробар кўп сув билан гомогенизация қилинади ва коник қолбага қўйиб 30-40 минут чайқатилади. Шундан сўнг яна центрифуга қилинади ва чўкма устидаги суюқлик олдинги стаканга қуйилади. Сув билан экстракция қилиниб,

центрифугалаш яна 4-5 марта такрорланади. Бунда сувда эрувчи оксиллар тўлиқ экстракция қилинади, чўкма эса массага нисбатан 4-5 баробар кўп ҳажмдаги калий хлориднинг 1М эритмаси билан аралаштириб совиткичда қолдирилади.

Ўсимлик тўқималарини сув билан экстракция қилинганда эритмага фақат оксиллар эмас, балки бошқа сувда эрийдиган бирикмалар, шу жумладан эркин аминокислоталар, шакарлар ва минерал тузлар ҳам ўтади. Шунинг учун олинган экстрактни кучсиз тузли эритма деб ҳисобласа ҳам бўлади. Бундай эритмага фақат сувда эрувчи оксиллар (альбуминлар) эмас, балки қисман бўлсада, тузли эритмалардаги оксиллар (глобулинлар) ҳам ўтади. Альбуминлар ва глобулинларни бир-биридан ажратиш учун экстракт дистилланган сувда диализ қилинади. Диализ вақтида кичик молекулалар моддалар, шу жумладан минерал тузлар ҳам целлофан халтача ичидан сувга чиқади. Халтачада эса фақат оксиллар қолади. Диализ охирида целлофан халтачада тузлар қолмаганлиги сабабли тузли эритмаларда эрийдиган оксиллар дарҳол чўкмага тушади, эритмада эса альбуминлар қолади. Альбуминларни тузли эритмаларда эрийдиган оксиллардан ажратиш учун целлофан халтачадаги эритма ва чўкма центрифуга пробиркаларига ўтказилади. Халтача 2-3 марта дистилланган сув билан ювилади ва у ҳам центрифуга пробиркасига қўйилади. Сўнгра 5-10 минут давомида минутига 3-4 минг тезлик билан центрифугаланади. Эритма 250 мл ли ўлчов қолбага қўйилади. Чўкма эса диситилланган сув билан 2-3 марта ювилиб центрифугаланади. Барча эритмалар ўлчов қолбага қўйилади ва дистилланган сув ёрдамида чизикча тўлдирилади. Таркибида альбумин бўлган бу эритма совиткичда сақланади.

Центрифуга пробиркаларида қолган чўкма 10-15 мл 1М калий хлорид эритмаси билан эритилади ва 250 мл ли қолбага қўйилади. Пробиркалар 2-3 марта калий хлорид эритмаси билан ювилади ва улар ҳам қолбага қўйилади. Қолбадаги суюқлик калий хлорид эритмаси ёрдамида чизикча тўлдирилади. Таркибида осонлик билан эрувчи глобулинлар бўлган бу эритма совиткичда сақланади.

Тузда эрувчи оксилларни экстракция қилиш. Калий хлориднинг 1М эритмаси билан қолдирилган ўсимлик массаси, механик тебраткич ёрдамида 1 соат давомида аралаштирилади. Сўнгра центрифугаланиб эритма ажратиб олинади. Чўкма эса яна 3-4 марта калий хлориднинг 1 мл ли эритмаси билан экстракция қилиниб, центрифугаланади. Эритмалар эса ҳаммаси дастлабки эритмага қўшилади ва ўлчов қолба чизикчага калий хлорид эритмаси билан тўлдирилади. Бу эритма глобулинлардан иборатдир.

Глобулинлар ажратиб олингандан кейин қолган чўкма этил спиртининг 80 % ли эритмаси билан экстракция қилинади. Бундан спиртда эрувчи оксиллар пролламинлар ажралади, экстракция 1 соат давом этади, сўнгра центрифугаланиб, оксил эритмалари ўлчов қолбага қўйилади.

Чўкма эса яна 3-4 марта спирт эритмаси билан экстракция қилинади ва барча эритмалар колбага қуйилади. Колба чизигигача спирт эритмаси билан тўлдирилади. Спиртли эритмалар совиткичда сақланмайди. Уларни хона ҳароратида сақлаш мумкин ва иложи борича оксил миқдори тезроқ аниқланиши керак.

Ишқорда эрувчи оксилларни экстракция қилиш. Бунинг учун центрифуга пробиркасида қолган чўкма 0,2 м борат буферда (рН-10) тайёрланган бисульфит натрийнинг 0,2% ли эритмасида эритилади. Айрим оксил фракцияларини ажратиб олиш кўп жиҳатдан ўсимлик материални эритувчида туриш вақтига боғлиқ.

Хамма оксил фракцияларини ажратиб бўлгандан сўнг қолган ўсимлик материали сув билан ювилади ва филтрланади, сўнгра қолдиқ 50-60° С қиздирилиб қурилади. Унинг таркибидаги умумий азот Кьелдал методида аниқланади.

Шундай қилиб, ўсимлик материалидан 6 хил оксил фракциялари альбуминлар, осонлик билан эрийдиган глобулин ва калий хлорид ёрдамида ажратиладиган глобулинлар; проламинлар, глютелинлар ва эрмайдиган азот ажратиб олинади. Оксил миқдорини аниқлаш учун ҳар бир колбадан (охирги фракциялардан ташқари) 20-50 мл эритма олиниб Кьелдал колбасида қуйидагилардан оксиллар аниқланади.

Биологик объектларда оксил миқдорини аниқлаш методлари ва оксиллар алмашинуви

Оксиллар миқдорини аниқлаш методлари тўқималардаги азотни текширишга асосланган. Ҳайвон тўқималари ва органлари оксилларнинг таркибидаги умумий азотнинг миқдори ўртача 16 % ни ташкил қилади, яъни 100 г оксилнинг таркибида 16 г азот бор. Бунда оксиллар таркибида азот ўрта ҳисобда 16 % бўлганида озиқ модда ва маҳсулотлардаги азот миқдори $6,25 (100:16=6,25)$ га кўпайтирилса, қабул қилинган ҳамда парчаланган оксиллар маълум бўлади.

Оксил миқдорини азот бўйича аниқлаш

Тўқималарда, органларда, биологик суюқликларда ва сувли экстрактларда азотни аниқлашда Кьелдал методининг уч хил модификацияси қўлланилади: макрометод, ярим макрометод ва микрометод.

Методнинг принципи. Тўқима ёки оксил концентрланган сульфат кислотаси ва катализатор иштирокида қуйдирилганда (минерализация) унинг таркибидаги амин, имин ҳамда бошқа турлардаги азотлар аммиакка айланади. Реакция охирида эса аммоний сульфат ҳосил бўлади ва унинг миқдори аниқланади.

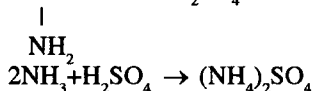
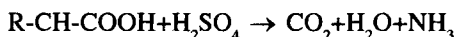
Керакли асбоблар: қайчи; скальпель; 1 ва 2 мл ли пипеткалар; 50 мл ли Кьелдал колбаси; 20 мл ли бюретка.

Реактивлар. 1. Концентранган сульфат кислотси. 2. Сульфат кислотасининг 0,1 н эритмаси. 3. Натрий гидроксидининг 0,1 н эритмаси. 4. Натрий гидроксидининг 33-40 %ли эритмаси. 5. Катализатор (пергидрол). 6. Индикатор-метилрот.

Ишнинг бориши. Биологик объектларда умумий азотни аниқлаш уч босқичда олиб борилади. Биринчи босқич оксилни минерализация қилишдан иборат. 50 мл ҳажмдаги Кьелдал колбасига 0,2 мл қон зардобии ёки 150-250 мг биологик объект солинади. Кейин эса унга 1-2 мл концентранган сульфат кислотаси қўшилади ва колба оловда қиздирилади.

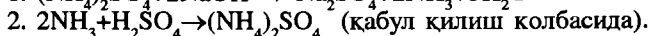
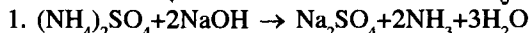
Текширилаётган объект гидролизланиб, парчаланadi. Аралашма жигар рангта кирганда колбани алангадан олиб, бир оз совутилади ва 2-4 томчи пергидрол қўшиб колбадаги моддалар чайқатилгач яна оловга қўйилади. Пергидролдан яна 1-2 марта то рангсиз минерализат ҳосил бўлгунча қўшилади.

Биринчи босқичнинг химиявий схемаси қуйидагича бўлади:



Иккинчи босқич - аммиакни ҳайдаш. Ишнинг иккинчи қисми ҳайдаш аппаратида олиб борилади. Кьелдал колбадаги қуйдирилган тўқиманинг массаси сув билан суюлтирилади ва 1 ҳайдаш колбасига солинади. Сўнгра умумий ҳажми сув билан колбанинг ярмигача етказилади. Колбага 2-4 томчи метилрот индикаторидан солиб, тешикли пробка билан беркитилади. Кейин унга воронка ва совутгич билан уланадиган томчиларни тутувчи колба ўрнатилади. 5-номерли қабул қилиш колбасига 20 мл 0,1 н сульфат кислотасининг эритмасидан солинади ва унга 2-4 томчи метилрот индикаторидан қўшилади, сўнгра бу колба узайтиргич орқали совутгичнинг бошқа учига уланади. Воронка орқали ҳайдаш колбасига 33-40% ли натрий ишқорининг эритмасидан то суюқлик сариқ рангта киргунча қўшилади (ишқорий реакция). Совутгич улангач колба қиздирилади ва аммиакни ҳайдаш бошланади. Ҳайдаш колбасидаги суюқлик то тўлиқ аммиак ҳайдалгунча қайнатилади, аммиак тамом тўлганлиги лакмус қоғози рангининг ўзгариши орқали билинади.

Иккинчи босқичнинг химиявий схемаси қуйидагича:



Учинчи босқич. Титрлаш ва ҳисоблаш. Ҳайдаш жараёни тамом бўлгандан сўнг, ҳайдаш колбасини 2-3 мл дистилланган сув билан ювиб, қабул қилиш колбасига қўшилади. Қабул қилиш колбасидаги аммиак билан боғланмай қолган сульфат кислотаси натрий ишқорининг 0,1 н эритмаси билан титрланади. Азот қуйидаги формула билан ҳисобланади.

$$X = \frac{(a - b) \cdot 1,4 \cdot 100}{C}$$

Бу ерда: X -текширилаётган объектдаги азотнинг миқдори, мг % ҳисобида; a -қабул қилиш колбасидаги 0,1 н сульфат кислотаси эритмасининг миқдори; b -аммиак билан боғланган сульфат кислотасини нейтраллаш учун сарф бўлган 0,1 н натрий гидроксиди эритмасига тўғри келади; C -тортиб олинган текширилаётган объектнинг оғирлиги, мг; 100-азотни мг % да ҳисоблаш учун умумий кўпайтирувчи.

Қондаги қолдиқ азот миқдорини аниқлаш

Керакли асбоблар: пробиркалар билан штатив; 25 мл ли Кьелдал колбаси; фотокалориметр ёки спектрофотометр; фильтр қоғоз билан воронка; 0,2 мл микропипетка; 1, 2, 5 мл ли пипеткалар; 25, 50, 100 мл ли колбалар, қайчи.

Реактивлар. 1. Қон (қоннинг цитратли ёки оксалатли аралашмаси). 2. 86 % ли этил спирти. 3. Трихлоруксус кислотасининг 20 % ли эритмаси. 4. Концентрланган сульфат кислотаси. 5. Пергидрол. 6. Аммоний сульфатнинг стандарт эритмаси: 0,2357 г туз 1 л сувда эритилади, 1 мл бундай эритмада 0,05 мг азот бор. 7. Несслер реактиви: биринчи стаканга 15 г симобнинг йодли тузидан солинади, иккинчи стаканга қуйилади, шиша таёқча билан то симобнинг йодли тузи эригунча аралаштирилади

Ишнинг бориши. Пробиркага 1,8 мл дистилланган сув ва 0,2 мл қон солинади, сўнгра 2 мл 20 % ли трихлорсирка кислотасидан қуйиб шиша таёқча билан яхшилаб аралаштиргач, 5 минут тиндирилади. Суюқлик жигар рангга киради. Пробиркалардаги суюқлик фильтр қоғоз билан филтрланади. 2 мл филтратдан олиб (яъни 0,1 мл қонга тўғри келади) Кьелдал колбасига солинади ва 2 томчи концентрланган сульфат кислота қўшилгач то оқ тутун ҳосил бўлгунча қиздирилади. Сўнгра колбани қиздиришдан тўхтаб, совугач 2 томчи пергидрол қўшилади ва колбадаги суюқлик рангсизлангунча қиздирилади. Кейин эса колбадаги суюқлик совутилади ва 2-3 мл сув қўшиб суюлтирилади, ҳажмини ўлчаб колбага солинади (колбанинг деворлари ҳам маълум ҳажмдаги сув билан ювилади). 25 мл ли колба ҳажмининг 2/3 қисмига сув қўшилади, 3 мл несслер реактивидан солиб, сўнгра колбадаги белгигача сув қўшилади.

Бошқа колбага 1 мл аммоний сульфатнинг стандарт эритмаси ва 1 томчи концентрланган сульфат кислотаси солинади ҳамда колба ҳажмининг 2/3 қисмигача сув қўшилади. Сўнгра 3 мл несслер реактивидан қўшилади ва колбадаги белгигача сув қуйилади. Колбалардаги суюқлик чайқатилгач, спектрофотометрда ўлчанади ва қуйидаги формула билан ҳисобланади:

$$X = \frac{0.05 \cdot h_1 \cdot 100}{h}$$

Бу ерда: Х-азот қолдиғи, мг %; 0,05-1 мл аммоний сульфатнинг стандарт эритмасидаги азотнинг миқдори; h-стандарт суюқликнинг оптик зичлиги экстинкцияси; h_1 -текшириляётган суюқликнинг оптик зичлиги экстинкцияси; 100-азотни мг % да ҳисоблаш учун умумий кўпайтирувчи.

Тўқималардаги оксиллар таркибига кирмаган азотни аниқлаш

Бир бўлак жигар ёки мускул тўқималар қайчи билан майдалангач, ҳовончада яхшилаб эзилади. Сўнгра ҳосил бўлган массада 500 ёки 1000 мг ўлчаб олиниб, 50 мл ҳажмли колбага солинади. Унга 20 мл дис-тилланган сув қўшиб аралаштирилади ва 26-30 минутга қолдирилади.

Шундан кейин 5 мл 20 % ли трихлорсирка кислотасидан қўшилади ва 5-10 минутга тиндирилади, сўнгра филтрланади. Кейинги жараёнда 2 мл филтратдан олиб Кьелдал колбасига солинади, унга 0,1 мл концентр-ланган сульфат кислотасидан қўшилади ва қумли ҳаммомда минерализация қилинади. Сўнгра оғир оқ тутун ҳосил бўлиши билан колбани оловдан олиб, бир оз совутилгач, 1-2 томчи пергидрол қўшилади. Яна колбани қумли ҳаммомга то рангсиз тиниқ суюқлик ҳосил бўлгунича қиздирилади. Минерализация қилиш тамом бўлгандан кейин колбага 2-3 мл сув қўшиб 25 мл ли колбага солинади, бир неча марта сув билан ювиб, колбага жойлаштирилади, яъни умумий ҳажмининг 2/3 қисмига сув қўшилади. Кейин 5 мл Несслер реактиви солинади ва колбадаги белгигача сув қуйилади.

Худди шундай шароитда контрол намуна ҳам минерализация қили-нади, яъни колбага 0,1 мл сульфат кислота ва 2 мл сув солинади. Совутил-гандан кейин 2 мл аммоний сульфатнинг стандарт эритмасидан ва 5 мл Несслер реактивидан қўшилади ҳамда ҳажми сув билан колбадаги бел-гигача оширилади. Иккала колбадаги суюқликлар яхшилаб аралаштири-лади ва ФЭК, спектрофотометр билан уларнинг оптик зичлиги аниқланади.

Азот миқдори қуйидаги формула билан ҳисобланади:

$$X = \frac{0,10 \cdot h_1 \cdot 25 \cdot 100}{C \cdot h \cdot 2}$$

Бу ерда: Х-оксил таркибига кирмаган азотнинг миқдори, мг %; 0,10-азотнинг миқдори (мг), яъни 2 мл стандарт эритманинг концентра-циясига тўғри келади; h-контрол намунанинг оптик зичлигининг экстинк-цияси; h_1 -текшириляётган суюқликнинг оптик зичлигининг экстинкцияси; 25-тўқима экстрактининг умумий миқдори; 100-мг % ҳисоблаш учун; С-экстракция учун олинган тўғиманинг оғирлиги, мг; 2-минерализация қилиш учун олинган филтратнинг миқдори.

Тўқимадаги умумий азотнинг ва оксил таркибига кирмаган азотнинг миқдорини билиб, оксиллар таркибига кирган азотнинг миқдори аниқланади.

Умумий азот-оксиллар таркибига кирмаган азот-оксиллар таркибига кирган азот.

Аминогуруҳлардаги азотни формальдегид билан титрлаб аниқлаш

Полипептидлар, оксиллар ва аминокислоталардаги эркин аминокислоталарнинг азоти **амин азоти** деб аталади. Оксил молекулаларининг структурасини ва таркибини, шунингдек, уларнинг гидролизланиш натижасида ҳосил бўлган маҳсулотларини ўрганишда, аминокислоталарнинг миқдори катта аҳамиятга эга. Амин азотларининг миқдорига қараб протеолитик фермент (катепсин)ларнинг активлигини ва оксилларнинг гидролизланиш тезлигини ўрганиш мумкин. Биологик материалларда аминокислоталарни аниқлаш организмда аминокислоталар ва оксиллар алмашинувида қўшимча характеристика беради.

Оксиллар ферментлар ёки кислоталар таъсирида парчаланганда аминокислоталар ҳосил бўлади, аминокислоталар таркибида эркин ҳолда аминокислоталар ва карбоксил гуруҳларни сақлайди. Аминокислоталарнинг миқдорини аниқлаш учун, формальдегид билан аминокислоталардаги эркин аминокислоталар метилинли ҳосиласини пайдо қилиб боғланади, шундан кейин карбоксил гуруҳлар ишқор эритмаси билан титрланади:



Ишқор билан нейтралланган карбоксил гуруҳларнинг миқдорига қараб, эритмадаги аминокислоталарда қанча миқдорда эркин ҳолда аминокислоталар борлиги ҳисобланади. Кўпчилик аминокислоталарнинг молекуласи эквивалент миқдорда амин ва карбоксил гуруҳларни сақлайди.

Керакли асбоблар: 50 мл ли колбалар; 5, 10 20 мл ли пипеткалар; 10 мл ли бюретка.

Реактивлар. 1. Глициннинг 0,25 % ли эритмаси. 2. Фенолфталеиннинг 0,1 % ли эритмаси. 3. Натрий ишқорининг 0,1 н эритмаси. 4. Формол аралашмаси, бу реактив анализ қилишдан олдин тайёрланади, 6 мл 20 % ли формальдегиднинг эритмасига 1-2 томчи фенолфталеин солинади

ва 0,1 н натрий ишқорини эритмасидан бюретка орқали томчилаб, аралашма пушти ранг ҳосил қилгунча қўшилади.

Ишнинг бориши. Колбага 3 мл 25 % ли глицин эритмаси солиб, 1-2 томчи фенолфталеин қўшилади ва 0,1 % ли натрий ишқори эритмаси билан бюретка орқали то пушти ранг ҳосил бўлгунча титрланади. Сўнгра нейтралланган глицин эритмасига пипетка билан 2 мл формол аралашмадан қўшилади (эритманинг пушти ранги йўқолади). 0,1 н натрий ишқорининг эритмаси билан пушти ранг ҳосил бўлгунча титрланади. Титрлаш учун сарф бўлган 0,1 н. натрий ишқори эритмасининг миқдори белгилаб олинади.

Ҳисоблаш. Мисол учун 3 мл 0,25 % ли нейтралланган глицинни титрлаш учун 0,1 н ишқор эритмасидан 0,88 мл сарф бўлган, ваҳоланки, 1 мл 0,1 н ишқор эритмасига 1,4 мг азот тўғри келади. Шунинг учун титрлаш учун сарф бўлган 0,1 н ишқор эритмаси миқдорини 1,4 га қўпайтириб, 3 мл 0,25 % ли глицин эритмасига қанча миқдор амин азоти борлиги топилади.

$$0,88 \cdot 1,4 = 1,232 \text{ мг ёки } 0,001232 \text{ г.}$$

Демак, 3 мл 0,25 % ли глицин эритмасида ёки 0,0075 г аминокислотада шунча азот бор. Агар 0,0075 г глицин таркибида 0,001232 г бор бўлса, унда 100 г глицинда X г азот бор.

$$\begin{array}{l} \text{Бундан } 0,0075 \text{ г } \underline{\hspace{1cm}} 0,001232 \text{ г} \\ \qquad \qquad \qquad 100 \text{ г } \underline{\hspace{1cm}} X \end{array}$$

$$X = \frac{100 \cdot 0,001232}{0,0075} = 16,4 \text{ г азот}$$

Демак, глицин таркибида 16,4 % амин азоти бор.

Шунга ўхшаган текширишларни гидролизланган оксиллар билан ҳам олиб бориш мумкин. Бунинг учун колбага 3 мл 0,25 % ли гидролизатдан солиб, юқорида глицин учун ёзилган вариантда иш олиб борилади.

Оксил миқдорини биурет методи бўйича аниқлаш

Оксиллар ишқорий шароитда мис атомлари билан реакцияга киришиб кўк-бинафша ранг ҳосил қилади. Бу рангнинг интенсивлиги эритмадаги оксил миқдорига қараб ўзгаради. Биурет усули Кьелдал усулига нисбатан тез ва осонлик билан бажарилади. Бу усул фақат оксил миқдори юқори бўлган материалларни текширишда қўлланилади.

Керакли асбоблар: штатив; пробиркалар; 1, 2, 5, 10 мл ли пипеткалар; спектрофотометр.

Реактивлар. 1.Альбумин оксилининг стандарт эритмаси, бу эритманинг 1 мл да 10 мг альбумин оксили бор. 2. Биурет реактиви, 0,15 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ва 0,6 г $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (натрий тартарат-калий ёки сегнет тузи) тузидан олиб, 50 мл сувда эритилади. Шу эритмага 30 мл 10 % ли

натрий ишқори эритмасидан солиб аралаштирилади ва эритмада қайтар реакцияси кетмаслиги учун 0,1 г КJ нинг тузидан қўшиб, эритма ҳажми сув қўшиб 100 мл га етказилади.

Ишнинг бориши. Калибрланган график тузиш учун альбумин оксидининг стандарт эритмасидан фойдаланилади, бу эритманинг 1 мл 10 мг альбумин оксидини сақлайди. Намуналар қуйидагича тайёрланади.

Пробиркалар номери	Оксид миқдори, мг	Оксид эритмасининг ҳажми, мл	H ₂ O, мл
1	2	0,2	1,8
2	4	0,4	1,6
3	6	0,6	1,4
4	8	0,8	1,2
5	10	1,0	1,0
6	12	1,2	0,8
7	16	1,6	0,4
8	20	2,0	-
9	0	-	2,0

Ҳамма пробиркаларга 8 мл дан биурет реактивидан қўшилади ва хона ҳароратида қолдирилади. Ўлчашни тўққизинчи пробиркадаги сувга солиштирган ҳолда олиб борилади, бу пробирка оксиддан бошқа ҳамма компонентларни сақлайди. 30 минутдан кейин спектрофотометрда 540 нм тўлқин узунлигида ўлчанади. Олинган натижалар калибрланган график тузишда ишлатилади. График тузиш учун ордината ўқига оптик зичлик катталиги, абцисса ўқига-шу оптик зичликка мос оксид миқдори қўйилади.

Текшириладиган эритмада оксид миқдорини аниқлаш учун юқорида кўрсатилган шароитда иш олиб борилади. Бунинг учун текшириладиган оксид суюлтирилиб, ундан 2 мл олинади, сўнгра 8 мл биурет реактивидан қўшилади.

Текшириладиган оксиднинг оптик зичлигига қараб, графикдан оксид миқдори аниқланади. Оксид миқдори мг % да ҳисобланади.

Оксид миқдорини микробиурет методи билан аниқлаш

Реактивлар. 1. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -2,1% ли эритмаси. 2. KOH -30% ли эритмаси. 3. А эритма. 4. Бу эритмани тайёрлаш учун $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -2,1% ли эритмасидан 1 қисм, 9 қисм KOH-30% ли эритмасидан олиб аралаштирилади. Бу эритма фойдаланишдан олдин тайёрланади.

Ишнинг бориши. Текшириладиган объектда оксид миқдорини аниқлаш учун альбумин оксидининг стандарт эритмасидан калибрланган график тузилади. Графикни тузиш учун таркибида 5 мкг-120 мг оксид сақлаган намуналар тайёрланади. Бу намуналарга 2,5 мл дан А эритма қўшилади, 30 минутдан кейин спектрофотометрда 310 нм тўлқин узунлигида ўлчанади.

Текширилаётган эритмада оксил миқдорини аниқлаш учун шу эритмадан 0,5 мл олиб, унга 2,5 мл эритмадан қўшилади ва юқорида баён қилинган шароитда ўлчанади.

Оксил миқдорини Лоури усули билан аниқлаш

Оксил миқдорини аниқлашда бу метод жуда кенг қўлланилади. Бу метод юқори сезгирликка эга бўлиб, намуналардаги 10-100 мкг бўлган оксил миқдорини аниқлаш мумкин. Метод ароматик аминокислоталарни Фолин реактиви билан биргаликда биурет реакциясининг пептид боғлари ҳисобига ҳосил қилган рангларга асосланган.

Оксил миқдорини аниқлаш учун калибрланган график тузилади. Бу график тузиш учун альбуминнинг стандарт эритмаларидан фойдаланилади.

Керакли асбоблар: штатив; пробиркалар; 0,1, 1,5 ва 10 мл ли пипеткалар; спектрофотометр.

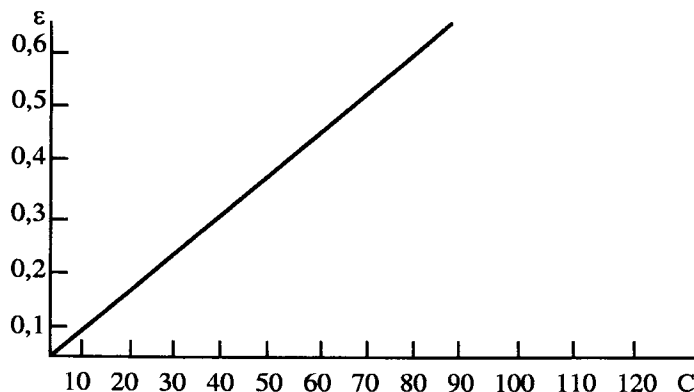
Реактивлар. 1. Натрий ишқорининг 0,1 н эритмаси. 2. А эритма: 2% ли натрий карбонатнинг 0,1 н ли натрий ишқоридаги эритмаси. 3. В эритма: 0,5 % ли мис сульфатнинг 1 % ли натрий тартаратдаги эритмаси. Эритмани тайёрлаш учун 10 г натрий тартарат тузи 300 мл сувда эритилади. Сўнгра эритмага 5 г мис сульфат қўшилади ва ҳажми 1 литрга етказилади. 4.С эритмаси: бу эритмани тайёрлаш учун 49 мл А эритмага 1 мл В эритмадан қўшилади. Бу эритма анализ қилишдан олдин тайёрланади. 5.Фолин реактиви ёки Е эритмаси. Эритмани тайёрлаш учун 2 литрли колбага 100 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ва 25 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ туздан олиб, 700 мл сувда эритилади. Сўнгра эритмага 50 мл 85 % ли H_3PO_4 кислота ва 100 мл концентранган HCl кислотадан қўшилади. Кейин эса шу аралашма солинган колбани қайтарувчи совитгичга улаб, 10-12 соат қайнатилади. Қайнатиб бўлгач 150 г литий сульфат, 50 мл сув, бир неча томчи бромли сув қўшилади. Ортиқча бромни чиқариб юбориш учун 15 минут совитгичсиз қайнатилади. Аралашма хона ҳароратигача совитилиб, филтрланади ва ҳажми 1 литрга етказилади. Фолин реактивининг кислоталиги фенол-фталейн иштирокида 0,1 н натрий ишқори билан титрланиб аниқланади. Реактив қоронғи идишга солиб сақланади. Оксилни аниқлашда кислоталиги 1 н бўлган Фолин реактиви ишлатилади.

Ишнинг бориши. Калибрланган график тузиш учун альбуминнинг стандарт эритмаси тайёрланади. Бунинг учун 4 мг альбуминни 10 мл сувда эритилади, бу эритманинг 0,1 мл 40 мкг оксил миқдорини сақлайди. Пробиркаларга 10-120 мкг альбумин оксили эритмаси солинади. Буни тайёрлаш қуйидаги жадвалда кўрсатилган.

Пробиркалар номери	Оқсил миқдори, мкг	Оқсил эритмаси, мл	Дистиλλанган сув, мл
1	120	0,3	0,1
2	110	0,275	0,125
3	100	0,250	0,150
4	90	0,225	0,175
5	80	0,2	0,2
6	70	0,175	0,225
7	60	0,150	0,250
8	50	0,125	0,275
9	40	0,1	0,3
10	30	0,075	0,325
11	20	0,05	0,35
12	10	0,025	0,375
13	-	-	0,4

Ҳар бир пробиркага 2 мл С эритмасидан солиб, яхшилаб аралаштирилади ва хона ҳароратида 10 минут қолдирилади. Сўнгра 0,2 мл Фолин реактивидан қўшилади, пробиркаларни чайқатиб, 30 минут хонада қолдирилади. Кейин спектрофотометрда 750 нм тўлқин узунлигида оқсилсиз пробага қарши ўлчанади. Олинган маълумотлардан график тузилади. Бунинг учун ординат ўқиға оптик зичлик катталиғи, абсцисс ўқиға-оқсил миқдори мкг қўйилади.

Биологик объектда оқсил миқдорини аниқлаш учун, пробиркага 0,4 мл текширилаётган оқсил (50 ёки 100 марта суюлтирилган) солиб, юқорида ёзилган шароитда иш олиб борилади. Оптик зичлиғига қараб графикдан оқсил миқдори аниқланади, кейин суюлтирилмаган объектидаги оқсил миқдори мг да ҳисобланади.



Калибрланган график. Абсцисса ўқиға –намуналардаги оқсиллар миқдори, мкг (С); Ордината ўқиға-оптик зичлик (Е).

Оқсилларни гидролизлаш ва уларнинг аминокислотали таркибини аниқлаш

Оқсилларнинг аминокислотали таркибини аниқлаш учун аввало улар гидролизланиши керак. Сўнгра хроматография усули ёрдамида уларнинг аминокислотали таркиби аниқланади.

Реактивлар: тоза оқсил намунаси. 6 н хлорид кислота эритмаси.

Ишнинг бориши. Аввало оқсиллар гидролизланади. Бунинг учун 50-100 мг тоза оқсил тортиб олинади ва шиша ампулага солинади, унга 10 мл 6 н хлорид кислота қўшилади. Сўнгра ампула азот билан тўлдирилиб, унинг очик томони эритиш йўли билан беркитилади. Қайнаётган сувда гидролиз 24 соат давом этади. Гидролиз тамом бўлгач, ампула соvuтилади ва эритма чинни косачага солинади. Чинни косачадаги эритма сув ҳаммомида буғлатилади. Қуруқ косачага 3-4 томчи дистилланган сув қўшиб яна қуригунча буғлатилади. Бу жараён косачадаги кислотали хусусияти йўқолгунча 3-4 марта такрорланади. Ампулани музхонада сақлаб қўйиш ҳам мумкин. Кислотали гидролизда триптофан аминокислотаси парчаланиб кетади.

Хроматограммага томизиладиган оқсил гидролизатининг миқдори, оқсил таркибидаги аминокислоталарнинг миқдорига боғлиқ бўлади. Агар оқсил таркибида аминокислоталар кўп бўлса, кам ҳажмдаги гидролизат ва аксинча, аминокислоталар миқдори кам бўлса, кўп ҳажмдаги гидролизат олинади. Одатда олинган намуна таркибидаги оқсил миқдори 0,6 мг дан 2 мг гача бўлади. Гидролизатни хроматограммага томизиш ва аминокислоталарни ажратиш юқоридаги баён қилинган усул ёрдамида амалга оширилади.

Аминокислоталарни юпқа қаватли хроматография усулида аниқлаш

Юпқа қаватли хроматография усулида оқсил гидролизатлари ёки аминокислоталар аралашмасидан барча аминокислоталарни ажратиш мумкин. Юпқа қават сифатида кўпинча силикагель, алюминий оксиди, целлюлоза ҳосилалари ва бошқа моддалардан, тайёр ҳолдаги махсус пластинка (силуфол)лардан фойдаланилади.

Бу метод иккита аралашмайдиган суюқликлар фазасида (ҳаракат қилмайдиган сув фазаси ва ҳаракатланувчи органик эритувчи фазаси) аминокислоталарнинг турлича бўлиниш даражасига асосланган. Аминокислоталар сувли фазада кўп эриса, органик эритувчиларнинг фронтида секин ҳаракатланади. Барча аминокислоталарнинг силжиш тезлиги турличадир. Силжиш тезлигининг коэффициенти қуйидагича ҳисобланади.

$$Rf = \frac{a}{b}$$

Бу ерда: *a*-аминокислота томизилган жойидан то шу аминокислота ҳосил қилган доғнинг ўртасигача бўлган масофа, см; *b*-эритманинг фронти, см.

Аминокислоталар бўлингандан кейин пластинка қуритилади ва нингидрин эритмасидан пуркалади. *a*-аминокислоталар нингидрин билан ўзаро таъсир этиб оксидлангач, аммиак, альдегид ва карбонат кислотага парчаланади, нингидрин қайтарилади. Қайтарилган нингидрин ҳамда нингидриннинг бошқа молекуласи аммиак билан реакцияга киришиб, кўк-бинафша рангли берувчи мураккаб мурексид бирикмасини ҳосил қилади.

Керакли асбоблар: хроматография камераси; термостат; 0,1 мл ли пипетка.

Реактивлар. 1. 0,1 М цитрат буфери, pH-5,3. 2. 0,1 % ли нингидриннинг ацетондаги эритмаси. Хроматография пластинкаларидаги рангнинг тургун бўлиши учун нингидринли реактивга кадмий қўшилади. Бу эритма 5:1 нисбатда тайёрланади:

1. 1 % ли нингидриннинг ацетондаги эритмасидан –5 қисм. 2. Кадмий ацетатининг аралашмаси; бу аралашмани тайёрлаш учун 50 мл сирка кислота ва 100 мл сув олиб аралаштирилади ҳамда бу аралашмада 1 г кадмий ацетат эритилади. Сўнг ушбу эритмадан –1 қисм олинади. 3. Оқсил гидролизати. 4. “Силуфоль UV-254” пластинкаси.

Ишнинг бориши. “UV-254” пластинкасини пастки тарафидан 2-2,5 см ўлчаб олиб, оддий қалам билан страт чизиги чизилади. Текшири-лаётган оқсил гидролизатлари бир-биридан 1,5-2 см оралиқ масофада томизилади. Сўнг бу оқсил гидролизатларидан 10-20 мл олиб, томчилаб томизилади ва доғ иссиқ ҳаво билан қуритилади- хроматография каме-расига вертикал ҳолатда қўйилади. Хроматографияланиш махсус камера-ларда олиб борилади, эритувчи сифатида 0,1 М цитрат буфери pH-5,3 ишлатилади. Эритувчи камерага 1-1,5 см қалинликда қўйилади.

Эритувчи пластинка баландлиги 4/5 қисмига кўтарилганда, пластинка камерадан олинади ва иссиқ ҳавода қуритилади. Шундан сўнг пластинкага эҳтиёткорлик билан 1 % ли нингидринни ацетондаги эритма-сидан пуркалади. Пластинкани 105°C да термостатда 10 минут давомида қиздирилади. Натижада аминокислоталар кўк-бинафша доғлар ҳолида кўринади. Сўнгра ҳар бир аминокислотани юқорида кўрсатилган формула ёрдамида силжиш тезлиги коэффициенти (*R_f*) ҳисобланади.

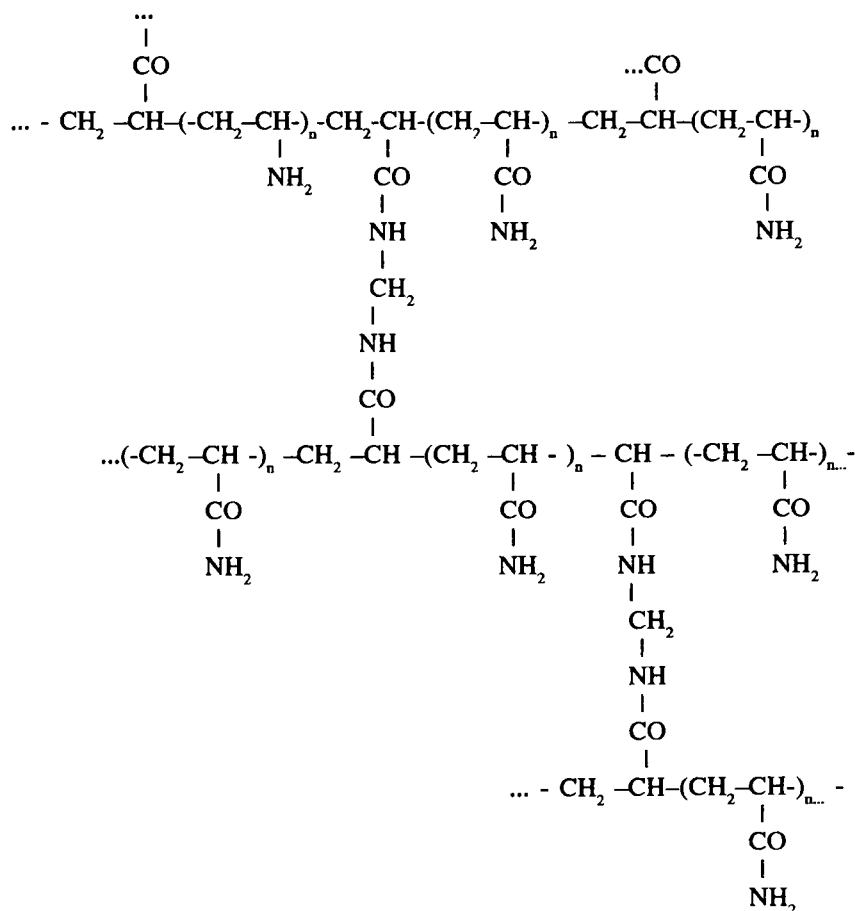
Текширилаётган оқсил гидролизати билан бирга контрол (стандарт) эритмалар ҳам хроматография қилинади. Бу текширилаётган намунадаги аминокислоталарни тезда аниқлашга имкон беради. Шуни таъкидлаб ўтиш керакки, юпқа қаватли хроматография усулида аминокислоталар сифат жиҳатдан баҳоланади ва уларнинг миқдорини аниқлашга имкон бўлмайди.

Оқсилларни фракцияларини полиакриламид гелида электрофорез усули билан аниқлаш

Оқсилларни электрофорези аналитик мақсадларида қўлланилади. Диск-электрофорез усули-оқсилларни маълум концентрацияли ва маълум молекулалар ғалвирли гелдаги бўлинишидир. Диск-электрофорезни амалга оширишда полиакриламид гели қўлланилади. Полиакриламид гели уч хил қисмдан ташкил топган:

1) катта ғалвирли гелнинг старт қисми; 2) катта ғалвирли концентровчи гел; 3) кичик ғалвирли бўлувчи гел.

Полиакриламид гели-акриламид $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ва N,N метиленбисакриламиднинг $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{NH}_2$ сополимеризацияланиш маҳсулотидир.



Гелнинг ёпишқоқлиги, мустаҳкамлиги ва эластиклиги полиакриламидни полимеризацияланиш ва тикилиш даражасига, шунингдек тикилишда иштирок этган N,N^1 -метиленбисакриламиднинг миқдорига боғлиқ. Гел устунча шаклида маҳкамланган шиша трубкаларда полимеризация қилинади. Сополимеризацияланиш реакцияси катализаторлари сифатида оксидловчи-қайтариловчи системалар ишлатилади, улар эркин радикаллар манбаи ҳисобланади, масалан: персульфат аммоний $(NH_4)_2S_2O_8$ ва N,N,N,N_1 -тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД): $(CH_3)_2=N-CH_2-CH_2-N=(CH_3)_2$.

Электрод эритмалари, яъни буфер эритмалари, электродлар билан гелларнинг сиртки қисмларида ток ўтказувчи вазифасини бажаради, бундай ҳолатларда буферларнинг рН ва таркиби турлича бўлади. Электрофорез усули жуда юқори сезгирликка эга. Бу усул билан қон зардоби оксилларнинг 30 дан ортиқ фракцияларини аниқлаш мумкин.

Керакли асбоблар: Электрофорез учун аппарат органик ойнадан ясалган бўлиб, иккита электроднинг резервуарлардан иборат, юқори ва пастки, ҳар бирининг ҳажми 1,5 л. Иккала резервуарларнинг қўмир электродлари бўлиб, бу электродларга доимий ток уланади. Ўзгармас ток манбаи сифатида УИП-1 прибори ишлатилади.

Реактивлар. 1. А – эритмаси: 100 мл колбага 48 мл 1 н HCl , 36,3 г трис ва 0,46 мл ТЕМЕД солинади, эриб бўлгандан кейин колбанинг белгисигача сув солинади. Эритма рН 8,9 га тенг бўлиши керак. 2. В-эритмаси: 100 мл колбага 30,0 г акриламид ва 0,8 г метиленбисакриламид солиб, 70-80 мл дистилланган сувда эритилади ва филтрланади, сўнгра эритманинг ҳажми дистилланган сув қўшиб 100 мл га етказилади, сўнг яхшилаб аралаштирилади. 3. С-эритмаси: 0,14 г аммоний персульфат 100 мл дистилланган сувда эритилади, бу эритмани ишлатишдан аввал тайёрланади. (4. Электрод буфери: 6,0 г трис ва 28,8 г глицин дистилланган сувда эритилади ва ҳажми сув қўшиб 100 мл га етказилади, рН-8,3. Фойдаланишдан олдин 10 марта суюлтирилади. 5. Бўёқ-индикаторнинг эритмаси: бромфенол кўкнинг 0,001% ли дистилланган сувдаги эритмаси. 6. Оксил фракцияларини бўйаш учун амидо-шварц реактиви ишлатилади. Амидо-шварц 10 В ни 1% ли эритмаси 7% ли сирка кислотасининг эритмасида тайёрланади. 7. Сирка кислотасининг 7% ли эритмаси. 8. Қон зардоби.

Ишининг бориши. Гелни тайёрлаш. Тоза ва қуруқ трубкаларнинг бир учини лейкопластир ёпиштириб беркитилади ва резинали ҳалқачалар кийгизилади, сўнгра штативга ўрнатилади.

Алоҳида колбага ёки стаканга 1 қисм А эритмадан, 2 қисм В эритмадан, 4 қисм С эритмадан ва 1 қисм дистилланган сув олиб аралаштирилади. Тайёрланган аралашмада ҳар бир трубкаларга пипетка билан 2,5 мл дан солинади. Гелнинг усти бир хил текис бўлиши ва

кислород ўтишининг олдини олиш учун капилляр ёрдамида 0,2-0,3 мл дистилланган сувни аралашма устига қават қилиб қуйилади. Трубкалардаги гелларни полимеризацияланиш учун 30 минут хона ҳароратида ёки термостатда 30°C да 15-20 минут сақланади. Полимеризацияланиш тамом бўлгандан кейин, гел билан қават қилиб қуйилган сув филтёр қоғоздан қирқиб тайёрланган лентачалар билан олинади ва гелнинг юқори қисми электрод буфери билан ювилади.

Анализ қилишга ишлатиладиган оксил эритмаси гел тайёрлаш учун қўлланиладиган буфер эритмасидан тайёрланади. Оксил эритмасининг концентрацияси 1-5 мкг/мл бўлиши керак. Масалан: қон зардобини текшириш учун 3 мкл қон зардоби (оксил микдори тахминан 200 мкг) 0,15 мл гел тайёрлаш учун ишлатиладиган буфер эритмаси билан аралаштирилади ва зичлигини ошириш учун концентрацияси 20-25 % бўлгунча сахароза ёки глицерин қўшилади, ҳар бир трубкага 10-100 мкл тайёрланган оксил эритмасидан солинади. Шундан сўнг трубкалар охиригача электрод буфери билан тўлдирилади.

Электрофорезни олиб бориш. Электрофорез холодильникида олиб борилади. Электрод буферлари ишлатишдан аввал ҳарорати +4°C га келтирилади. Электрофорез аппарати ҳам совутилади. Юқориги идишдаги буфер эритмасининг 500 мл га 1 мл бўёқ-индикатор, 0,001 % ли бромфенол қўқ эритмасидан қўшилади. Аппаратнинг қопқоғини ёпиб, электродлар ўзгармас ток манбаи билан уланади, пастки электрод анод (+), юқори электрод катод (-) бўлиб хизмат қилади.

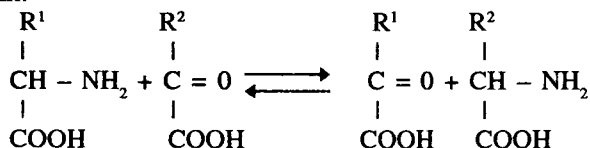
Ҳар бир трубкага 0,5-1,0 мА ток берилади (20-30 минут) кейин уни ҳар трубка учун 2-5 мА га етказилади. Оксил фракцияларининг бўлиниши 2-3 соат давом этади, яъни бўёқ трубканинг пастки учига 3 мм қолганда ток манбаи ўчирилади. Электрод буферлари аппарат идишларидан бошқа идишларга қуйиб олинади ва трубкалар бураб чиқарилади. Трубкалардан гелни чиқариш учун шприцга дистилланган сув олиб, игна билан трубка деворлари ҳамда гел орасига юборилади ва аста-секин гел чиқариб олинади. Геллардаги оксил зоналарини бўйиш учун амидо-шварц 10 В эритмаси пробиркаларга солинади ва 10-15 минутта қолдирилади. Шундан кейин бошқа идишга қуйилади. Геллар 7% ли сирка кислотасининг эритмаси билан ювилади. Гелнинг оксилсиз қисмларини рангсизлантириш учун қўп марта шу эритма билан ювиш лозим. Рангсизлантириш жараёни 10-12 соат давом этади. Сўнгра оксил фракциялари бор зоналар рангининг интенсивлигига ва уларнинг жойлашишига қараб электрофореграммалар чизилади.

Оксиллар электрофореграммаларининг кўриниши.

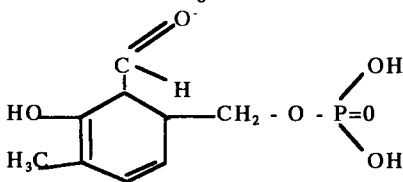


Переаминлаш реакцияси

Аминогуруҳни аминокислоталардан эркин аммиак шаклида ажралиб чиқмасдан α -кетокислотага кўчирилиши **переаминланиш** ёки **транс-аминланиш** деб аталади. Реакцияни умумий шаклда қуйидагича ёзиш мумкин.



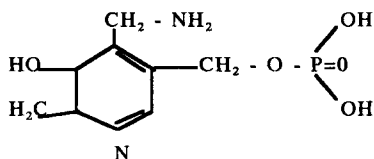
Переаминланиш жараёни барча тўқималарда кенг тарқалган ферментлар-аминотрансферазалар иштирокида боради. Аминотрансферазалар пиридоксальфосфат протеинлар бўлиб, уларнинг коферменти оралик фосфопиридоксальдир (витамин B_6).



Пиридоксальфосфат

Переаминланиш реакцияси давомида пиридоксальфосфат пиридоксаминфосфатга айланади, сўнгра аминокислотага кўчирилади ва яна пиридоксальфосфатга айланади.

Переаминлаш реакцияси тўқималарида кенг тарқалган. Барча аминокислоталар переаминланиш реакциясида иштирок этади. Глутамат, аспарагин, аланин билан бу реакция тез ўтади. Глицин, анилин, лейцин, изолейцин, гистицин, триптофан, фенилаланин ва тирозин қийинроқ переаминланади.



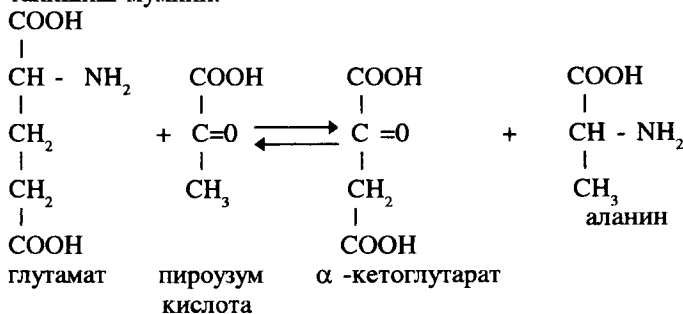
Пиридоксаминфосфат

Переаминланиш реакцияси азот аламашинувида алоҳида аҳамиятга эга. Биринчидан, бу реакция натижасида α - кетокислоталардан янги аминокислоталар синтезланади. Иккинчидан, переаминланиш реакцияси аминокислоталар парчаланишидаги усуллардан ҳисобланади.

Фермент препаратини тайёрлаш $+4^{\circ}\text{C}$ да олиб борилади. Фермент препаратини олиш учун бирорта ҳайвон сўйилиб, скелет мускули кесиб олинади ва қайчи билан майдаланади. Ҳосил бўлган тўқима бўтқасини гомогенизатор стаканига солиб, 1:5 нисбатда 0,1 % ли KHCO_3 эритмасидан қўшиб 2 минут давомида гомогенизатор билан майдаланади. Гомогенат тўрт қават дока орқали филтрланади ва у тажриба учун ишлатилади. Тажрибани олиб бориш учун пробиркаларга қуйидаги схема реакцияси аралашмалари тайёрланади:

Пробирка-ларнинг номери	CH_2JCOOH ни KHCO_3 даги эритмаси, мл	Глютамин кислота, мл	Пироузум кислота, мл	H_2O , мл	Гомогенат, мл
1	0,5	0,5	0,5	-	1,5
2	0,5	0,5	0,5	-	1,5
3	0,5	-	0,5	-,5	1,5

Переаминланиш барча аминокислоталарнинг аминогуруҳини - кетоглутарат кислотага кўчириш орқали уларнинг дезаминланишини таъминлайди. Ҳосил бўлган глютамин кислота глутаматдегидрогеназа таъсирида аминогуруҳини йўқотади, NH_3 ни ажратади. Бу реакция қайтар бўлиб, қайтадан α - кетоглутарат кислотага айланади. Мускулдаги фермент иштирокида, глютамин ва пироузум кислота мисолида переаминланиш жараёни билан танишиш мумкин.



Пераминланиш реакциясини қандай борганлигини билиш учун пироузум кислотасининг переаминланиш жараёни тўхтатилади. Натижада қолган пироузум кислотаси салицил альдегиди билан тўқ сарик рангни ҳосил қилади. Переаминланиш реакциясини тўхтатиш учун моноиод сирка кислотаси иштирокида инкубация қилинади.

Керакли асбоблар: пробиркалар билан штатив; сув ҳаммоми; қайчи; гомогенизатор; 1,2 мл ли пипеткалар.

Реактивлар. 1. Калий бикарбонатнинг (KHCO_3) 0,1% ва 2% ли эритмалари. 2. Глютамин кислота эритмаси 6 мг глютамин кислота 1 мл 2% ли KHCO_3 эритмасида эритилади. 3. Пироузум кислота эритмаси, 4,6 мг пироузум кислотаси 1 мл дистилланган сувда эритилади. 4. Моноиод сирка кислотасининг калий бикарбонатдаги эритмаси, 0,002 М CH_2JCOOH эритмаси 0,1% ли KHCO_3 эритмасида тайёрланади. 5. Калий ишқорининг тўйинган эритмаси. 6. Салицил альдегидининг спиртдаги 2% ли эритмаси. 7. Учхлорсирка кислотасининг 10% ли эритмаси.

Ишнинг бориши. Бу ишда фермент манбаи сифатида мускул тўқимасининг гомогенати ишлатилади. Гомогенат филтрати юқорида баён қилинганидек тайёрланади. Биринчи пробиркага 1 мл учхлорсирка кислотаси эритмасидан солинади, сўнгра тўқима гомогенати филтратидан қўшилади. Бу кислота таъсирида ферментатив реакция бўлмайди. Иккинчи ва учинчи пробиркаларга тўқима гомогенатидан қўшиб, аралаштирилади ва $37-38^\circ\text{C}$ да инкубация қилинади. Инкубация 90 минут давом этади, ҳар 5-10 минутда чайқатиб турилади.

Инкубациядан кейин пробиркаларга 1 мл дан учхлорсирка кислота эритмасидан қўшиб, ферментатив реакция тўхтатилади ва 10 минутдан кейин ҳамма пробиркалардаги аралашма филтрланади. Филтрат салицил альдегиди билан пироузум кислотасини аниқлашга ишлатилади. Бунинг учун учта пробирка олиб, 1-номерли пробиркага аввалги биринчи пробиркадаги филтратдан 1 мл, 2-номерли пробиркага иккинчи пробиркадаги филтратдан, 3-номерли пробиркага учинчи пробиркадаги филтратдан 1 мл солинади. Сўнгра ҳамма пробиркаларга 1 мл дан КОН нинг тўйинган эритмасидан ва 0,5 мл 2% ли салицил альдегидининг эритмасидан солинади. Пробиркалардаги суюқликлар чайқатиб аралаштирилади. Шундан кейин пробиркаларни 10 минут $37-38^\circ\text{C}$ ли сув ҳаммомида инкубация қилинади. Ҳамма пробиркалардаги ҳосил бўлган ранглар солиштирилади ва бу ердаги рангларга қараб переаминланиш жараёни қандай борганлигини билиш мумкин. Олинган натижалардан хулоса ёзилади.

IV БОБ. ЛИПИДЛАР

Липидлар иккита катта синфга бўлинади: ёғлар (нейтрал ёғлар) ва липоидлар (ёғсимон моддалар).

Липидлар бир қатор органик эритувчиларда, масалан-этанол, эфир, хлорофром, бензол ёки петролей эфирида яхши эрийди, сувда эса эримайди. Липидлар химиявий табиатига кўра бир неча гуруҳларга бўлинади:

I. Ёғ кислоталари.

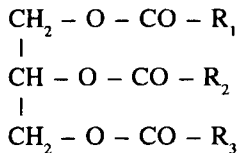
II. Глицеринли липидлар: а) нейтрал ёғлар; б) фосфорглицеридлар.

III. Глицеринсиз липидлар: а) сфинголипидлар; б) алифатик спиртлар ва мумлар; в) стероидлар.

IV. Бошқа синф моддалари билан боғланган липидлар: а) липопротеинлар; б) протеолипидлар; в) фосфатидпептидлар; д) липополисахаридлар.

Липидлар тўқима ва ҳужайраларда муҳим функцияларни бажаради. Ёғлар организмда оксидланганда энергия ажралиб чиқади (1 г ёғ оксидланганда 9,3 ккал). Липидлар биологик мембраналарнинг структура элементи ҳисобланади. Организмда липидлар оксиллар билан комплекс бирикмалар –липопротеинлар ҳосил қилади.

Стеринлар қатор биологик актив моддалар – витаминлар, гормонлар, ўт кислоталарнинг ҳосил бўлишида иштирок этади. Ёғлар – уч атомли спирт глицерин ва юқори ёғ кислоталарининг мураккаб эфиридир. Ёғлар қуйидаги умумий тузилишга эга:



Бунда: $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3$ – ёғ кислоталарининг радикаллари.

Табиий ёғлар таркибига тўйинган ва тўйинмаган ёғ кислоталарининг қолдиқлари киради (пальмитин, стерин, олеин, линолен ва бошқалар). Таркибида бирдан ортиқ қўш боғ бўлган тўйинмаган ёғ кислоталар кўпинча ўсимлик мойларида, оз миқдорда ҳайвонлар ёғида ҳам учрайди. Ёғлар таркибидаги тўйинмаган ёғ кислоталари – линоленат, арахидонат - ҳужайрадаги оксидланиш - қайтарилиш жараёнларининг бориши учун ва шунингдек, простагландинларнинг биосинтези учун муҳим роль ўйнайди.

Ёғларнинг эриши ва эмульсия ҳосил қилиши

1) 5 та пробиркага 10 томчидан ўсимлик мойи томизилади. Биринчи пробиркага 2 мл бензол, иккинчи пробиркага 2 мл ацетон, учинчи пробиркага 2 мл бензин, тўртинчи пробиркага 2 мл этил спирти ва бешинчи пробиркага 2 мл сув қуйилади. Мойларни турли хил эритувчиларда

эриш даражаси аниқланади. 2) 4 та пробирка олиб, биринчи пробиркага 1 мл сув, иккинчи пробиркага 1 мл 1% ли оксил эритмасидан, учинчи пробиркага 1мл суюлтирилган совун, тўртинчи пробиркага 1мл натрий карбонатнинг 10% ли эритмасидан солинади. Ҳар бир пробиркага 5 томчидан ўсимлик мойидан қўшилади ва яхшилаб аралаштирилади. Биринчи пробиркадан бошқа ҳамма пробиркаларда турғун эмульсия ҳосил бўлади.

Реактивлар: тозаланган ўсимлик мойи, бензол, бензин, сирка кислота, этил спирти, оксил эритмасининг 1% ли эритмаси, суюлтирилган совун, натрий карбонатнинг 10% ли эритмаси.

Ёғларни аниқлашда қўлланиладиган сифат реакциялари

Ёғларни сифат анализ қилишда бир қатор реакциялардан фойдаланилади. Буларга осьмий ёрдамидаги рангли реакция, мой доғини ҳосил қилиш, совунланиш реакцияси ва галлоидлар реакциясини мисол қилиб кўрсатиш мумкин.

Рангли реакция. Микроскоп ойнаси устига 1 томчи мой томизилади, унинг устига осьмий кислотасининг 1 % ли эритмасидан 1 томчи қўшилади. Мой қора ранг беради.

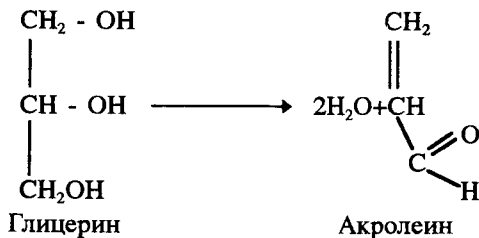
Мой доғи. Кунгабоқарнинг мағзини олиб қоғозда эзилса, мой доғи ҳосил бўлади. Қоғоз қиздирилганда ҳам доғ йўқолмайди. Бу ҳақиқатда ҳам мой борлигидан дарак беради.

Галлоидлар. Бу реакция айниқса тўйинмаган мой кислоталари кўп бўлган мойларга характерлидир. Пробиркага 1-2 томчи мой ва 1-2 мл эфир солинади. Унинг устига 1-2 томчи бромли сув қўшилади ва яхшилаб аралаштирилади. Бромли сувнинг сариқ рангининг тез йўқолиши тўйинмаган ёғ кислоталари борлигини кўрсатади.

Реактивлар: тозаланган пахта мойи, осьмий кислотасининг 1% ли эритмаси, эфир, бромли сув.

Ёғ таркибидаги глицеринни аниқлаш (акролеин реакцияси)

Акролеин мой таркибидаги глицериндан ҳосил бўлади. Бу сувсизлантирувчи моддалар (калий гидросульфит, борат кислота, магний сульфат) ёрдамида амалга оширилади. Акролеин этилеин қаторидан энг оддий альдегиддир.



THE UNITED STATES OF AMERICA

IN SENATE
January 10, 1906.

REPORT
OF THE
COMMISSIONER OF THE GENERAL LAND OFFICE
FOR THE YEAR 1905.

WASHINGTON:
GOVERNMENT PRINTING OFFICE:
1906.

Approved for publication by the Board of Geographic Names, July 1, 1905.

Approved for publication by the Board of Geographic Names, July 1, 1905.

Approved for publication by the Board of Geographic Names, July 1, 1905.

Approved for publication by the Board of Geographic Names, July 1, 1905.

Approved for publication by the Board of Geographic Names, July 1, 1905.

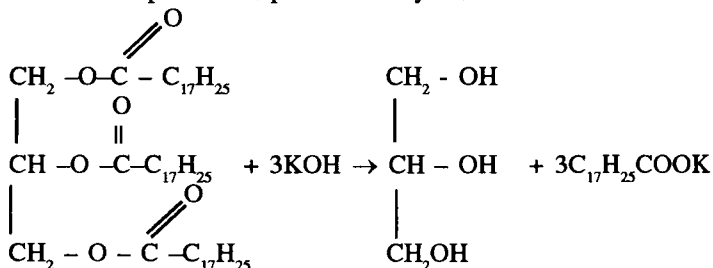
Approved for publication by the Board of Geographic Names, July 1, 1905.

Approved for publication by the Board of Geographic Names, July 1, 1905.

Ёғларнинг совунланиш сони

Бир грамм ёғ таркибидаги эркин ва боғланган ёғ кислоталарини нейтраллаш учун сарфланган калий ишқори миқдори мойларнинг совунланиш сони деб аталади.

Ёғлар химиявий жиҳатдан бирмунча турғун бирикмалардир, лекин ишқор таъсирида гидролиз қилинганда эфир боғлари осон узилиб, натижада ёғ кислоталар ва глицерин ҳосил бўлади.



Ёғлар ва мойларда совунланиш сони қуйидагича бўлиши мумкин: мол ёғи-190-200, қўй мойи – 192-198, чўчка мойи -193-200, каноп мойи –187-195.

Ўсимлик мойларининг совунланиш сони ўсимлик тури, ташқи факторлар таъсирида ўзгариши мумкин. масалан, тропик ўсимликлардан кокос, пальма ва бошқа ўсимликлар мойининг совунланиш сони анча юқори бўлади.

Керакли асбоблар: 50 мл ли колба; ҳаво совутгичли пробка; бюретка; 2, 1,5 мл ли пипеткалар; сув ҳаммоми.

Реактивлар. 1.Ўсимлик мойи ва ҳайвон ёғи. 2. 0,5 н калий гидроксидининг спиртдаги эритмаси. 3. Хлорид кислотасининг 0,5 н эритмаси. 4.Фенолфталеиннинг 0,1 н ли спиртдаги эритмаси.

Ишнинг бориши. Биринчи колбага (тажриба намунаси) 0,5 г ўсимлик мойи ёки ҳайвон ёғи, иккинчи колбага (контрол намунаси) –0,5 мл дистилланган сув ва ҳар бир колбага бюретка орқали 15 мл 0,5 н калий гидроксидини эритмасидан солинади. Колбани ҳаво совутгичли тикан билан беркитилади ва 30–40 минут қайнаб турган сув ҳаммомига қўйилади. Сўнгра колбаларга 4 томчидан фенолфатеин қўшилади ва то пушти ранг йўқолгунча 0, 5 н хлорид кислотасининг эритмаси билан титрланади. Совунланиш сони қуйидаги формула билан ҳисобланади.

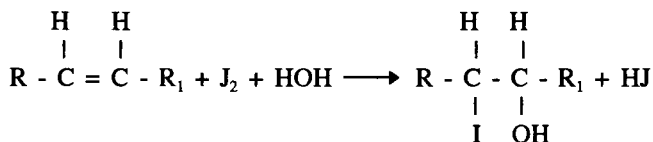
$$X = \frac{(b - a) \cdot K \cdot 28,05}{C}$$

Бунда X-совунланиш сони; b-контрол намунани титрлаш учун сарф бўлган 0,5 н хлорид кислотаси эритмасининг ҳажми, мл; a – тажриба намунасини титрлаш учун сарф бўлган 0,5 н хлорид кислота эритмасининг

ҳажми, мл; 28,05 – калий гидроксидининг мг даги миқдори бўлиб, бу 1 мл 0,5 н хлорид кислотасининг эритмасига тўғри келади; K – 0,5 н хлорид кислотаси эритмасининг титрини тўғрилаш коэффициенти; C – ёғнинг оғирлиги, г.

Ёғларнинг йодли сонини аниқлаш

100 г ёғни бириктириб олган йоднинг грамм миқдори билан ифодаланадиган сон ёғларнинг йодли сони деб аталади. Бу сон ёғлар таркибига кирадиган мой кислоталарнинг тўйинмаслик даражасини ифодалайди. Йодни бириктириб олиш реакцияси қуйидагича боради:



Реакцияга киришмай ортиб қолган йод натрий гипосульфит билан титрланади.

Йодли сон қанча катта бўлса, ёғ шунча суёқ бўлади. Баъзи бир ёғлар ва мойларнинг йодли сони қуйидагича бўлади; молларда 38-46, қўйларда 31-46, чўчқаларда 50-70, пахта мойида 110, зиғир мойида 174. Бу сон ёғлар таркибидаги тўйинмаган ёғ кислоталар миқдорини кўрсатади, чунки йод молекуладаги қўш боғ ўрнига бирика олади.

Керакли асбоблар: 50 мл ли қолба; бюретка, 0,2, 1,5 10 мл ли пипеткалар.

Реактивлар. 1. Ўсимлик мойи. 2. 96% ли этил спирти. 3. 0,1 н йоднинг спиртдаги эритмаси (тайёрланиши: 12,691 г йод 1 л 96% ли этил спиртида эритилади). 4. 0,1 н натрий гипосульфитнинг эритмаси. 5. Крахмалнинг 1% ли эритмаси.

Иш тартиби. Биринчи қолбага (тажриба намунаси) 0,1-0,2 г ўсимлик мойидан ўлчаб олиб, иккинчи қолбага (контрол намунаси)– 0,1-0,2 мл сув солинади ва ҳар иккала қолбага 5 мл дан спирт қўшилади. Мой эригандан кейин қолбаларга пипетка билан 10 мл 0,1 н йоднинг спиртдаги эритмасидан қўшиб, қолба пробка билан беркитилади ва чайқатилади ҳамда 15 минут қоронғи жойда сақланади. Сўнгра 0,1 н натрий гипосульфит эритмаси билан оч сариқ ранг ҳосил бўлгунча титрланади, кейин 1 мл 1% крахмал эритмасидан қўшиб қўқ ранг йўқ бўлгунча титрланади.

Йодли сон (x , г) қуйидаги формула ёрдамида аниқланади.

$$X = \frac{(b - a) \cdot K \cdot 0,01269 \cdot 100}{C}.$$

Бунда: b –контрол намунани титрлаш учун сарф бўлган 0,1 н натрий гипосульфит эритмасининг ҳажми, мл; a –тажриба намунасини титрлаш

учун сарф бўлган натрий гипосульфит эритмасининг ҳажми, мл; К – 0,1 н натрий гипосульфит эритмасининг титрини тўғрилаш коэффициенти; 0,01269-йоднинг граммдаги миқдори, бу миқдор 1 мл 0,1 н натрий гипосульфит эритмасига эквивалентдир; 100-100 грамм ёғ учун ҳисоблаш коэффициенти; С-олинган ёғнинг оғирлиги, г.

Биологик объектлардан умумий липидларни ажратиш ва миқдорини аниқлаш

Методнинг принципи. Умумий липидлар тўқималардан хлорофром ва метанол аралашмаси билан экстракция қилиниб, нолипид бошқа қолдиқлардан сув ёки кучсиз тузларнинг эритмаси билан ювилади, қурилади ва липидлар чўкмаси аналитик торозиларда ўлчанади. Умумий липидларни аниқлаш Кейтс М. (1975) методига асосланган.

Керакли асбоблар: гомогенизатор; центрифуга; цилиндр; қайчи; бюкс ёки стакан; 1, 2,5 мл ли пипеткалар.

Реактивлар. 1.Хлорофром. 2. Метанол. 3. 1-аралашма, бу аралашма хлорофром ва метанолдан тайёрланади, аралашма липидларни экстракция қилиш учун 1:2 нисбатдаги ҳажми тайёрланади. 4. 2-аралашма, хлорофром-метанол-сув, бу қуйидаги нисбатда тайёрланади: 1:2:0,8. 5. Қон плазмаси. 6.Ўсимлик материали.

Ишнинг бориши. Центрифуга стаканларига 1 мл қон плазмаси ёки 1 г ўсимлик материали ва 3,75 мл 1-аралашмадан солинади, сўнг 30-60 минут давомида чайқатилиб турилади. Сўнг 10 минут 3000 айл/мин тезликда центрифуга қилинади ва экстрактни бошқа пробиркага солинади. Чўкмага 4,75 мл 2-аралашмадан қўшиб экстракция қилинади ҳамда иккала экстрактларни қўшиб юборилади. Шу экстрактга 2,5 мл хлорофром ва 2.5 мл дистилланган сув қўшилади. 10 минут 3000 айл/мин тезликда центрифуга қилинади. Хлорофромли қават шприц ёки пипетка билан олинади ва бошқа идишга солинади, ҳажми аниқлангач тенг ҳажмда бензол қўшилади. Хлорофромли липидлар эритмаси олдиндан оғирлиги ўлчанган бюксларга ёки стаканларга солинади ва термостатга 60°C га қўйилади. Қуритиш доимий оғирликка эга бўлгунча давом эттирилади.

Липид чўкмасининг оғирлиги аналитик торози билан ўлчанади ва ўлчаб олинган тўқимадаги липидларнинг миқдори фоиз ҳисобида қуйидаги формула билан ҳисобланади.

$$X = \frac{m \cdot 100}{P}$$

Бунда m-липидлар чўкмасининг оғирлиги, г; Р – липидларнинг анализ қилиш учун олинган тўқиманинг оғирлиги, г.

Ёғ микдорини Сокслет усулида аниқлаш

Бу усул мой микдорини аниқлашда кенг қўлланилади. У турли органик эритувчилар ёрдамида ўсимлик материалларидан мойни ажратиб олишга асосланган.

Иш тартиби. Ўсимлик уруғлари (масалан чигит) қобиғидан тозаланиб, мағзи бир хил оғирликкача қурилади ва ҳавончада майдаланиб, 5-10 г ли қоғоз пакетларга солинади. Пакет осонлик билан Сокслет аппаратиغا сиғадиган бўлиши керак. Сўнгра пакет 2 соат давомида 90-100° С да қурилади, совигаҳ экстракторга солинади. Сокслет аппарати эри-тувчи қуйилган колба экстрактор ва сув совитгичидан иборат.

Олдиндан тортилган ва массаси маълум бўлган колбага ҳажмининг 2/3-3/4 қисмига тенг эфир қуйилади ва экстрактор билан уланади. Совитгич улангач сув ҳаммоми ишга туширилади. Сув ҳаммоми ҳарорати шундай бўлиши керакки, бунда ҳар бир соатда эфир билан ўсимлик материални 8-10 марта тўлиқ равишда юйиб тушиши керак. Одатда, сув ҳаммомининг ҳарорати 45-50° С атрофида бўлади. Мойнинг тўлиқ ажралиши материалдаги мой микдорига боғлиқ бўлиб, 6-10 соат давом этади. Мой тўлиқ ажралгандан сўнг колба аппаратдан ажратиб олинади, эфир ҳайдалади ва колба қуритгич шкафта 90-100° С қурилади. Кейин колба яна тортилиб, мой микдори аниқланади.

$$X = \frac{(A - B) \cdot 100}{B}$$

X-хом мой микдори, фоиз ҳисобида, A-мойли колба массаси, г. B-қуруқ колба массаси, г. B-ўсимлик материалнинг вазни, г.

Реактивлар: эфир ва ўсимлик материали.

Биологик объектларда ўсимлик липидларнинг фракцион таркибини аниқлаш

Кейинги йилларда липидларнинг фракцион таркибини аниқлашда юпқа қаватли хроматография усули кенг қўлланилмоқда, умумий липидлар таркибидagi мойсимон мураккаб моддалар силикагелда яхши ажралади.

Иш тартиби. Тайёр силуфол пластинка олиб, эни 4-5 см қилиб қайчида қирқилади ва 1,0-1,5 см қолдириб қаламда старт чизиғи чизилади. Тажриба ўтказиш учун олдинги ишда ажратиб олинган хом мойдан фойдаланилади. Эфирли экстрактдаги липидлар концентрацияси 15-20 % га етказилади. Юпқа қаватли хроматограмманинг старт чизиғига капилляр ёки микропипетка ёрдамида липидлар эритмаси томизилади. Агар липидлар концентрацияси камроқ бўлса, хроматограмма ҳавода ёки фен ёрдамида қуритилиб 2-3 марта қайта томизилади. Хроматограмма пластинкаси герметик ёпиладиган стакан ёки камерага туширилади. Стакан тагида 0,3-0,5 см қалинликда эритма қуйилади. Стакан ички томонидан эритма

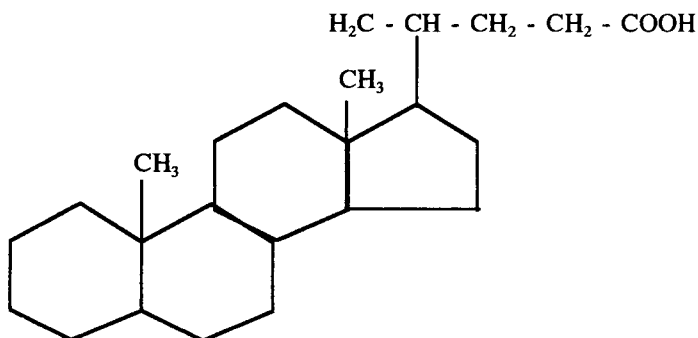
буғлари билан тўйинтирилган фильтр қоғоз билан ўралган бўлиши керак. Бу эритмани хроматограмма бўйлаб тез кўтарилишига имкон беради. Эритма гексан, диэтил эфир, сирка кислотанинг 73:25:2 нисбатидаги аралашмасидан иборат бўлади. Эритма 15-18 см баландликка кўтарилганда тажриба тўхтатилади. Пластика камерада олинадиган ва мўрили шкафда ёки фен ёрдамида қурилади. Қуриган пластинкага фосфолибдатнинг 10%ли эритмасидан пуркалади ва 80-100°C ҳароратда кўк доғлар ҳосил бўлгунча қурилади. Старт чизиғидан бошлаб ҳар хил липидлар қуйидагича жойлашади: 1-фосфолипидлар, 2-идентификация (ажрамай-диган) қилинмайдиган липидлар, 3-холестерол, 4-моноглицеридлар, 5-диглицеридлар, 6-эркин юқори молекулали мой кислоталари, 7-триглицеридлар, 8-стеридлар. Старт чизиғига яқин жойдан эса углеводлар ўрин олади.

Реактивлар: силуфол пластинкалари, липидлар экстракти, гексан, диэтил эфир, сирка кислота.

Ўт кислоталарининг сифат реакцияси

Ўт кислоталари стероид тузилишга эга бўлиб, тўла тўйинган стерил ҳалқаси ва 5 углеродли ён шохчадан тузилган. Ўт кислоталарининг тузилиши холестеринга ўхшаш бўлиб, холанат кислотасининг ҳосилларидир.

Сафро таркибида асосан ҳолат кислота, дезоксихолат кислота, митохондат кислота, хенодезоксихолат кислоталари учрайди. Бу ўт кислоталар эркин ҳолда бўлмай, глицин ёки таурин билан бирикиб, ўша кислоталар шаклида сафро таркибига киради. Уларнинг энг муҳимлари гликохолат, гликодезоксихолат, таурохолат ва тауродезоксихолат кислоталардир. Сафро таркибига кирувчи ўт кислоталари ёғларнинг ҳазм қилиш жараёнида муҳим функцияларни бажаради. Улар эмульгаторлар ҳисобланади, липазани активлайди ва ёғ кислоталарининг сўрилиш жараёнида иштирок этади.



Холанат кислота

Ўт кислоталарини очишда оксиметилфурфурол қўлланилиб, у ўт кислоталар билан қизил ранг ҳосил қилади. Оксиметилфурфурол фруктоза билан концентрланган HCl ёки H_2SO_4 кислота таъсир этганда ҳосил бўлади.

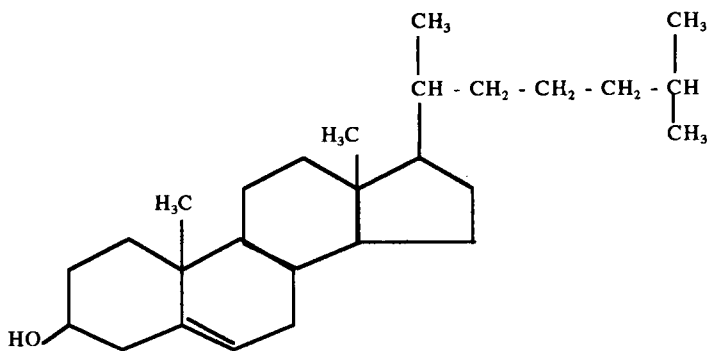
Керакли асбоблар: 1,2 мл ли пипеткалар, пробиркалари билан штатив.

Реактивлар. 1.Ўтнинг сувли эритмаси (1:2). 2.Сахарозанинг 5% ли эритмаси ёки фруктозанинг 3% ли эритмаси. 3.Концентрланган сульфат кислота.

Ишнинг бориши. Куруқ пробиркага 10 томчи суюлтирилган сафро суюқлиги солинади ва 1-2 томчи сахароза ёки фруктоза эритмасидан қўшиб чайқалади. Эҳтиёткорлик билан пробирка деворидан тенг ҳажмда концентрланган сульфат кислота қуйилади. Суюқликлар чегарасида пурпур ҳалқаси ҳосил бўлади, кейин қизил бинафша рангни ҳосил қилади.

Орган ва тўқималарда холестерин миқдорини аниқлаш

Холестерин – циклопентанопергидрофенантренни ҳосиласи бўлиб, таркибида 27 углерод атоми тутадиган кўп ҳалқали тўйимаган спиртдир. Холестерин структурасидаги 3-углерод атомида битта гидроксил, 5 ҳамда 6- углерод атомлари орасида битта қўшбоғ, 10 ва 13 углеродларда CH_3 (метил гуруҳи) гуруҳлари, 17-углерод атомида 8 углеродли углевод-родлар занжири бор. Холестеринни эмпирик формуласи- $\text{C}_{22}\text{H}_{46}\text{O}$ (мол. оғирлиги 386).



Холестерин

Холестерин-қуритилган ҳайвон организми оғирлигининг 0,25-0,30 % ни ташкил этади. Холестерин эркин ёки эфирлар ҳолида нормал шaroитда организмда оз миқдорда учрайди, патологик ҳолатларда эса холестериннинг миқдори ортади ва гиперхолестеринемияга олиб келади. Холестерин миқдорининг ортиши сарик, жигар циррози, нефроз ва уремия касалликларида учрайди. Эндокрин касалликларида микседема, кретинизм

ва диабет, авитаминоз касалликларда ҳам холестериннинг миқдори кўпаяди.

Базедов касаллигида, анемияда гипохолестеринемия кузатилади. Холестерин моддалар алмашинувини бошқаришда муҳим аҳамиятга эга бўлган ҳужайра мембраналарининг тузилишида иштирок этади.

Методнинг принципи. Холестерин миқдорини аниқлаш Либерман-Бунхардни рангли реакциясига асосланган. Холестериннинг хлороформли эритмаси сирка ангидриди ва концентрланган сульфат кислотаси билан яшил ранг ҳосил қилади, ранг ҳосил бўлишининг интенсивлиги холестерин концентрациясига пропорционалдир.

Керакли асбоблар: 25 мл ли колба; 1, 2, 5 ва 10 мл ли пипеткалар; цилиндр; сув ҳаммоми.

Реактивлар. 1.Этанол-диэтилэфир аралашмаси 3:1 нисбатда. 2.Хлороформ. 3.Сирка ангидриди ва концентрланган сульфат кислотаси. 4.Холестериннинг стандарт эритмалари, бу эритманинг 1 мл да 0,1 мг холестерин бор.

Ишнинг бориши. Майда қилиб қирқилган жигар ёки буйрак тўқимасидан 200-300 мг ўлчаб олиб, ҳажми 25 мл бўлган қопқоқли колбага солинади ва 15 мл спирт эфирли аралашмадан қўшилади. Колбадаги суюқлик аралаштирилгач, қайнатиб олинади. Аралашма қайнагунча сув ҳаммомида қолдирилади. Аралашма совугандан кейин колбага яна спирт-эфирли аралашмадан колба белгисигача қўшилади. Колбадаги аралашма чайқатилади, сўнгра фильтр қоғоз орқали филтрланади ва қайнаб турган сув ҳаммомида қуригунча парлантирилади.

Парлантириб бўлгандан кейин колбадаги қолдиқ 10 мл хлороформда эритилади. Рангли реакция қилиб кўриш учун пробиркага 5 мл холестериннинг хлороформдаги эритмасидан солиб, 1 мл сирка ангидрид ва 4 томчи H_2SO_4 қўшилади. Яхшилаб аралаштирилган аралашма 30 минут қоронғу жойда қолдирилади. Ҳосил бўлган рангнинг интенсивлиги оптик зичлик катталигига қараб аниқланади. Оптик зичлиги спектрофотометрда 656 нм тўлқин узунлигида ўлчанади. Холестерин миқдори калибрланган графикдан аниқланади, калибрланган графикни тузиш учун холестериннинг стандарт эритмасидан турли концентрация олиб, рангли реакцияси бажарилади ва оптик зичлиги ўлчанади.

Тўқимадаги холестерин миқдори (мг % да) қуйидаги формула билан ҳисобланади:

$$X = \frac{mVV_2 \cdot 100}{PV_1V_3}$$

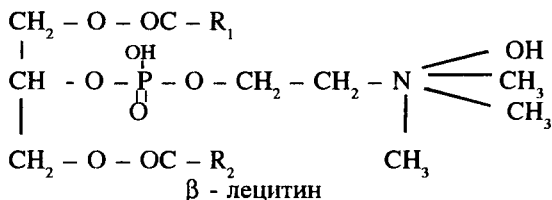
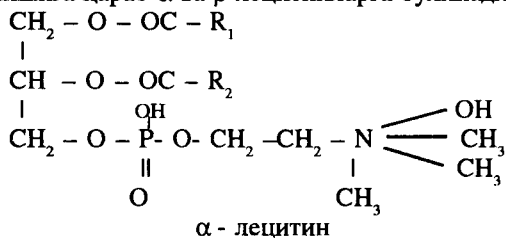
Бунда: m-намунадаги холестерин миқдори, мг; V-спирт-эфирли аралашманинг ҳажми (25 мл), V_1 -аниқлаш учун олинган спирт-эфирли экстрактнинг ҳажми (5 ёки 10 мл), V_2 -холестерин хлороформдаги эрит-

масининг умумий ҳажми (10 мл), V_3 –рангли реакция учун олинган холестериннинг хлороформдаги эритмаси (5 мл), Р-тўқиманинг оғирлиги, г.

Бу метод билан намуналардаги холестериннинг миқдорини 0,05 дан 0,5 мг гача аниқлаш мумкин.

Товуқ тухуми сариғидан лецитинни ажратиб олиш

Лецитин фосфолипидларга (фосфатидилхолинларга) кириди. Лецитин гидролизланганда глицерин молекуласи, икки молекула ёғ кислотаси, фосфат кислота молекуласи ва азотли асос холинга ажралади. Холинфосфат кислотаси қолдигининг ҳамда таркибидаги кислоталарнинг бириктишига қараб α ва β -лецитинларга бўлинади.



Бунда: R_1, R_2 – ёғ кислоталарнинг қолдиқлари.

Керакли асбоблар: пробиркалар билан штатив; пипеткалар; 100 мл ли стакан, шиша таёқча.

Реактивлар. 1. Товуқ тухумининг сариғи. 2. Этил спирти. 3. Ацетон. 4. Кадмий хлориднинг тўйинган эритмаси (спиртда тайёрланади).

Ишнинг бориши. Стаканга тахминан тухум сариғининг 1/5 –1/6 қисми солинади ва шиша таёқча билан аралаштирилиб туриб 10 мл иссиқ спирт қўшилади. Стакандаги суюқлик совугандан кейин қуруқ пробиркага фелтрланади. Фелтрат тиниқ бўлиши керак.

Лецитиннинг шу спиртли фелтрати билан бир қатор реакциялари бажарилади.

1. Ацетон билан чўктириш. Қуруқ пробиркага 2-3 мл ацетон солинганча, лецитиннинг спиртдаги эритмасидан томчилаб қўшилади. Натижада чўкма ҳосил бўлади, сабаби лецитин ацетонда эрмайди.

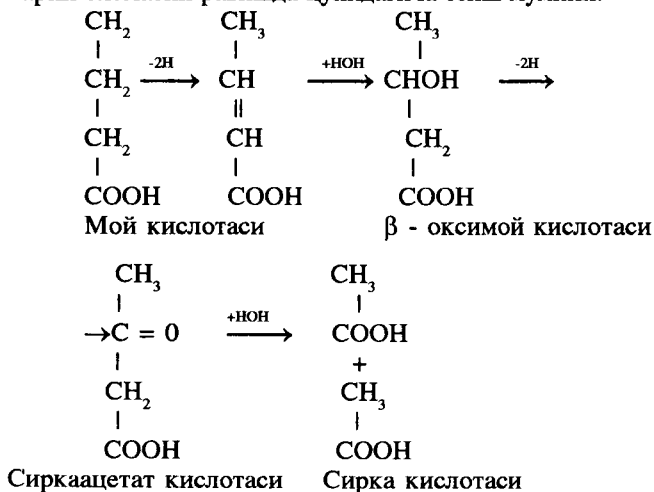
2. Лецитиннинг эмульсия ҳосил қилиши. Бунинг учун пробиркага 2-3 мл лецитиннинг спиртдаги фелтратдан солиб, томчилаб дистилланган

сув қўпилади. Натижада лецитиннинг сувдаги турғун эмульсияси ҳосил бўлади.

3. Кадмий хлорид билан чўктириш. Пробиркага 1 мл лецитиннинг спиртдаги эритмасидан солиб, томчилаб кадмий хлориднинг эритмасидан қўпилади. Лецитин кадмий хлорид билан бирикма ҳосил қилиб, оқ ҳолида чўкмага тушади.

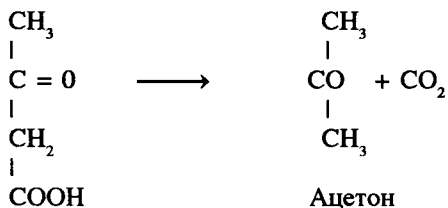
Сийдикдаги ацетон таначаларини аниқлаш

Одам ва ҳайвон тўқималарининг таркибига кирадиган олий ёғ кислоталарида углерод атомлари жуфт сонда бўлади. Тўқималарда олий ёғ кислоталари парчаланганда ёғ кислотаси аввал капрон, мой кислотасига, у ўз навбатида икки молекула сирка кислотасига парчаланади. Бу реакцияларни схематик равишда қуйидагича ёзиш мумкин.



Сирка ацетат кислота, β - оксимой кислота ва ацетондан иборат бу бирикмалар келиб чиқадиган манба ёғ кислоталардир. Нормал организм қон плазмасида кам миқдорда ацетон (кетон) таначалари учрайди. Бир қатор касалликларда, масалан, қанд касаллигида, яъни организмда углеводлар захираси камайганда ёғларнинг оксидланиши тезлашиб, кетон таналар миқдори ортиб кетади. Натижада тўқималарда ва қонда β - оксимой кислотаси ва сирка кислотани ацетати йиғила бошлайди, бир қисм сирка ацетат кислотаси декарбоксилланиб, ацетон ҳосил қилади.

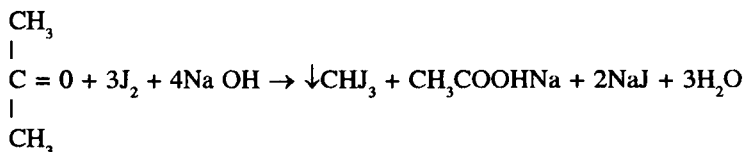
Ацетон сиркаацетат кислотаси ва β - оксимой кислотаси, **ацетон** ёки **кетон таначалари** деб аталади. Ацетон таначаларининг қонда ва сийдикда ортиб кетиши биохимиявий метод билан аниқланади.



Керакли асбоблар: пробиркалари билан штатив; пипеткалар.

Реактивлар. 1. Натрий ишқорининг 10% ли эритмаси. 2. Йоднинг калий йоддаги эритмаси. 3. Таркибида ацетон бор сийдик (0,5 л сийдикка 5 мл ацетон қўшилади).

Ишнинг бориши. Ацетон ишқорий шароитда йод билан ўзаро таъсир этиб, йодоформасини ҳосил қилади, буни сариқ рангли чўкма ҳосил бўлишидан ва характерли ҳидидан билиш мумкин. Реакцияни қуйидагича ёзиш мумкин.



Пробиркага 1 мл текширилаётган сийдикдан солинади ва 1-2 томчи натрий ишқорининг эритмасидан ва 3-4 томчи йодни калий йоддаги эритмасидан солинади. Реакция натижасида сариқ чўкма ва йодоформанинг характерли ҳиди ҳосил бўлади.

Сийдикда сирка ацетат кислотасини аниқлаш

Сирка ацетат кислотасининг енол формаси, темир хлорид билан ўзаро таъсир қилиб, комплекс бирикма ҳосил қилади, бу бирикма олча қизил рангни ҳосил қилади.

Реактивлар. 1. Темир хлориднинг 1% ли эритмаси. 2. Сийдик таркибида сирка ацетат кислотаси бўлган (0,5 л сийдикка) 1 г салицил кислотаси қўшилади.

Ишнинг бориши. Пробиркага 1 мл текширилаётган сийдикдан солинади ва томчилаб темир хлорид эритмасидан қўшилади. Натижада олча қизил ранг ҳосил бўлади.

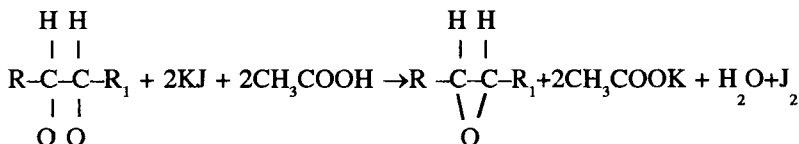
Ёғларнинг перексидли сонини аниқлаш

Ёғлар таркибидаги кислоталар липооксидаза ва ҳаводаги кислород, намлик, ёруғлик иштирокида қисман оксидланади.

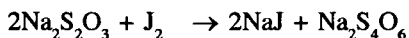
Перексидли сони, 100 г ёғдаги перексидларнинг микдорини кўрсатиб, у йоднинг грамм микдори билан белгиланади.

кўрсатиб, у йоднинг грамм миқдори билан белгиланади.

Методнинг принципи. Переоксидли сони аниқлаш шунга асосланганки, кислотали шароитда ёғ кислоталарини переоксидига калий йод таъсир этиб, реакция натижасида йод ажралиб чиқади. Бу реакцияни қуйидагича ифодалаш мумкин:



Ажралиб чиққан йод гипосульфит билан титрланади:



Керакли асбоблар: 150-200 мл ли колбалар; бюретка-титрлаш учун; 1 ва 2 мл ли пипеткалар.

Реактивлар. 1.Сирка кислота. 2.Калий йоднинг тўйинган эритмаси; 3.Крахмалнинг 1% ли эритмаси. 4.Гипосульфитнинг 0,01 н эритмаси.

Ишнинг бориши. Аналитик тарозида 1 г ёғ тортиб олинади ва 150-200 мл колбага солинади. Бошқа колбага (контрол) 2-3 мл сув қуйи-лади. Иккала колбага 10 мл дан хлорофром солинади ва чайқатилади. Шундан кейин колбаларга 20 мл сирка кислотаси ва 1 мл дан калий йодни тўйинган эритмасидан қўшиб яхшилаб аралаштирилади ва 3 минут қолдирилади. Сўнгра ажралиб чиққан йодни 0,01 н гипосульфит эритмаси билан сариқ ранг ҳосил бўлгунча титрланади, кейин колбаларга 1 мл дан 1 % ли крахмал эритмасидан қўшиб, қўқ ранг йўқолгунча титрланади.

Переоксидли сони қуйидаги формула билан ҳисобланади:

$$X = \frac{(a - b) \cdot T \cdot 0,001269 \cdot 100}{H}$$

Бунда: X-переоксидли сони; а-тажриба намунасини титрлаш учун сарф бўлган 0,01 н гипосульфит эритмасининг миқдори, мл; b-контрол намунасини титрлаш учун сарф бўлган гипосульфитнинг миқдори, мл; T – гипосульфит эритмасининг титри; H – ёғнинг оғирлиги, г.

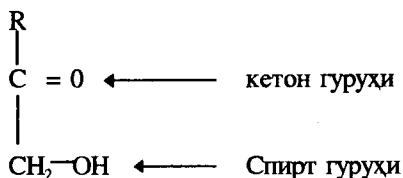
V БОБ. УГЛЕВОДЛАР

Углеводлар ўсимлик ва ҳайвон организмнинг муҳим таркибий қисмларидан бири ҳисобланади. Одам ва ҳайвонлар организмда углеводлар миқдори 2% бўлиб, улар жуда кўп функцияларни бажаради: 1. Углеводлар организм учун асосий энергиядир. 1 г углеводнинг парчланишида 4,1 ккал энергия ажралиб чиқади. 2. Углеводлар пластик функцияни бажаради. Улар ҳужайралар мембранаси, ҳужайра структура компонентлари ва нуклеопротеинлар, гликопротеинлар, гликолипидлар, бир қатор витаминлар ҳамда коферментлар таркибига киради. Углеводлар ўсимликларда асосан таянч вазифасини ўтайди. 3. Углеводлар запаси озиқ моддалар сифатида катта аҳамиятга эга. Ўсимликлар крахмал, ҳайвонларда гликоген углеводларнинг заҳира шакли ҳисобланади, зарур бўлганда сарф қилиб турилади. Жигар ва мускуллар асосан гликоген депосидир. 4. Ҳимоя функцияси, бу функцияни мукополисахаридларнинг асосий вакиллари: гиалуронат кислота, гепарин бажаради. Гиалуронат кислота тўқималар ва ҳужайралараро бириктирувчи тўқима таркибига кириб, уларни ёпиштириб туради. У тўқималарга турли хил шикаст етаказувчи моддаларнинг киришига тўсқинлик қилади. Гепарин ҳайвон тўқималарида (жигар, талоқ ва бошқалар) қон ивишининг кучли ингибиторидир.

Углеводлар химиявий тузилишига кўра кўп атомли спиртларнинг альдегиди ёки кетони ҳисобланади.



Кетонспирт тузилишида кетон ва спирт гуруҳи бўлади:



Углеводлар тузилиши ва хусусиятига қараб иккита катта гуруҳга: оддий углеводлар – моносахаридлар ва мураккаб углеводлар – полисахаридларга бўлинади. Полисахаридлар иккита кичик гуруҳни ташкил қилади. Булар молекуляр оғирлиги унча катта бўлмаган олигосахаридлар ва ҳақиқий полисахаридлардир.

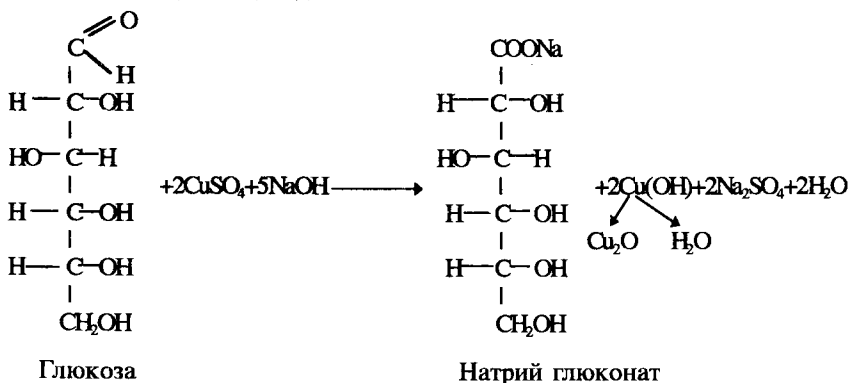
Моносахаридлар

Моносахаридлар таркибидаги углерод атоми сонига қараб, триоза, тетроза, пентоза, гексоза, гептоза ва бошқаларга бўлинади. Буларнинг умумий формуласи – $C_nH_{2n}O_n$. Моносахаридлар қайтарувчанлик хусусиятини намоён қилади, чунки уларнинг таркибида карбонил гуруҳи бор.

Моносахаридларнинг қайтарувчанлик хоссалари

Ҳамма моносахаридлар ишқорий шароитда мис, кумуш ва бошқа металл тузлари ионларини қайтариш хоссаларини намоён қилади. Бу реакция моносахаридлар молекуласидаги альдегид гуруҳи ҳисобига намоён бўлиб, бу гуруҳ осон оксидланиб, карбоксил гуруҳини ҳосил қилади, металл ионлари эса қайтарилади.

1. Троммер реакцияси. Глюкоза ишқорий шароитда мис сульфат тузи билан реакцияга киришиб, мис оксидигача қайтаради ва ўзи глюконат кислотасини ҳосил қилади.

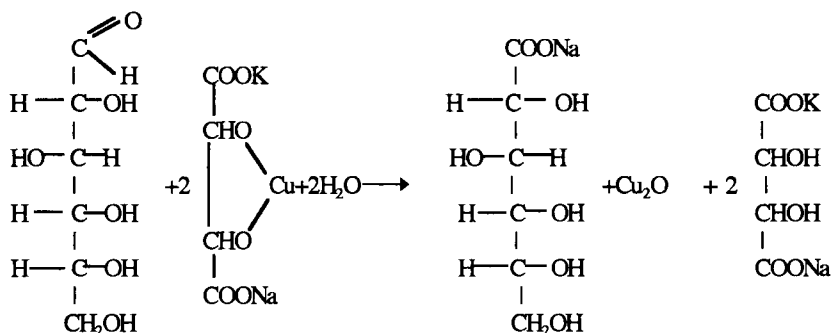


Керакли асбоблар: пробиркалари билан штатив; 1 ва 2 мл ли пипеткалар, спирт лампаси.

Реактивлар. 1. Глюкозанинг 1 % ли эритмаси. 2. Натрий ишқорининг 20 % ли эритмаси. 3. Мис сульфатнинг 5 % ли эритмаси.

Ишинг бориши. Пробиркага глюкозанинг эритмасидан 3-4 мл солинади ва 1-2 мл 20 % ли натрий ишқорининг эритмасидан ва 2-3 томчи 5 % ли мис сульфат эритмасидан қўшилади. Пробирка эҳтиётлик билан чайқатилади. Дастлаб бошланишида мис гидроксидининг CuOH чўкмаси, сўнгра Cu_2O оксидининг қизил чўкмаси ҳосил бўлади.

2. Фелинг реактиви билан реакцияси. Моносахаридлар фелинг реактиви билан қайнатилганда, бу реактив мис оксидигача қайтарилади ва моносахаридлар глюконат кислотасига оксидланади.



Реактивлар. 1. Глюкозанинг 1 % ли эритмаси. 2. Фелинг реактиви: Бу реактив иккита эритмадан тайёрланади. 1. 500 мл колбада 34,64 г мис сульфат ($\text{CuSO}_4 - 5\text{H}_2\text{O}$) эритилади ва белигисигача сув қўшилади. 2. 500 мл колбага 173 г сегнет тузини солиб, 200-250 мл сувда эритилади ва 100 мл 50 % ли натрий ишқори қўшилади, сўнгра колбанинг белгисигача сув қўшилади. Реактив ишлатишдан олдин тенг ҳажмда олиб ара-лаштирилади.

Ишнинг бориши. Пробиркага 3-4 мл 1 % ли глюкоза эритмасидан солинади ва тенг ҳажмда Фелинг реактивидан қўшиб қайнатилади, натижада мис оксидининг қизил чўкмаси ҳосил бўлади.

Моносахаридларни аниқлашда қўлланиладиган рангли реакциялар

Подобедов –Молиш реакцияси.

Шакарлар α - нафтол ва тимол билан реакцияга киришиб рангли бирикмалар ҳосил қилади.

Реактивлар. Глюкозанинг 1 % ли эритмаси, а-нафтолнинг 0,2 % ли спиртдаги эритмаси, (0,5 г а-нафтол 50 мл этил спиртида эритилади. Ишлатишдан олдин 5 марта суюлтирилади). Тимолнинг 1 % ли спиртли эритмаси, концентрланган сульфат кислота.

Ишнинг бориши. 2 пробирка олиб, уларнинг ҳар бирига 2 мл глюкозанинг 1 % ли эритмасидан солинади. 1-пробиркага 5 томчи 0,2 % ли α -нафтол эритмасидан, 2-пробиркага 5 томчи 1 % ли тимол эритмасидан қўшилади. Иккала пробиркага эҳтиёткорлик билан пробирка девори бўйлаб 2 мл концентрланган сульфат кислота қўшилади. Сульфат кислота ва шакар эритмаси ўртасида биринчи пробиркада бинафша ранг, иккинчи пробиркада қизил ранг ҳосил бўлади.

Селеванов реакцияси. Кетогексозалар, жумладан, фруктоза хлорид кислота ва резорцин билан қиздирилган тўқ-қизил ранг беради. Бу ранг реакция маҳсулоти бўлган оксиметилфурфуролга хосдир.

Реактивлар. Селеванов реактиви (100 мл 20 % ли хлорид кислотада 0,05 г резорцин эритилади), глюкозанинг 1 % ли эритмаси, фруктозанинг 1 % ли эритмаси.

Ишнинг бориши. 2 та пробирка олиб, 2 мл Селеванов реактивидан солинади. Биринчи пробиркага 2 томчи фруктоза эритмасидан, иккинчи пробиркага 2 томчи глюкоза эритмасидан қўшилади. Иккала пробиркани қайнаб турган сув ҳаммомига 1 –2 минут қолдирилади. Фруктоза бор пробиркада қизил ранг ҳосил бўлади, глюкоза солинган пробиркада эса ранг ҳосил бўлмайди.

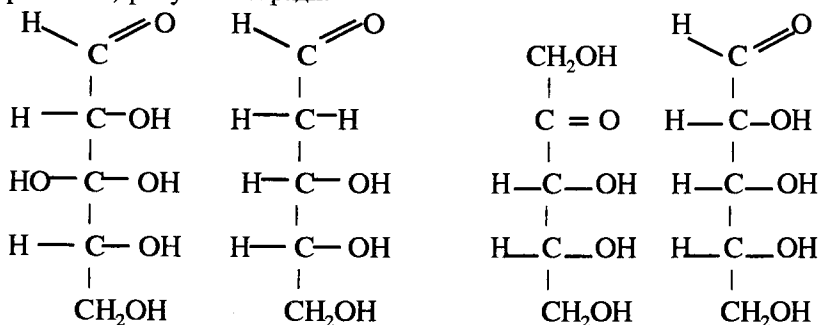
Дифениламин реакцияси. Кетозалар, жумладан фруктоза ҳам кислотали муҳитда дифениламин билан кўк ранг беради. Бу реакция фруктозани микдорий жиҳатдан аниқлашда (Колорометрик усул) ҳам қўлланилади.

Реактивлар. Дифениламиннинг 20 % ли эритмаси, (96 % ли спиртда тайёрланади).

Хлорид кислотанинг 20 %ли эритмаси, фруктозанинг 1 %ли эритмаси.

Ишнинг бориши. Пробиркага 1 мл фруктозанинг 1 % ли эритмасидан олиб, унга 0,5 мл дифениламин ва 1 мл хлорид кислота қўшилади. Аралашма қайнаб турган сув ҳаммомида 5 минут давомида ушланади. Реакция натижасида кўк ранг ҳосил бўлади.

Пентозаларга реакция. Пентозалар ўсимлик ва ҳайвон тўқимасида учрайди. Улар ДНК ва РНК, кўпгина коферментлар (НАД, НАДФ, ФАД) таркибига киради. Бу гуруҳ углеводларга рибоза ва дезоксирибоза, ксилоза, арабиноза, рибулоза киради.



D=рибоза

D=дезоксирибоза

D=рибулоза

D=арабиноза

Пентозалар учун характерли реакция шундан иборатки, улар концентрланган кислоталар билан қиздирилганда сувни йўқотади ва фурфуролга айланади, у ордин билан реакцияга киришиб, яшил ранг, анилин билан реакцияга киришиб, қизил ранг беради.

Пентозаларнинг анилин билан реакцияси. Реактивлар.

1.Рибоза, арабинозанинг 1–2% ли эритмаси. 2. Анилин ($C_6H_5NH_2$). 3.Сирка кислотаси. 4.Концентрланган хлорид кислотаси.

Ишнинг бориши. Пробиркага 2 мл пентоза эритмаси ва шунча ҳажмда концентрланган хлорид кислотасидан солинади, сўнгра эҳтиётлик билан қайнагунча қиздирилади. Совутандан кейин унга 1 мл анилин ва 1 мл сирка кислотаси қўшилади. Эритма қизил рангга киради.

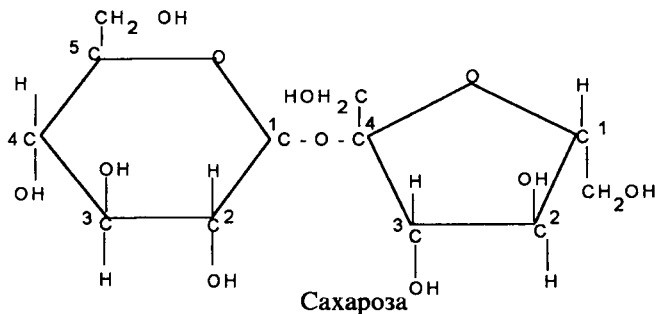
Пентозаларни орцин билан реакцияси. Реактивлар. 1.Пентозаларнинг 1-2% ли эритмаси. Орцин реактиви: 0,25 г орцинни 125 мл 30% хлорид кислотасида эритилади ва шу эритмага 1 мл 10% ли темир хлорид эритмасидан қўшилади. Эритма қоронғи ойнали идишда сақланади.

Ишнинг бориши. Пробиркага 1-2 мл орцин реактиви солиб, қайнагунча қиздирилади ва 4-5 томчи пентоза эритмаси қўшилади, натижада кўк ранг пайдо бўлади.

Дисахаридлар

Дисахаридлар иккита моносахарид молекуласидан бир молекула сув ажралиб чиқиши натижасида ҳосил бўлади. Дисахаридларнинг умумий формуласи - $C_{12}H_{22}O_{11}$. Дисахаридларга: сахароза, лактоза, мальтоза, целлобиоза киради.

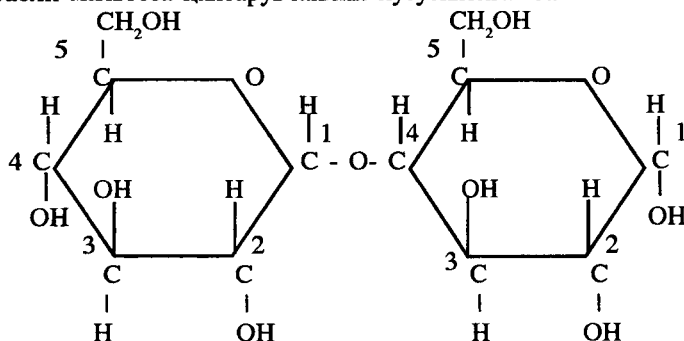
Сахароза молекуласининг ташкил қилган моносахаридлар ўзаро 1, 2 боғ орқали бириккан. Унда эркин глюкозид гидроксил гуруҳ йўқ. Шунинг учун у Троммер реакциясини ҳосил қилмайди.



Фелинг суюқлигини қайтармайди. Сахароза кислота билан қиздирилса ёки унга сахараза ферменти таъсир эттирилса, глюкоза ва фруктозага парчаланади.

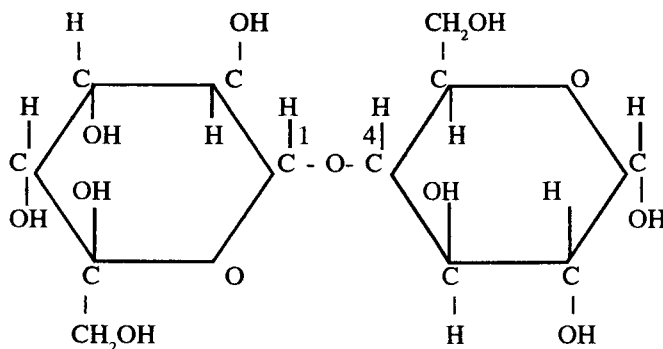
Мальтоза. Парчаланганда икки молекула α -Д-глюкопираноза ҳосил бўлади. Улар 1:4 боғ билан бириккан битта глюкоза қолдиғида глюкозид гидроксил сақлаган бўлгани учун, мальтоза қайтариш хусусиятига эга. Мальтоза табиатда эркин ҳолда бўлмайди, у крахмал ва гликоген тузилишидаги асосий элемент бўлиб, уларнинг гидролитик парчаланиш натижасида ошқозон-ичак йўлида ҳосил бўлади.

Мальтоза фермент иштирокида гидролизланиб, икки молекула глюкоза ҳосил қилади. Глюкозанинг гидроксил гуруҳи очик бўлганлиги сабабли мальтоза қайтарувчанлик хусусиятига эга.



Мальтоза

Лактоза, сут шакари - дисахарид бир молекула D-глюкоза ва бир молекула D-галактозадан тузилган бўлиб, галактозанинг биринчи углерод атоми билан глюкозанинг тўртинчи углерод атоми орқали бириккан. Лактоза таркибидаги глюкозада эркин глюкозид гидроксил бўлганлигидан қайтарувчанлик хусусиятига эга.



Лактоза

Дисахаридларнинг қайтарувчанлик хусусиятини текшириш

Реактивлар. 1.Мальтозанинг 2% ли эритмаси. 2.Лактозанинг 2% ли эритмаси. 3.Сахарозанинг 2% ли эритмаси. 4. Натрий ишқорининг 30% ли эритмаси. 5.Мис сульфатнинг 5% ли эритмаси.

Ишнинг бориши. Учта пробирка олиб, 3-4 мл мальтоза, лактоза, сахароза эритмасидан солинади ва Троммер реакцияси бажарилади. Мальтоза ва лактоза қайтарувчанлик хусусиятини намоён қилади, бу

пробиркаларда қизил чўкма ҳосил бўлади. Сахароза юқорида айтиб ўтилгандек, бу хусусиятни намоён қила олмайди, шунинг учун Троммер реакциясини ҳосил қилмайди.

Бошқа бир пробиркага 1 мл сахарозанинг 1 %ли эритмасидан олиб, унинг устига 3-4 томчи концентрланган сульфат кислотасидан қўшилади. Пробиркани қайнаб турган сув ҳаммомига 10-15 минут ушланади, сўнгра унинг устига 1 мл 30 % ли натрий гидроксид эритмасидан ва 3-4 томчи 5 % ли мис сульфат эритмасидан қўшиб қиздирилади. Пробиркада сариқ ёки қизил ранг ҳосил бўлади. Чунки гидролиз натижасида ҳосил бўлган моносахаридлар қайтарувчанлик хусусиятига эга бўлади.

Полисахаридлар

Полисахаридлар юқори молекуляр бирикмалар бўлиб, кислоталар ёки ферментлар билан гидролизланганда олигосахаридлар билан моносахаридларга парчаланади. Ҳар бир моносахарид қолдиғи ёнидаги моносахарид билан ўзаро гликозид боғлар билан бириккан. Шунинг учун уларни **полигликозидлар** деб ҳам аталади. Бир хил моносахаридлардан ташкил топган полисахаридлар **гомополисахаридлар** дейилади. Гомополисахаридлар таркибидаги моносахаридлар қолдиқларининг табиатига қараб ҳар хил бўлади (крахмал, гликоген, целлюлоза). Агар полисахаридлар таркибида турли моносахаридлар бўлса, улар **гетерополисахаридлар** дейилади. Гетерополисахаридлар таркибида баъзан бошқа моддалар (аминокислота, ёғ, оқсил ва ҳоказо) ҳам учрайди. Гетерополисахаридларга мукополисахаридлар, гемицеллюлозалар ва бошқалар киради.

Крахмалнинг йод билан реакцияси

Крахмал учун характерли реакция – йодни калий йоддаги эритмаси билан кўк ранг ҳосил қилишидир. Крахмални йодли реакцияси – мураккаб жараёндир, натижада ҳосил бўлаётган ранг крахмалнинг тузилишига боғлиқ. Крахмал икки хил полисахарид – амилоза ва амилопектин аралашмасидан иборат. Амилоза молекуласи 1000-6000 – D-глюкоза қолдиқларидан тузилган бўлиб, уларнинг 1,4-глюкозид боғ орқали боғланган молекуласи тармоқланмаган формага эга. Тўла гидролизланганда D-глюкоза молекулаларига парчаланади. Амилоза сувда эрийди ва йод таъсирида тўқ кўк рангни беради. Амилопектин ҳам жуда кўп D-глюкоза қолдиқларидан ташкил топган бўлиб, амилозага ўхшаб 1,4-глюкозид боғлари билан боғланган. Аммо амилопектин занжири жуда тармоқланган бўлиб, тармоқланган қисми 1,6-глюкозид боғлари билан боғланган. Амилопектин ҳам тўла гидролизланганда D-глюкоза молекулаларига парчаланади. Амилопектин сувда эримайди, у сувда шишади ва клейстер ҳосил қилади. Йод таъсирида у бинафша рангни ҳосил қилади.

Керакли асбоблар: пробиркалари билан штатив; 1,2 мл ли пипеткалар.

Реактивлар. 1. Крахмалнинг 1% ли эритмаси. 2. Йоднинг калий йоддаги эритмаси: 500 мл сувда 20 г калий йод ва 10 г йод эритилади. 3. Натрий гидроксидининг 10% ли эритмаси. 4. Этил спирти.

Ишнинг бориши. Пробиркага 2-3 мл крахмал эритмасидан ва 3-4 томчи йодни калий йоддаги эритмасидан солинади, натижада кўк ранг ҳосил бўлади. Шу пробиркадаги суюқлик учта пробиркага бўлинади: биринчи пробиркага 1-2 мл натрий гидроксидининг эритмасидан, иккинчи пробиркага 2-3 мл этил спирти солинади, учинчи пробирка эса қиздирилади. Ҳамма ҳолларда ҳам кўк ранг йўқолади. Учинчи пробирка совугандан сўнг яна кўк ранг ҳосил бўлади. Крахмалнинг йод билан ҳосил қилган комплекси спирт, ишқор, юқори ҳароратга нисбатан таъсирчан бўлиб, йод билан гипойодитларни ҳосил қилади.

Крахмални қайтарувчанлик хоссаларини аниқлаш

Керакли асбоблар: пробиркалари билан штатив; 1,2 мл ли пипеткалар; сув ҳаммоми.

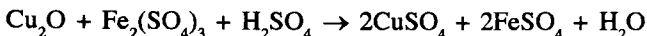
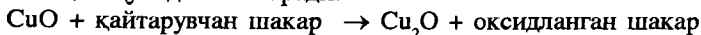
Реактивлар. 1. Крахмалнинг 1% ли эритмаси. 2. Концентрланган сульфат кислота. 3. Натрий гидроксидининг 20% ли эритмаси. 4. Мис сульфатнинг 5% ли эритмаси.

Ишнинг бориши. Иккита пробиркага 4-5 мл крахмал эритмаси солинади. Биринчи пробиркага 3-5 томчи концентрланган сульфат кислота, иккинчи пробиркага эса шунча миқдорда сув қўшилади. Иккала пробирка 10-15 минут қайнаб турган сув ҳаммомига қўйилади. Совугандан кейин Троммер реакцияси бажарилади. Биринчи пробиркада мис оксидининг қизил чўкмаси ҳосил бўлади, бу эса крахмални гидролитик парчаланиб, қайтарувчанлик хусусиятига эга глюкоза ҳосил бўлганлигини кўрсатади. Иккинчи пробиркада эса Троммер реакцияси юз бермайди, чунки крахмал гидролизланмаган, шунинг учун у қайтарувчанлик хусусиятига эга бўлган глюкоза ҳосил қилмаган.

Қайтарувчанлик хусусиятига эга бўлган шакарларни Бергран усулида аниқлаш

Қайтарувчанлик хусусиятига эга бўлган қандлар ишқорий шароитда мис ионлари билан реакцияга киришиб мис (I)-оксидини ҳосил қилади. Ҳосил бўлган мис (I)-оксиди тегишли равишда сув билан ювилгандан сўнг сульфат кислота билан нордонлаштирилган темир (III) - сульфат тузи эритмаси таъсир эттирилади. Бунда мис (I)-оксиди мис (II)-оксидига айланади. Темир (III)-оксиди эса, темир (II)-оксидигача қайтарилади.

Реакция қуйидагича боради:



Кайтарилган темир (II)-оксидининг микдори, перманганат эритмаси билан титрланиб аниқланади.



Бу тенгламадан 1 мл калий перманганат эритмаси 10,05 мг мис микдорига тенг.

Ишининг бориши. Ўсимлик материалидан 5-10 грамм (таркибидаги углеводларнинг микдорига қараб) тортиб олиниб, чинни ҳовончада шиша кукунлари ёрдамида бир хил масса ҳосил бўлгунча эзилади. Сўнгра 50 мл сувни 2-3 бўлиб ҳовончага қуйилади ва масса 100 мл гача белгиланган ўлчовли колбага ўтказилади. Сувнинг охириги порцияси билан ҳовонча ювилади ва у ҳам колбага қуйилади. Кейин колбани ҳарорати 70-80° бўлган сув ҳаммомида 20-30 минут ушланади. Колба совигач аралашма таркибидаги углеводларни аниқлашга тўсқинлик қиладиган оксил ва бошқа моддалар аралашма тиник рангга киргунча қўрғошин ацетат тузидан оз-оздан (0,5-1 мл) қўшиб чўкмага туширилади. Ортиқча қўрғошин эса тўйинган натрий сульфат ёрдамида йўқотилади. (Оқ қуйқум ҳосил бўлиш тўхтагунчага қўйилади). Кейин аралашма филтрланади ва 1-2 марта иссиқ сув билан ювилади. Филтратнинг умумий ҳажми 100 мл га етказилади. Филтрат таркибидаги эрувчан шакарлар қўйидагича аниқланади. Колбага 5-20 мл (текшираётган эритмадаги углеводларнинг оз-кўплигига қараб) филтрат қуйилади. Шакарларни аниқлаш усули олинаётган эритмалар маълум ҳажмда бўлишини талаб қилади. Шунинг учун агар филтратдан 5 ёки 10 мл олинса, тегишли равишда 15 ёки 10 мл дистилланган сув қўшиб, умумий ҳажмини 20 мл га етказиш керак. Филтратга 20 мл А ва Б реактивидан қўйилади. Аралашма қиздирилади ва аниқ 3 минут давомида қайнатилади. Натижада қизил мис (I) оксиди чўкмага тушади. Агар у рангсиз бўлса текширишга олинadиган филтратни камайтириш керак. Пробирка совигач эритма шиша филтрга аста - секин қуйилади. Кейин колбадаги чўкма билан шиша филтргаги чўкма сульфат кислотадаги темир сульфат тузи ёрдамида эритилади. Чўкма эритилгандан сўнг колба ва шиша филтрат дистилланган совуқ сув билан нордон реакция йўқолгунча ювилади. Сўнгра колбадаги суюқлик калий перманганат ёрдамида оч пушти ранг ҳосил бўлгунча титрланади.

Титрлаш учун сарфланган 0,1н калий перманганат ҳажмини мис титрига қўпайтирилади ва жадвалдан шакарлар микдори аниқланади. Шакарлар фоизи қуйидаги формула бўйича аниқланади.

$$x = \frac{a \cdot V \cdot 100}{V_1 \cdot H}$$

a-Бертран жадвали бўйича топилган (олинган ҳажм таркибидаги) шакар микдори;

V-Ўсимлик материалидан олинган аралашма ҳажми;

V₁-Шакарни аниқлаш учун олинган эритма ҳажми;

H-Ўсимлик материали грамм ҳисобида.

Реактивлар: 1. А реактивни-мис сульфат эритмаси, 40 гр сульфат ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 1л дистилланган сувда эритилади. 2.Б реактиви-Сегнет тузининг ишқорли эритмаси. 200 г сегнет тузи ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ва 150 г NaOH 1л дистилланган сувда эритилади. 3.Перманганат эритмаси 5 г калий перманганат 1 л дистилланган сувда эритилади. Бунда 1 мл эритма 10 мг мис микдорига тўғри келади. 0,1 н перманганат эритмаси ишлатилса (3,16 г KMnO_4), 1 мл эритма 6,36 мг мисга тўғри келади. 4.50 г $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$ ва 200г (108 мл) концентрланган сульфат кислота аралаштириб, дистилланган сув билан 1 л га етказилади.

Жадвал

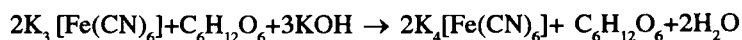
**Мис миллиграммларига тенг бўлган эрувчан
шакарлар микдори (Бертран бўйича)**

Глюкоза	Мис	Глюкоза	Мис	Глюкоза	Мис
10	20,4	37	72,0	64	119,6
11	22,4	38	73,8	65	121,3
12	24,3	39	75,7	66	123,0
13	26,3	40	77,5	67	124,7
14	28,3	41	79,3	68	126,4
15	30,2	42	81,1	69	128,1
16	32,2	43	82,9	70	129,8
17	34,2	44	84,7	71	131,4
18	36,2	45	86,4	72	133,1
19	38,1	46	88,2	73	134,7
20	40,1	47	90,0	74	136,3
21	42,0	48	91,8	75	137,9
22	43,9	49	93,6	76	139,6
23	45,8	50	95,4	77	141,2

Глюкоза	Мис	Глюкоза	Мис	Глюкоза	Мис
24	47,7	51	97,1	78	142,8
25	49,6	52	98,9	79	144,5
26	51,5	53	100,6	80	146,1
27	53,4	54	102,3	81	147,7
28	55,3	55	104,1	82	149,3
29	57,2	56	105,8	83	150,9
30	59,1	57	107,6	84	152,5
31	60,9	58	109,3	85	154,0
32	62,8	59	111,1	86	155,6
33	64,6	60	112,8	87	157,2
34	66,5	61	114,5	88	158,8
35	68,3	62	116,2	89	160,4
36	70,1	63	117,9	90	162,0

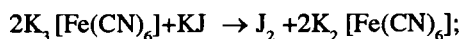
Биологик суюқликларда глюкоза миқдорини Хагедорн-Иенсен методи билан аниқлаш

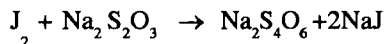
Бу усул ёрдамида турли хил биологик объектлар таркибидаги глюкоза ва бошқа қайтарувчанлик хусусиятига эга бўлган шакарларни аниқлаш мумкин. Реакция натижасида шакарлар ишқорий шароитда оксидланиб, қизил кон тузи (калий феррицианид), сарик кон тузи (калий гексациано-(II)-феррат) гача қайтарилади.



Ҳосил бўлган $K_4[Fe(CN)_6]$ эса рух сульфат ёрдамида чўкмага туширилади.

Ортиқча $K_3[Fe(CN)_6]$ гипосульфат ёрдамида титрланади.





Глюкоза -қоннинг доимий таркибий қисми ҳисобланади. Глюкоза қонга ичак орқали келиб тушади. Одам қонида нормада 80 дан 120 мг % атрофида бўлади. Турли қишлоқ хўжалик ҳайвонлари қони таркибида глюкозани миқдори қуйидагича, мг %:

Отларда	90-100
Сигирларда	60-80
Қўй ва эчкиларда	40-65
Қуёнларда	100-200
Қушларда	130-260

Керакли асбоблар: пробиркалар билан штатив; 0, 1, 2, 5, 10 мл ли пипеткалар; сув ҳаммоми; диаметри 3-4 см ли воронкалар; 1-2 мл ли микропипеткалар; фильтр қоғоз.

Реактивлар. Оксилларни чўктириш учун: рух сульфатнинг 0,45% ли эритмаси; натрий гидроксидининг 0,1 н эритмаси – бу икки реактив аралашмаси оксилларни чўктириш учун ишлатилади; натрий оксалатнинг 5% ли эритмаси (микропипеткаларни ювиш учун ишлатилади).

Глюкозани аниқлаш учун. 1. Гексациан = (111)-феррат эритмаси: бу эритмани тайёрлаш учун 1,65 г перекристалланган $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ва 10,6 г сувсиз натрий карбонатни 1 литрли қолбада эритилади ва қолбани белгисигача сув қўпилади. Эритма қоронғи ойнали идишда совуқ жойда сақланади. 2. Хлор = рух = йод эритмаси: бу эритмани тайёрлаш учун 10 г рух сульфат, 50 г натрий хлорид ва 5 г калий йодат 200 мл қолбада эритилади. 3. Сирка кислотасини 3 % ли эритмаси. 4. Натрий тиосульфатнинг 0,005 н эритмаси. 5. 1% ли крахмални тўйинган натрий хлорид эритмасида тайёрланади. 6. Қуён қони, қон ивиб қолмаслиги учун 10 мл қонга 0,01 г натрий оксалат тузидан қўпилади.

Ишнинг бориши. Оксилларни чўктириш ва ажратиш. Қон оксиллари рух гидроксиди билан қайнатилиб чўкмага туширилади. Бунинг учун аввал рух гидроксиди тайёрлаб олинади. Тўртта белгиланган пробиркаларга 5 мл рух сульфат эритмасидан ва 1 мл натрий гидроксиди эритмасидан солинади, бунда пробиркаларда рух гидроксидининг чўкмаси ҳосил бўлади. Сўнгра иккита пробиркага микропипетка ёрдамида (микропипеткалар натрий оксалат эритмаси билан ювилган бўлиши керак) 0,1 мл дан қон солинади. Қолган иккита пробиркага 0,1 мл дан дистилланган сув қўпилади, бу намуналар контрол ҳисобланади. Ҳамма пробиркалар 3 минут қайнаб турган сув ҳаммомига қўпилади. Натижада қон оксиллари чўкмага тушади. Пробиркалардаги суюқликлар филтрланади, чўкма 2 марта 3 мл дистилланган сув билан ювилади. Ҳосил бўлган филтрат тиник рангда бўлиши керак.

Глюкозани аниқлаш. Қонни оксилсиз филтратларга ва контрол намуналарга 2 мл дан калий гексациан (111) ферратнинг содали эритма-

сидан қўшилади, сўнгра қайнаб турган сув ҳаммомида 15 минут қиздирилади. Совугандан кейин ҳар бир стаканга 3 мл дан хлор-рух-йодли эритмаси ва 2 мл дан сирка кислотасининг эритмаси қўшилади. Пробиркадаги суюқлик ажралиб чиққан йод таъсирида сариқ рангга киради. Ҳамма пробиркаларга 2 томчидан крахмал эритмаси қўшилади ва натрий тиосульфат эритмаси билан қўқ ранг йўқолгунча титрланади. Титрланиш учун сарф бўлган натрий тиосульфатнинг ҳажми маълум бўлгач, жадвал ёрдамида глюкоза миқдори аниқланади.

Тажиба бўйича топилган сондан контрол бўйича топилган соннинг айирмаси текшириладиган эритма таркибидаги қайтарувчанлик хусусиятига эга бўлган углеводлар миқдорини беради. Текшириш учун олинган эритманинг умумий ҳажмидаги углеводлар миқдори ҳисобланади. Углеводларнинг фоиз миқдори қуйидагича топилади.

$$x = \frac{a \cdot 100}{H}$$

Бунда: a - текшириладиган материал таркибидаги углевод миқдори;
 H - олинган материалнинг миқдори.

Қайтарувчан шакарларни Бьерр усулида аниқлаш

Бу усул ёрдамида текшириладиган ўсимлик материалида жуда кам миқдордаги (0,1-0,9 мг) шакарни ҳам аниқлаш мумкин. Бьерр усулида ҳам Бертран усулида қўлланиладиган реактивлардан фойдаланилади.

Ишининг бориши. Текшириладиган эритмадан 3 мл олиб, центрифуга пробиркасига қуйилади, унинг устига янги тайёрланган Феленг суюқлигидан қўшилади. Пробирка қайнаб турган сув ҳаммомига туширилади ва 6 минут давомида қайнатилади. Вақт тугагач тезда совуқ сув ёрдамида пробиркалар уй ҳароратигача совитилади. Бунда пробирка тагига қизил чўкма тушади. Ҳосил бўлган чўкма минутига 2000 айл/мин 2-3 минут центрифугаланади, чўкма ажратиб олинади. Чўкма 3-5 мл темир (II)-сульфат эритмаси билан эритилади. Сўнгра 0,01 н калий перманганат эритмаси билан эритилади. Сўнгра 0,01 н калий перманганат эритмаси ёрдамида титрланиб эрувчан шакарлар миқдори жадвал бўйича аниқланади. Сарфланган калий перманганат эритмасининг 1 мл миснинг 1 мг га тўғри келади. Шу йўл билан топилган мис миқдорига қараб жадвалдан қайтарувчан шакар миқдори топилади (жадвал).

0,1 мл қандағи глюкозанинг миқдори, мг (Хагедорн бүйича)

Гипосуль- фит, мл	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,009
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,348	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264	0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,141	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,097	0,095	0,093	0,092	0,090
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,020	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,007	0,005	0,003	0,002

Мис микдорига тенг бўлган глюкоза микдори (мг да) (Бьерр бўйича)

Глюкоза	Мис	Глюкоза	Мис	Глюкоза	Мис	Глюкоза	Мис
0,1	0,55	1,10	2,60	2,00	4,30	5,50	10,80
0,2	0,80	1,20	2,80	2,25	5,00	6,00	11,90
0,3	1,00	1,30	3,00	2,50	5,30	6,50	12,80
0,4	1,15	1,40	3,20	2,75	5,95	7,00	13,90
0,5	1,35	1,50	3,40	3,00	6,25	7,50	14,90
0,6	1,60	1,60	3,60	3,50	7,10	8,00	15,90
0,7	1,80	1,70	3,80	4,00	8,00	9,00	16,90
0,8	2,00	1,80	4,00	4,50	8,50	9,00	17,80
1,0	2,40	1,90	4,15	5,00	8,95		

Фруктозани аниқлаш

Фруктоза кўпчилик меваларнинг таркибида учрайди. Фруктоза нордон шароитда резорцин билан реакцияга киришиб рангли бирикма ҳосил қилади.

Реактивлар: резорциннинг спиртли эритмаси (1г резорцин 1 л 25% ли этил спиртида эритилади). Хлорид кислотанинг 30% ли эритмаси. Фруктозанинг стандарт эритмаси. 100 мг фруктоза 100 мл бензоат кислотанинг сувда тўйинган эритмасида эритилади ва совитгичда сақланади. Шу эритмадан 10 мл олиб 100 мл сувда суюлтирилади.

Ишнинг бориши. 5-20 г ўсимлик материалдан олиб, чинни ҳовончада бир хил масса ҳосил бўлгунча шиша кукунлари ёрдамида 10-20 мл сув билан эзилади. Сўнгра ҳажми 200 мл ли колбага қуйилади. Колбани ҳарорати 80-90° С бўлган сув ҳаммомига туширилади ва 1 соат давомида экстракция қилинади. Сўнгра колбани совитиб, қўрғошин ацетатнинг 10% ли эритмасидан 5-6 мл қўшилади. Бунда фруктозани аниқлашга ҳалақат берадиган бошқа моддалар чўкмага тушади.

Колбадаги суюқликни яхшилаб аралаштириб сув билан чизикқача тўлдирилади ва фўлтрланади.

Фўлтрдан 50 мл ли колбага 5 мл олиб, устига 5 мл резорциннинг спиртли эритмасидан ва 15 мл хлорид кислотанинг 30% ли эритмасидан қўшилади. Колбадаги суюқликни яхшилаб аралаштириб, 80°С ҳароратли

сув ҳаммомига 20 минутга қўйилади. Сўнгра колбани совитиб ранг интенсивлигини ФЭК да кўрилади. Бунда яшил ёруғлик филтрдан (540 нм) фойдаланилади. Фруктоза микдорини аниқлаш учун стандарт эритмалар ёрдамида калибровка чизиги график сифатида чизилади. Стандарт эритмадан ҳажми 50 мл ли колбаларга 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мл дан қўйилади. Уларнинг устига тегишли равишда 4,5; 4,0; 3,0; 2,0; 1,0; 0,1 мл дистилланган сув қўйилади. Сўнгра барча колбаларга 5 мл резорцин эритмаси ва 15 мл хлорид кислотанинг 30% ли эритмасидан қўшиб, ҳарорати 80-50° С бўлган сув ҳаммомида 20 мин. давомида сақланади. Вақт тугагач колбалар совитилиб ҳосил бўлган ранг интенсивлиги ФЭК да ўлчанади.

Сахароза микдорини аниқлаш

Сахароза ўсимликларда кенг тарқалган шакарлардан ҳисобланади. У қайтарувчанлик хусусиятига эга эмас. Сахарозани химиявий усулда аниқлаш учун турли хил гидролиз усулларида фойдаланилади. Сахароза одатда ферментатив ёки кислотали гидролиз йўли билан фруктоза ва глюкозагача парчаланади. Гидролиз маҳсулоти ҳисобланган моносахаридларнинг қайтарувчанлик хусусиятига қараб сахарозанинг микдори аниқланади.

Сахарозани сувли экстрактларда аниқлаш бирмунча қийин, чунки бундай экстракт таркибида бошқа юқори молекулали полисахаридлар ҳам бўлиб, уларнинг гидролизланиши натижасида ҳам қайтарувчан шакарлар ҳосил бўлади. Бундай сувли экстрактларни филтрлаш бирмунча қийиндир. Шу сабабли сахарозани аниқлашда спиртли экстрактлардан фойдаланиш тавсия қилинади.

Реактивлар: Бертран усули бўйича шакарларни аниқлашда қўлланиладиган барча реактивлар. Натрий ишқорининг 4% ли эритмаси, хлорид кислота (зичлиги 1,19). Метил қизил.

Ишнинг бориши. Текширилаётган ўсимлик материалидан 10-25 г олиб, чинни ҳовончада шиша кукунлари билан бир хил масса ҳосил бўлгунча 5-10 мл 96% ли этил спирти ёрдамида эзилади. Сўнгра эзилган масса ҳажми 200 мл ли колбага қўйилади. Чинни ҳовонча яна 10-15 мл спирт билан ювилади ва у ҳам колбага қўйилади. Экстракция учун олинган спиртнинг концентрацияси 75-80% дан ошмаслиги керак. Колбадаги экстракт 75-80°С ҳароратли сув ҳаммомида 30 минут давомида ушлаб турилади. Кейин у бошқа колбага филтрланади. Қолган материал яна 1-2 марта спирт ёрдамида экстракция қилинади ва ҳамма экстрактлар бирлаштирилади. Экстрактлар таркибидаги спирт махсус совитгич ва сув ҳаммоми ёрдамида ҳайдалади (вакуум остида). Колба тагида қолган спиртли экстракт сув билан чизикқача тўлдирилади. Тайёрланган экстрактдан 25 мл олиб ҳажми 50 мл ўлчов колбага қўйилади ва 67-70° С ҳароратли сув ҳаммомида 10 минут ушланади. Сўнгра колбага 1,5 мл хлорид кислота

(зичлиги 1,19) қўшилади. Бунда колбадаги кислота концентрацияси тахминан 2% га яқин бўлади. Гидролиз 67-70°C ҳароратда 6-7 минут давом этади. Гидролиз тамом бўлгач колба тезда совуқ сув ёрдамида уй ҳароратигача совитилади ва 4-5 томчи метил қизил қўшилади. Сўнгра колбадаги суяқлик 4% ли ўювчи натрий билан тўқсарик ранг ҳосил бўлгунча нейтралланади. Бунда ишқорни аста-секин томчилаб қўшиш керак. Нейтралланган эритма сув ёрдамида чизикчача тўлдирилади. Шакар микдори Бергран усулида аниқланади. Бунда экстракт таркибидаги умумий шакарлар йиғиндиси (қайтарувчан шакарлар сахароза) топилади. Сахароза микдорини аниқлаш учун қайтарувчан хусусиятига эга бўлган шакар микдоридан умумий шакар айириб ташланади.

$$X = 2(A-B) \cdot 0,95;$$

X - сахароза микдори, мг;

A - умумий шакар, мг;

B - қайтарувчан хусусиятига эга бўлган шакар, мг.

Крахмални аниқлаш

Крахмал ўсимликлар танасида энг кўп тўпланадиган ва энг муҳим полисахаридлардан ҳисобланади. У айниқса, ўсимликлар донида кўп бўлади. Кўп йиллик ўт ўсимликларда эса ер остки органларида тўпланади.

Ҳамма ўсимликларда - сув ўтлардан юксак ўсимликларгача фотосинтез жараёнида хлоропластларда ҳосил бўладиган углеводлар бевосита крахмалга айланади. Крахмал икки хил бирикмадан, яъни амилоза ва амилопектиндан ташкил топган. Амилопектин йод таъсирида бинафша ҳамда қизғиш-бинафша рангга киради.

Амилоза эса йод таъсирида кўкаради. Крахмални аниқлаш усулари унинг йод билан ҳосил қилган рангининг интенсивлигини аниқлаш ёки кислотали ва ферментатив гидролиз натижасида ҳосил бўлган глюкоза микдорини аниқлашга асослангандир. Юқоридаги усуллардан ҳар бирининг ўзига хос салбий томонлари мавжуд. Масалан, крахмални йод таъсир қилиб аниқлашнинг яхши натижа бермаслигига сабаб амилоза билан амилопектин йод таъсирида ҳар хил ранг беради. Амилоза билан амилопектиннинг крахмал таркибидаги микдори ўсимлик нави органларига қараб ҳар хил бўлиши мумкин.

Крахмални кислотали гидролиз йўли билан аниқлашда ўсимлик материалидан бошқа полисахаридларнинг гидролизга учраш хавфи мавжуд. Крахмал микдорини аниқлашда Починка усули яхши натижа беради.

Крахмал микдорини Починка усулида аниқлаш

Бу усул крахмални йод билан комплекс ҳосил қилишига асосланган. Ҳосил бўлган комплекс калий бихромат ёрдамида нордон шароитда CO_2 ва H_2O га оксидланади. Реакция натижасида йод эркин ҳолда ажралади. Бу йод гипосульфит билан титрланиб, сарфланган гипосульфит микдорига қараб крахмал микдори аниқланади.

Реактивлар: 1. 0,25 н калий бихромат эритмаси ($12,3 \text{ г } \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ икки литрли колбада 250 мл сув билан эритилади ва совигач 800 мл концентрланган H_2SO_4 қўшилади. Эритма совигач рангли склянкага қўйилади). 2. Кальций нитратнинг 80% ли эритмаси 200 грамм $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 250 мл сувда эритилади. Бу эритмадан 20% ли ва 5% ли эритмалар тайёрланади. 3. 0,5% йод эритмаси (10 г KI ва 5 г I_2) аввал ҳовончада яхшилаб майдаланади, сўнгра 10 мл дистилланган сув билан ўлчовли 1 л колбага қўйилади ва дистилланган сув билан чизикқача тўлдирилади. 4. 0,1 н гипосульфит эритмаси.

Ишнинг бориши. Текширилаётган ўсимлик материали (1 г картошка, 3 г барг) чинни ҳовончада 5 мл 80% ли кальций нитрат эритмаси ёрдамида гомоген ҳолигача яхшилаб майдаланади. Сўнгра ҳажми 200 мл ли колбага экстракт қўйилади. Кальций нитратнинг 80% ли эритмаси билан ҳовонча 2-3 марта ювилади. Колбадаги суюқликнинг умумий ҳажми 30 мл дан ошмаслиги керак. Колба устини воронка билан беркитиб электр плитка устида 3 минут давомида аста-секин қайнатилади. Бунда крахмал эритмага ўтади. Колбани совитиб воронка яхшилаб ювилади ва эритма бошқа ҳажми 100 мл ли ўлчов колбага қўйилади. Сўнгра дистилланган сув билан чизикқача тўлдирилади ва стаканга филтрланади. Шу филтратдан 5 мл центрифуга пробиркасига олинади. Унинг устига 2 мл йод эритмаси қўйилади, яхшилаб аралаштириб 30 минутга қолдирилади.

Натижада крахмалнинг йодли комплекси чўкмага тушади. Чўкмадаги йоднинг миқдори 15% га яқин бўлади. Вақт тугагач пробирка минутага 4000-5000 тезликда 5-10 минут центрифугаланади. Чўкма яна 5% ли кальций нитрат эритмаси ёрдамида 2-3 марта ювилади. Ҳар гал эритма қўйилганида колбадаги чўкма яхшилаб аралаштирилади. Сўнгра чўкма 200 мл ли колбага 0,2 - 0,3 мл сув билан ўтказилади. Пробирка эса 3-4 марта дистилланган сув билан ювилади (сувнинг умумий ҳажми 3 мл дан ошмаслиги керак). Колбага 10 мл 0,25 н калий бихроматнинг 85 %ли сульфат кислотада тайёрланган эритмасидан қўйилади, яхшилаб аралаштириб 15 минут қайнаб турган сув ҳаммомига қўйилади. Бунда крахмал бихромат ёрдамида карбонат ангидрид ва сувгача парчаланади. Колба совигач унга 5 мл 20% ли калий йодид эритмасидан ва 120 мл сув қўйилади. Бунда калий бихромат йодни ажратади. Ажралган йод 0,1 н гипосульфит эритмаси билан титрланади. Титрлаш сариқ ранг ҳосил бўлгунча давом эттирилади, кейин колбага 1 мл 0,5% ли крахмал эритмасидан қўшиб, эритма ранги оч-ҳаво ранг бўлгунча титрлаш давом эттирилади. 1 мл 0,1 н гипосульфит эритмаси 0,675 мл крахмалга тўғри келади (Реакция бошланишидан крахмал томонидан адсорбция қилинган йод реакция натижасига таъсир қилмайди).

Алоҳида контрол титрлаш ҳам ўтказилади. Бунинг учун ҳажми 20 мл колбага 10 мл калий бихроматнинг 0,25 н эритмасидан, 120 мл сув,

5 мл калий йодиднинг 20% ли эритмасидан солинади ва 0,1 н гипосульфит эритмаси билан титрланади. Крахмал миқдори қуйидагича аниқланади.

$$X = \frac{0,675 \cdot b \cdot T \cdot (a - b_1)}{H}$$

X -крахмал миқдори, % ҳисобида; b_1 - 0,1 н гипосульфит эритмасининг контрол титрлаш учун сарфланган миқдори, мл; a - 0,1 н гипосульфит эритмасининг тажрибадаги крахмални титрлаш учун сарфланган миқдори мл; b -крахмални чўкмага тушириш учун олинган ҳажм (5 мл); T -0,1 н гипосульфит эритмасининг титрига тузатма; H -тажриба учун олинган ўсимлик материалининг вазни, грамм ҳисобида.

Клетчатка миқдорини аниқлаш

Кюршер ва Ганек томонидан таклиф қилинган бу усул ўсимлик материалидан сирка ва нитрат кислоталарнинг аралашмасидан эрийдиган моддаларни ажратиб, қолган клетчаткани аниқлашга асосланган.

Реактивлар: Ўсимлик материали, сирка ва нитрат кислотанинг аралашмаси, нитрат кислота (зиқлиги 1,4) билан сирка кислотанинг 80% ли эритмаси 1:10 нисбатда (ҳажми бўйича) аралаштирилади 0,2 М ўювчи калийни спиртли эритмаси, этил спирти.

Ишнинг бориши. Ўсимлик материалидан 1 г олиб чинни ҳовончада яхшилаб, бир хил масса ҳосил бўлгунча эзилади. Уни 100-200 мл ли қолбага ўтказиб, устига сирка ва нитрат кислота аралашмасидан 40 мл қўйилади. Қолбага совиткични улаб бир соат давомида қум ҳаммомига қўйилади. Сўнгра совитиб, махсус шиша филтлда филтранади ёки центрифугаланади. Чунки бир неча марта қайноқ 0,2 М ўювчи калийнинг спиртли эритмасида ва дистилланган сув билан охирида эса 10 мл этил спирти ёрдамида ювилади. Сўнгра чўкма бир хил оғирликкача 105° С да термостатда қурилади. Чўкмани оғирлигига қараб клетчатканинг % миқдори аниқланади.

$$X = \frac{a \cdot 100}{H}$$

X - клетчатканинг миқдори, % ҳисобида, a -тажрибада аниқланган чўкма оғирлиги, H -ўсимлик материали оғирлиги, г.

Гликоген миқдорини аниқлаш

Турли хил сут эмизувчиларнинг жигарида 2 дан 8% гача гликоген бўлади. Жигар гликогенининг миқдори озиканинг таркиби ва ҳазм бўлган овқатларнинг миқдорига боғлиқ. Агар ҳайвонлар рационидида углевод кам бўлса, гликоген камроқ йиғилади, аксинча рационидида кўп углевод бўлса, гликоген миқдори кўп бўлади. Физик иш жигар гликогенининг камайишига олиб келади. Жигар гликогенининг миқдори эндокрин системалари орқали бошқариб турилади.

Керакли асбоблар: 50, 200 мл ли колбалар; сув ҳаммоми; 1,2, 5 мл ли пипеткалар.

Реактивлар. 1. 2,5% ли хлорид кислотаси. 2. 10% ли натрий ишқори. 3. Куённинг жигари.

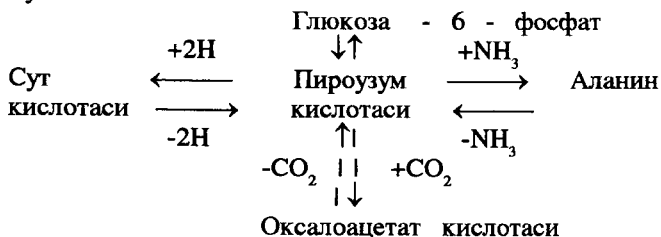
Ишининг бориши. 1 г куён жигарини ўлчаб олиб, 10 мл сувда эзилади. Ҳосил бўлган аралашма 200 мл колбага солинади ва колба белгисигача дистилланган сув қуйилиб, аралаштирилади, сўнгра 5 мл суюқлик олиниб, қандлар аниқланади. Яна 1 г жигарга 15 мл 2,5% ли хлорид кислота қўшиб эзилади. Аралашма 50 мл ли колбага солинади ҳамда қайнаб турган сув ҳаммомида 1 соат қайнатилади. Совигандан кейин суюқлик 200 мл ли колбага солинади ва белгисигача сув қуйилиб аралаштирилади. Кейин эса ундан 2 мл олиб, 1-2 томчи 10% ли натрий гидроксидидан қўшиб нейтралланади ва қандлар миқдори Хагедорн-Иенсен методи билан аниқланади.

Гликоген миқдорини ҳисоблаш. Гидролизланган 1 г жигардаги аниқланган глюкозанинг мг сонидан, гидролиздан аввал аниқланган 1 г жигардаги глюкозанинг миллиграмм миқдори айириб ташланади. Натижада олинган глюкозанинг мг даги ифодаси 0,9 коэффициентига кўпайтирилиб гликогеннинг миқдори аниқланади, яъни гликоген ва глюкозанинг оғирлиги эквивалент муносабатда бўлади. Куён жигарида гликоген 5-6 % атрофида бўлади.

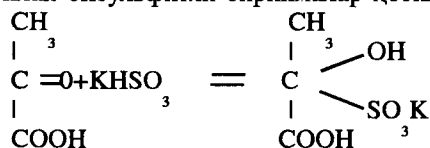
Пироузум кислота миқдорини аниқлаш

Пироузум кислотаси метаболик реакцияларда жуда муҳим роль ўйнайди.

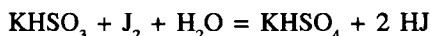
Пироузум кислота оксил, липид ва углеводлар алмашинувида муҳим аҳамиятга эга. Пироузум кислотаси қон плазмаси ва жигарда 0,8-1,5 мг%, мускул тўқимасида 3,0-3,5 % бўлади. В₁ витамин етишмаганда организмда пироузум кислотаси оксидланиши ва кислород ютилиш жараёнлари пасаяди. Натижада мияда ва бошқа тўқималарда пируват кислота тўпланади. Пироузум кислотаси сийдик билан ажралиб чиқади (соғлом одамларда –1 суткада 200 мг). Сутка давомида сийдикдаги пироузум кислотаси миқдорини аниқлаб, углеводлар алмашинуви жараёнини билиш мумкин.



Пироузум кислотаси кислотали муҳитда калий ёки натрий бисульфит билан бисульфитли бирикмалар ҳосил қилади:



Ортиқча калий бисульфит йод билан боғланади.



Пироузум кислотасининг бисульфитли бирикмасига ишқор таъсир эттирилса, пироузум кислотасига эквивалент миқдорида бисульфит ажралиб чиқади. Ажралиб чиққан бисульфат миқдори йод билан титрлаб аниқланади.

Керакли асбоблар: 25 мл ли колба; 1, 2, 10 мл ли пипеткалар; микробюретка.

Реактивлар. 1. Йоднинг 0,1 ва 0,01 н эритмаси. 2. Калий ёки натрий бисульфатнинг 1% ли эритмаси. 3. Натрий бикарбонат ёки гидрокарбонатнинг тўйинган эритмаси. 4. Натрий гипосульфитнинг 0,1 н эритмаси. 5. Крахмалнинг 1% ли эритмаси, бу натрий хлориднинг тўйинган эритмасида тайёрланади. 6. Оксалоацетат кислотасининг 0,1 н эритмаси. 7. Сийдик.

Ишнинг бориши. 25 мл ли колбага пипетка билан 1 мл сийдик солинади, сўнг унга 9 мл сув ва 1 мл оксалоацетатнинг 0,1 н эритмасидан қўшилгач, яхшилаб аралаштирилади, натижада кальций тузлари чўкмага тушади. Калий ёки натрий бисульфат эритмасидан 10 томчи қўшиб, аралашма чайқатилади ва колба 15 минут қоронғи жойга қўйилади. Шундан кейин 10 томчи крахмал эритмасидан қўшиб, ортиқча бисульфатни йоднинг 0,1 н эритмасидан кўк ранг ҳосил бўлгунча томчилаб қўшиб боғланади. Ортиқча йодни бартараф қилиш учун натрий гипосульфитнинг 0,1 н эритмасидан то кўк ранг йўқолгунча томчилаб қўшилади, шундан сўнг йоднинг 0,01 н эритмасидан (ортиқча гипосульфитни боғлаш учун) яна кўк ранг ҳосил бўлгунча қўшилади. Кейин 10 томчи натрий бикарбонатнинг тўйинган эритмасидан солинади (кўк ранг йўқолади) ва колбадаги суюқликни йоднинг 0,01 н эритмаси билан микробюретка орқали қайтадан кўк ранг ҳосил бўлгунча титрланади.

Сутка давомидаги сийдик таркибидаги пироузум кислотасининг миқдори қуйидаги формула билан ҳисобланади.

$$X = \frac{\mathcal{E} \cdot A \cdot 0,01 \cdot B}{I}$$

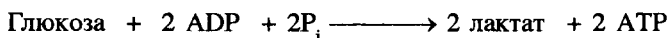
Бунда: $\mathcal{E}$ -пироузум кислотасининг грамм эквиваленти;
 А-титрлаш учун сарф бўлган 0,01 н йод эритмасининг миқдори,
 мл;

0,01 – йод эритмасининг нормаллиги;
B-сутка давомидаги сийдикнинг миқдори, мл;
I – текшириш учун олинган сийдикнинг миқдори, мл.

Гликолиз жараёнини аниқлаш

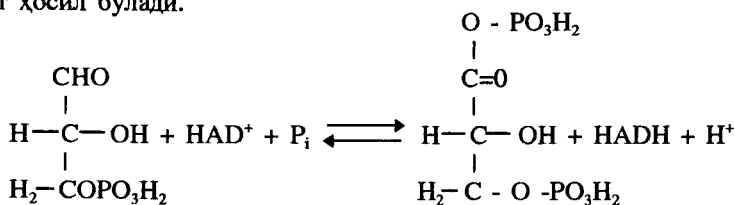
Углеводларнинг гликоген ёки глюкозадан бошланиб, анаэроб парчаланиши натижасида сут кислота ҳосил бўлиш жараёни **гликогенолиз** ёки **гликолиз** деб аталади. Бу жараён мураккаб бўлиб, жуда кўп ферментив реакциялар иштирокида боради.

Глюкозанинг анаэроб йўл билан парчаланишининг моҳияти, глюкоза 2 молекула сут кислотасига парчаланиши ва энергия ажралиб чиқишидан иборат бўлиб, умумий натижани қуйидагича ёзиш мумкин:



Агар бу жараён глюкозадан бошланса, биринчи босқичда глюкоза билан АТФ гексокиназа ферменти иштирокида ўзаро таъсир этиб, глюкоза - 6 - фосфатни ҳосил қилади. Гликогеннинг парчаланиши фосфорилиздан бошланади, бу реакция аорганик фосфор ва фосфорилаза ферменти иштирокида боради. Реакция натижасида глюкоза - 6 - фосфат ҳосил бўлади, бунга фосфоглюкомутаза ферменти таъсир этиб, глюкоза - 6 - фосфатни ҳосил қилади. Глюкоза ва гликогендан глюкоза - 6 - фосфат ҳосил бўлгандан кейинги парчаланиш босқичлари бир хил бўлади.

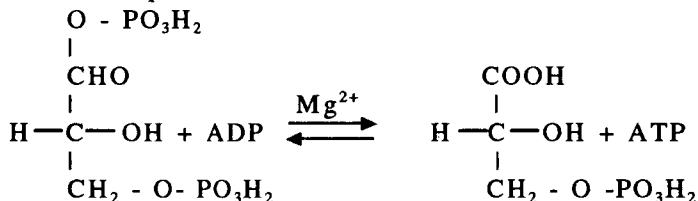
Гликолизнинг асосий реакцияларидан бири фосфоглицератальдегиднинг оксидланиш реакцияси бўлиб, реакция глицератальдегид - 3 - фосфатдегидрогеназа ферменти иштирокида боради. Бу фермент мураккаб оксил бўлиб, кофермент қисми никотинамидадениндинуклеотиддан (НАД^+) иборат. Бунда фосфоглицерат - 3 - альдегид НАД^+ ва аорганик фосфор иштирокида ўзига хос оксидланиш реакцияси орқали 1,3 - дифосфоглицерат ҳосил бўлади.



1,3 - дифосфоглицерат кислота фосфоглицераткиназа ферменти иштирокида АДФ билан перефосфорланиш реакциясига киришади, реакция натижасида 3-фосфоглицерат кислота ва АДФ ҳосил бўлади.

Шундай қилиб, бу реакциялар натижасида фосфоглицератальдегиднинг оксидланиш энергияси битта АТФ молекуласининг макроэргик фосфат боғи шаклида тўпланади.

Глицератальдегид - 3 - фосфатдегидрокиназа ферментига монойодацетат ёки монобромацетат таъсир эттирилса, фермент активлигини йўқотади. Инкубацион аралашмага монойодацетат қўшилса углеводларнинг парчаланиш реакцияси альдолаза босқичида тўхтайди, чунки тўпланган 3-фосфоглицератальдегид реакцияни фруктоза 1, 6 - дифосфат ҳосил бўлиши томон боришини таъминлайди.



3-фосфоглицерат кислота

Олдинги реакцияда, яъни фосфофруктокиназа таъсирида фруктоза - 6 - фосфатдан фруктоза - 1,6 - дифосфатни ҳосил бўлиш реакцияси қайтмасдир, шунинг учун оксидоредуктазаларнинг гликолитик реакциясини блокировка қилинганда фруктоза - 1,6 - дифосфат тўпланади.

Намуналарда гликолиз жараёни қандай борганлигини, инкубацион аралашмага монойодацетат иштирокида ва уни қўшмасдан туриб, фруктоза 1,6 - дифосфатнинг резорцин билан ҳосил қилган рангнинг интенсивлиги солиштириб кўрилади.

Реактивлар. 1.Фосфат буфери, 0,1 м, рН-7,6. 2.Гликогеннинг 0,5% ли эритмаси, фосфатли буферда тайёрланади. 3. CH_3JCOOH нинг 0,5 м эритмаси, рН-7,6 гача нейтралланади. 4. CCl_3COOH нинг 6 % ли эритмаси.

Ишнинг бориши. Гликолиз жараёнида иштирок этадиган ферментнинг манбаи сифатида мускул гомогенати қўлланилади.

Мускул гомогенатини тайёрлаш учун каламуш сўйилади. Мускулни бириктирувчи ёғ тўқималаридан ажратилади ва чинни идишга солиб, муз ҳаммомига қўйилади. Сўнг қайчи билан майдаланади ва ҳосил бўлган масса тортिलाди. Тортиб олинган мускул бўтқасини гомогенизация қилиш учун гомогенизаторнинг стаканига солинади, 6-7 ҳажмда (1 г мускул бўтқасига 6-7 мл) совитилган фосфат буферидан қўшилади. 1-2 минут гомогенизация қилинади. Гомогенизация + 2° + 4° да олиб борилади. Ҳосил бўлган мускул гомогенати 4 қаватли дока орқали филтрланади ва тажриба учун ишлатилади.

Тажриба учун учта пробирка олинади. Биринчи пробиркага мускул гомогенати қўшмасдан олдин 2 мл трихлорсирка кислотасидан солинади ва инкубация қилинмайди.

Тажриба олиб бориш учун қуйидаги схема тайёрланади.

Пробиркалар номери	Гликоген, мл	CH_2JCOOH , мл	H_2O , мл	Мускул гомогени, мл
1.	0,9	-	0,1	1
2.	0,9	0,1	-	1
3.	0,9	-	0,1	1

Иккинчи ва учинчи пробиркалар 90 минут 37°C да термостатда инкубация қилинади.

Инкубациядан кейин иккинчи ва учинчи пробиркаларга ҳам 2 мл дан трихлорсирка кислотасидан қўшилади ҳамда шиша таёқча билан аралаштирилади. 10-15 минутдан кейин учала намуна филтрланади. Ҳамма филтратлар фруктоза - 1,6 - дифосфатни аниқлаш учун ишлатилади.

Фруктозадифосфатни аниқлаш фруктоза билан резорцинни ҳосил қилган рангли реакцияга асосланган. Бунинг учун учта пробирка номери билан белгиланади. Биринчи пробиркага 1-номерли филтратдан, иккинчи пробиркага 2- номерли филтратдан, учинчи пробиркага 3-номерли филтратдан 1 мл солинади. Ҳамма пробиркаларга 0,1% ли резорциннинг 95% ли спиртдаги эритмасидан 1 мл ва 3 мл концентрланган хлорид кислота (солиштирама оғирлиги 1,15) қўшилади. Сўнгра шиша таёқча билан аралаштирилади ва 80° сув Ҳаммомига 10 минут қўйилади. Намуналардаги пайдо бўлган рангнинг интенсивлигига қараб фруктозадифосфат ҳосил бўлганлигини билиш мумкин.

Ҳосил бўлган фруктозадифосфатнинг миқдорини аниқлаш учун калибрланган график тузилади. График тузиш учун турли миқдордаги фруктоза тутувчи стандарт эритмалар тайёрланади. Асосий эритманинг 1 мл 100 мкг фруктоза сақлайди. Шу асосий эритмадан 6 та пробиркаларга турли концентрациядаги фруктоза эритмаси тайёрланади. Бу қуйдаги кўрсатилган схема бўйича тайёрланади.

Намуналардаги ранг ҳосил бўлгандан кейин, спектрофотометрда 390 нм тўлқин узунлигида қўрилади.

Пробиркалар номери	Фруктоза, мл	H_2O , мл	Резорцин, мл	HCl , мл
1.	0,2	0,8	1,0	3,0
2.	0,4	0,6	1,0	3,0
3.	0,6	0,4	1,0	3,0
4.	0,8	0,2	1,0	3,0
5.	1,0	-	1,0	3,0
6.	-	1,0	1,0	3,0

График тузиш учун намуналарнинг оптик зичлиги катталигини ординат ўқига, абсцис ўқига фруктозанинг миқдори қўйилади. Текшири-лаётган намуналарнинг оптик зичлигига қараб, графикдан қанча миқдор фруктоза борлиги аниқланади.

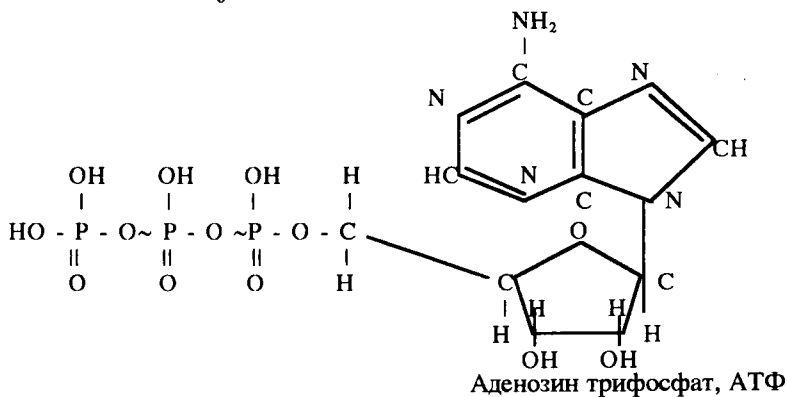
Намуналардаги фруктоза миқдорини аниклаш учун, фруктозадифосфатнинг оптик зичлиги 1,9 коэффициентига кўпайтирилади. Шундан кейин графикдан тажриба намуналаридаги фруктоза миқдори ҳисоблаб топилади ва намуналардаги гликолиз реакцияси қандай борганлиги ҳақида хулоса ёзилади.

Тўқималардаги АТФ миқдорини аниклаш

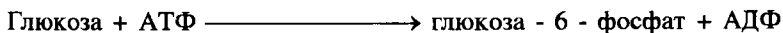
АТФ энергияга бой бўлган муҳим компонентдир. Макроэргик боғлари, яъни ортофосфат орасидаги пирофосфат боғлари узилганда ҳар бири 1 моль ҳисобига 7000-8000 кал энергия ажратади.

Хужайрадаги АТФ жуда кўп метаболик жараёнларда иштирок этади. Масалан, жуда кўп ферментатив реакциялар АТФ иштирокида боради: фосфофруктокиназа, цитратсинтеаза, НАД-изоцитратдегидрогеназа ва бошқалар. АТФ шунингдек, оксидланиш, фосфорланиш жараёнларида ҳам иштирок этади.

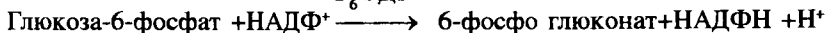
Методнинг моҳияти. АТФ миқдорини тўқималарда аниклаш Ламп-рехт ва Тратшольд (1965) методига асосланган. АТФ гексокиназа иштирокида глюкозани фосфорлайди. Реакция натижасида глюкоза - 6 - фосфат ҳосил бўлади. Ҳосил бўлган глюкоза - 6 - фосфат глюкоза - 6 - фосфатдегидрогеназа (G_6FDG) учун субстрат ҳисобланади.



Гексокиназа Mg^{2+}



G_6FDG



Реакция тенгламасидан кўриниб турибдики, реакция учун сарф бўлган АТФ нинг миқдори, глюкоза - 6 - фосфатдегидрогеназа ферменти таъсирида ҳосил бўлган НАДФН миқдorigа эквивалент, яъни эквимо-

лярдир. У спектрофотометр билан 340 нм тўлқин узунлигида ўлчанади. Бу метод билан яна реакциянинг оралиқ маҳсулотли, глюкоза – 6 – фосфатни ҳам ўлчаш мумкин.

Керакли асбоблар: центрифуга; спектрофотометр; суюқ азот; муз ҳаммони; ҳовонча; 0,1 ва 2 мл ли пипеткалар.

Реактивлар. 1. HClO_4 кислотасининг 6% ли эритмаси. 2. K_2CO_3 нинг 5 М эритмаси. 3. Учётанолламин буфери 0,05 М (рН 7,5). 4. MgCl_2 нинг 0,1 М эритмаси. 5. НАДФ нинг 7,5 М эритмаси. 6. Глюкозанинг 0,5 М эритмаси. 7. Гексокиназа (КФ. 2.7.1.1.): 10-15 мг гексокиназани кристалдан олиб, 1 мл дистилланган сувда эритилади. 8. Глюкоза - 6 - фосфатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.49) 3,3 М аммоний сульфатдаги фермент суспензиясини ишлатишдан олин дистилланган сув билан 5-10 марта суюлтирилади. 9. Тўқима.

Ишнинг бориши. Тўқима суюқ азотда музлатилади ва ҳовончада эзилади. Эзилган тўқимадан 500 мг олиб, олдиндан 1 мл 6% ли HClO_4 кислотасидан солинган центрифуга пробиркаларига солинади ва муз ҳаммомига қўйилади. Намуналардаги тўқима: кислота – 1:3,35 нисбатда бўлиши керак. Пробиркалардаги суюқликлар аралаштирилади ва реакцияларнинг метаболитлари яхши экстракция бўлиши учун 10 минут муз ҳаммомига қўйилади. Шундан кейин 3000 айл/тезлигида 10 минут центрифуга қилиб, оксиллар чўкмага туширилади.

Оксилсиз экстракт центрифуга пробиркасига қўйилади. Ортиқча HClO_4 кислотасини ажратиш учун, 1 мл кислотали экстрактга 0,05 мл 0,5 м K_2CO_3 эритмасидан қўйилади, сўнгра намуна 10 минут муз ҳаммомига қўйилади, ҳосил бўлган чўкма 5 минут 3000 айл/тезлигида центрифуга қилиб ажратилади. Нейтрализация қилинган тўқима экстракти хона ҳароратида сақланади ва ферментатив реакция учун ишлатилади.

Ферментатив анализ қилиш учун спектрофотометр кюветасига (1 см) 2,5 мл учётанолламин буферидан, 0,05 мл НАДФ эритмасидан ва 0,35 мл MgCl_2 эритмасидан солинади, сўнгра 0,1 мл тўқима экстрактдан қўшиб аралаштирилади ва 3 минут кейин дастлабки оптик зичлигининг катталиги ўлчанади (E_1). Сўнгра намунага 0,05 мл глюкоза - 6 – фосфатдегидрогеназа суспензиясидан қўшилади ҳамда 5 минут кейин оптик зичлиги (E_2) ўлчанади. Глюкоза - 6 – фосфатдегидрогеназа қўшилгандан кейин намуна оптик зичлигининг ортиши тўқима экстракти таркибидаги глюкоза – 6- фосфат оксидланишига боғлиқ.

Кюветага 0,4 мл глюкоза эритмасидан қўшилади ва 30 секунддан кейин оптик зичлиги ўлчанади, оптик зичлиги камаяди, чунки глюкоза эритмаси қўшилганда намуна суюлади. 0,05 мл гексокиназа суспензиясидан қўшилади ва реакция тамом бўлгандан (12-15 минутдан) кейин оптик зичлиги ўлчанади (E_4). Намунага гексокиназа қўшилганда оптик зичлигининг ортиши экстракт таркибидаги АТФ микдори ферментатив реакцияга жалб қилинганлигидан дарақ беради.

Намунадаги АТФ миқдори қуйидаги формула билан ҳисобланади:

$$X = \frac{\Delta \varepsilon V K}{6,22}$$

Формуладаги $\Delta \varepsilon$ -намуна оптик зичлигининг ўзгариши, ферментатив реакция системасида АТФ сарфланиши билан оптик зичлик ўзгаради, яъни $\Delta \varepsilon = E_4 - E_3$ га тенг, V-кюветадаги наmunанинг охириги ҳажми (3,5). K наmunанинг 1 г тўқимага нисбатан суялтириш коэффициентини, бу ҳолатда суялтириш коэффициентини 41,6 тенг. Суялтириш коэффициентини қуйидагича ҳисобланади. 1г тўқимадаги оксилларни чўктириш учун 9 мл HClO_4 кислотаси қўшилади. Тўқимадаги сувнинг ўртача миқдори ҳам ҳисобга олинади. 6,22-340 нм тўлқин узунлигида пиридин нуклеотидларини қайтарилган формаларини микромоляр экстинкция коэффициентини. Кюветани кенглик қавати 1 см. Экстинкцияларнинг фарқига қараб $\Delta \varepsilon = E_2 - E_1$, намунадаги глюкоза-6-фосфатнинг миқдорини ҳисоблаш мумкин. Қуйида каламуш тўқималари таркибидаги АТФ нинг миқдори мкмоль билан ҳисобланади.

Бош мия	2,65± 0,19
Жигар	2,51± 0,31
Юрак	2,31± 0,30

VI БОБ. НУКЛЕИН КИСЛОТАЛАР

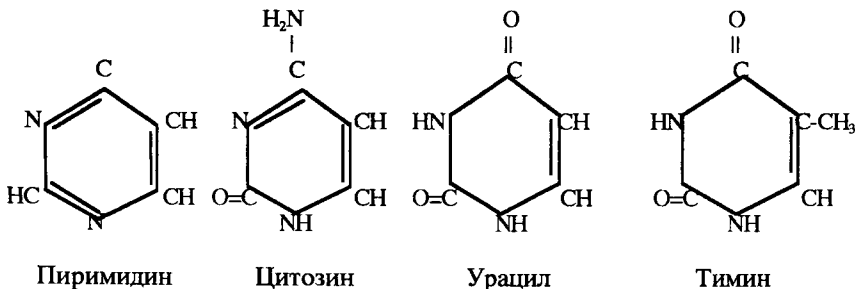
Нуклеин кислоталар – ДНК (дезоксирибонуклеин) ва РНК (рибонуклеин) кислоталар организмда ҳамма ирсий белгиларни сақлашда ва оксиллар синтезида асосий роль ўйнайди. Дезоксирибонуклеин кислота эукариотларда (ҳайвонлар ва ўсимликларда) асосан ядрога жойлашган.

Митохондрияларда ҳам озроқ ДНК мавжуд. Эукариотларнинг ядросида бир неча пикограмм (пг) ДНК бор: сут эмузувчиларда 6 пг, қушларда 2 пг.

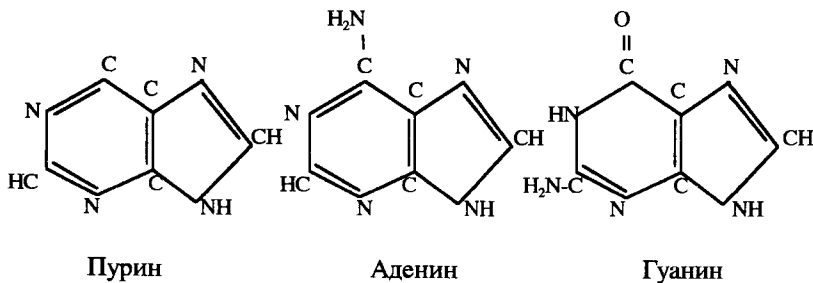
Рибонуклеин кислоталарнинг уч тури бор: информацион РНК (и-РНК), транспорт РНК (т-РНК), рибосомал РНК (р-РНК). Булар бир – биридан таркиби, размери, функционал хоссалари ва ҳужайрадаги жойланишига қараб фарқ қилади. РНК асосан ҳужайра цитоплазмасида, камроқ микдорда ядрога учрайди. Ҳужайрада РНКнинг бажарадиган функцияси оксил молекулалари синтезида қатнашишдан иборат.

Нуклеин кислоталар (полинуклеотидлар) – нуклеотидлардан тузилган полимерлардир. Нуклеотидлар уч компонентдан: азот асослари (пурин ёки пиримидин), углевод компонентлари – пентоза (рибоза ёки дезоксирибоза) ва фосфор кислота қолдигидан тузилган.

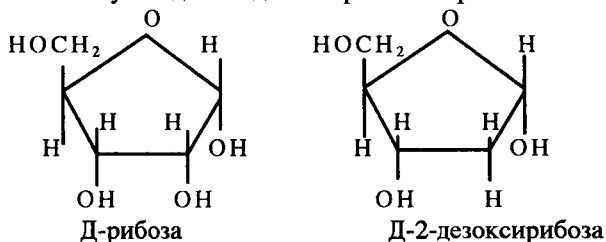
Пиримидин асослари:



Пурин асослари:



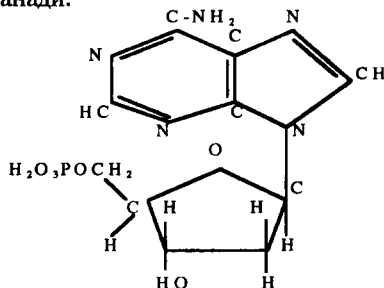
Таркибида қандай пентоза борлигига қараб, нуклеин кислоталар иккита гуруҳга: РНК ва ДНК га бўлинади РНК молекуласи таркибида рибоза, ДНК молекуласида эса дезоксирибоза бор.



РНК таркибидаги азот асосларидан аденин, гуанин, цитозин ва урацил, углевод компонентларидан рибоза мавжуд. ДНК таркибида эса азот асосларидан-аденин, гуанин, цитозин ва тимин, углевод компонентларидан дезоксирибоза учрайди. ДНК – икки спираль занжирли полинуклеотидлардан, РНК – бир спиралли занжирдан иборат.

Нуклеотидлар таркибида аденин бўлса, аденилат, гуанин бўлса гуанилат, цитозин –**цитодилат кислотаси** деб аталади.

Нуклеин кислоталарининг ўзи гидролизланганда бирин-кетин нуклеотидларга, нуклеотидлар эса ўз навбатида нуклеозидларга ва фосфат кислотага, нуклеозидлар –азот асосларига ва углеводларга (рибоза, дезоксирибоза) парчаланади.



ДНК нинг сифат реакцияси

Дезоксирибозага хос характерли сифат реакцияси натижасида ДНК аниқланади. Бу реакция учун кўпинча дифениламин ($C_6H_5-NH-C_6H_5$) қўлланади. Дифениламин дезоксирибоза ва ДНК билан кўк рангли бирикма ҳосил қилади. Рибоза ва РНК дифениламин билан яшил рангга киришади.

Керакли асбоблар: пробиркалари билан яшати; пипеткалар; сув ҳаммоми.

Реактивлар. 1. Дифениламин реактиви: 1 г дифениламин 100 мл сирка кислотасида эритилади, эритмага 2,75 мл концентрланган сульфат кислотаси солинади. 2. Натрий ишқорининг 0,4% ли эритмаси.

Ишнинг бориши. ДНК нинг чўкмасидан озгина пробиркага солинади (ДНК чўкмасини олиш юқорида изоҳланган) ва 1 мл натрий ишқори эритмасидан қўшиб эритилади. Тенг ҳажмда дифениламин реактивидан то чўкма эригунча қўшилади ва 15-20 минут қайнаб турган сув ҳаммомига қўйилади. Натижада кўк ранг ҳосил бўлади. Нуклеин кислоталарининг гидролизи ва гидролиз маҳсулотларининг рангли реакциялари нуклеопро-теинлар бўлимида тўла кўрсатилган.

Ҳайвон тўқимасидаги нуклеин кислоталарининг умумий миқдорини аниқлаш

Метод пурин ва пиримидин асослари ультрабинафша нурларининг 260-280 нм тўлқин узунлигидаги қисмини ютишга асосланган. Ҳайвон тўқимасидаги умумий нуклеин кислоталарининг миқдорини аниқлаш методини А.С.Спирин яратган бўлиб, кислотада эрувчи нуклеотидлар совутилган 0,2 н хлор кислотаси билан ажратиб олинади, нуклеин кислоталарнинг экстракцияси ва гидролизи 0,5 н хлор кислотаси билан 100°C да олиб борилади, экстрактларнинг оптик зичлиги 270 ва 290 нм тўлқин узунлигида аниқланади ва формула бўйича ҳисобланади.

Керакли асбоблар: пробиркалари билан штатив; пипеткалар; центрифуга; спектрофотометр; сув ҳаммоми.

Реактивлар. 1. Перхлорат кислотасининг 0,2 н ва 0,5 н эритмаси.

Ишнинг бориши. 100-200 мг тўқима тортиб, майдаланади ва центрифуга стаканига солиб, унга 5-10 мл совутилган 0,2 н хлор кислотаси эритмасидан қўшилади. Стаканлардаги суюқлик яхшилаб аралаштирилади, сўнгра 3000 айл/мин тезлигида 5 минут центрифуга қилинади. Центрифугат ташлаб юборилади, чўкмага эса 5-10 мл 0,5 н HClO_4 кислотасини эритмасидан қўшилади ва пробиркалар қайнаб турган сув ҳаммомига 20 минут қўйилади.

Гидролизат совутилиб, центрифуга қилинади ҳамда спектрофотометрда 270 ва 290 нм тўлқин узунлигида контроль 0,5 н HClO_4 эритмасига нисбатан ўлчанади, оптик зичлиги аниқланади. 1 мл текширилаётган эритманинг нуклеин кислотасидаги фосфор миқдори мкг да ҳисобланади.

$$C_{\text{мкг}} P_i = \frac{D_{270} - D_{290}}{0,19}$$

Бунда 0,19 – 1 мл эритма нуклеин кислота таркибидаги фосфорнинг (1 мкг) оптик зичлик кўрсаткичи.

Нуклеин кислоталарнинг миқдори уларнинг таркибидаги фосфорга қараб ҳисобланади ва бунда ўртача ҳисоблаш коэффициенти 10,3 қўлланади.

$$C_{\text{мкг}} \text{ НК} = C_{\text{мкг}} P_i \cdot 10,3$$

10,3 – ўртача ҳисоблаш коэффициенти.

VII БОБ. ФЕРМЕНТЛАР

Ферментлар тирик организмларнинг ҳамма ҳужайралари ва тўқималарнинг таркибига кириб, биологик катализаторлик вазифасини бажарадиган специфик оксиллардир. Тирик организмларнинг фаолияти ферментларга боғлиқдир. Организм билан ташқи муҳит ўртасидаги моддалар алмашинуви жараёнида ферментларнинг ғоят катта аҳамияти бор.

Оддий оксиллардан, яъни фақат аминокислоталардан ташкил топган ферментлар бир компонентли ферментлар дейилади. Масалан, рибонуклеаза, трипсин, папаин ва бошқалар. Агар ферментлар мураккаб оксиллардан ташкил топган бўлса, яъни уларнинг таркибида аминокислоталардан ташқари бошқа бирикмалар ҳам учраса, улар икки компонентли ферментлар деб аталади. Оксидланиш-қайтарилиш реакцияларида иштирок этувчи ферментлар икки компонентли ферментлардир.

Ферментлар бир қатор ўзига хос хусусиятларга эга. Буларга ферментларнинг термолабиллиги, спецификлиги, муҳит рНининг ўзгаришига нисбатан сезувчанлиги, активатор ва ингибиторларнинг таъсирига сезувчанлиги, активатор ва ингибиторларнинг таъсирига мойиллиги киради. Ферментларнинг таъсири ва уларнинг активлиги реакцияда иштирок этаётган модданинг камайишига (модда субстрат деб аталади) ёки ҳосил бўлаётган модданинг ортиб боришига қараб белгиланади. Ҳозирга қадар маълум бўлган ферментлар 6 синфга бўлинади.

1. Оксидоредуктазалар - оксидланиш ва қайтарилиш реакцияларини катализлайди.

2. Трансферазалар - маълум химиявий гуруҳларни бир бирикмадан иккинчи бирикмага кўчирилишини таъминлайди.

3. Гидролазалар-мураккаб органик бирикмаларнинг сув ёрдамида парчаланиш реакцияларини катализлайди.

4. Лиазалар-субстратдан сув иштирокисиз маълум гуруҳларнинг ажрилишини катализлайди. Бу ферментлар фаолияти туфайли ё кўшбоғ ҳосил бўлади ёки маълум гуруҳларнинг кўш боғларга бирикиши таъминланади.

5. Изомеразалар - ҳар хил органик бирикмаларнинг изомерланиш реакцияларини катализлайди.

6. Лигазалар-АТФ ёки шунга ўхшаш нуклеозид трифосфатлар энергиясини ҳисобига оддий молекулалардан мураккаб бирикмалар ҳосил бўлиши реакцияларни катализлайди.

Ферментларнинг активлигини аниқлашда химиявий усуллар билан бир қаторда спектрофотометрик, монометрик, хроматографик ва бошқа усуллардан кенг фойдаланилмоқда.

Амилазанинг крахмалга таъсири

Амилаза ферменти крахмални қандгача парчалайди. Амилаза ферменти сўлакда, ошқозон ости безининг ширасида, қонда, жигарда учрайди. Дон ўсимликлар амилаза ферментининг энг муҳим манбаларидан бири ҳисобланади.

Амилаза ферменти крахмални қандгача парчалайди. Амилаза ферментнинг муҳим манбаларидан бири дон ўсимликлари ҳисобланади. Улар қуруқ донда ва айниқса унаётган донларнинг таркибида кўп миқдорда тўпланади. Унаётган донлар таркибидаги ферментлар энг юқори активликка эга бўлади.

Крахмал йод билан кўк ранг беради, унинг парчаланиши натижа-сида ҳосил бўлган декстрин заррачалар катта-кичиклигига қараб йод билан бинафша, қўнғир - қизил, сарғиш ва сариқ ранггача (йоднинг сувдаги ранги) ўзгаради. Шунинг учун агар крахмал эритмасига амилаза ферментидан қўшилса, маълум вақт ичида йод таъсирида аралашма аввал кўк, кейин эса бинафша, қизил-сарғиш ва сариқ ранггача ўзгаради.

Ишнинг бориши. 9 та пробирка олиб ҳар бирига 2-3 мл дистилланган сув ва бир томчидан 1% ли йод эритмасидан қуйилади. Алоҳида 10-пробиркага 2-3 мл крахмалнинг 0,5 % ли эритмасидан олиб унинг устига 1 мл фермент қуйилади. Вақтни белгилаб, пробиркадаги аралашмани яхшилаб чайқатилади. Сўнгра пипетка ёрдамида 1 томчи аралашма биринчи пробиркага солинади. Пробиркадаги суюқлик кўк рангни беради. Шундай қилиб, ҳар 30 секунддан кейин 2-,3-,4- ...ва ҳоказо 9-пробиркаларга бир томчидан 10-пробиркадаги аралашмадан солиб чиқилади. Пробиркалардаги суюқликлар яхшилаб аралаштирилади ва тегишли ранглар ҳосил бўлади. Агар иккинчи пробиркадаги суюқлик кўк ранг берса, ундан кейинги пробиркаларга бирмунча узоқроқ вақтдан кейин, масалан, ҳар бир минутдан сўнг солиш керак. Бордию иккинчи пробиркада бинафша ёки қизғиш ранг ҳосил бўлса, унда вақтини тезлатиш керак, яъни ҳар 15 секундда солиш керак бўлади. Пробиркалардан биридаги сариқ ранг ўзгармай қолса, бу крахмал гидролизининг тугаганлигини билдиради. Тажриба натижаси қуйидаги жадвалга ёзилади.

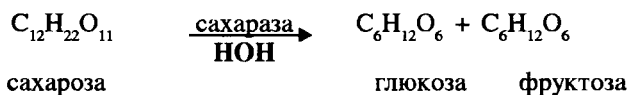
Реактивлар: Сўлак (сўлакнинг дистилланган сув билан 10 марта суюлтирилгани); фермент шираси (5-10 грамм унган ёки 5 кунлик дон майсалари яхшилаб майдаланади ва қолбага солиниб устига 100 мл дистилланган сув қуйилади. Яхшилаб аралаштирилиб 30 минут давомида қолдирилади, сўнгра филтрланади. Филтрдан ўтган суюқлик фермент шираси ҳисобланади. Йоднинг 1% ли эритмаси, крахмалнинг 0,5% ли эритмаси.

Амилаза ферментининг крахмалга таъсири

Пробиркалар	1	2	3	4	5	6	7	8	9
суюқлик ранги ҳосил бўлган маҳсулот номи									

Сахараза ферментининг активлигини аниқлаш

Сахараза (инвертаза) ферменти сахарозани гидролизлаб глюкоза ва фруктозагача парчалайди.



Сахараза ферменти кўпчилик ўсимликлар таркибида учрайди. Айниқса у ачитки замбуруғларида кўп бўлади. Фермент активлигининг аниқлашда бир қатор усуллардан фойдаланилади. Булардан бири юқоридаги реакция маҳсулотларининг қайтарувчанлик хусусиятларига асосланган бўлиб, глюкоза ва фруктоза тегишли кислоталаргача оксидланади, мис ионлари эса қайтарилади.

Ишнинг бориши. 2 та пробиркага 1 мл дан 0,5% ли сахароза эритмасидан солинади. 1 пробиркага 1 мл сув, иккинчисига эса 1 мл сахароза ферменти ширасидан қўшилади ва 15 минут 35°C инкубацияга қўйилади. Белгиланган вақт тугагач, ҳар иккала пробиркага 2 мл натрий гидроксиднинг 20 % ли эритмасидан ва 5-6 томчи мис сульфатнинг 2 % ли эритмасидан қўшиб қиздирилади. Фермент таъсир қилган пробиркада қизил чўкма ҳосил бўлади.

Реактивлар: Сахараза ферменти шираси, шира ачитки замбуруғларидан олинади. Бунинг учун 5 грамм ачитки чинни ҳовончада эзилади, сўнгра унга 5 мл диситилланган сув қўшиб эзиш давом эттирилади. Ҳовончага яна 10 мл иссиқ (60°) сув қўшилади ва 10 минут давомида эзилади. Бундан сахароза ферменти эритмага ўтади. Аралашма филтрдан ўтказилади, филтрдан фермент шираси сифатида фойдаланилади. Сахарозанинг 0,5 % ли эритмаси натрий гидроксиднинг 20 % ли эритмаси, мис сульфатнинг 2 % ли эритмаси.

Ферментларнинг термолабиллиги

Ферментлар оксил табиатига эга бўлгани учун, уларнинг муҳим характерли хоссаси термолабиллиги, яъни юқори ҳароратга сезгирлигидир. Ферментатив жараёнлар 70°C дан юқори ҳароратда давом эта олмайди,

80-100°C да ферментлар ўзининг каталитик хоссаларини бутунлай йўқотиб қўяди, оксил қисми денатурацияга учрайди. Ҳамма ферментлар учун муайян бир ҳарорат бўлиб, бунда фермент юқори активликка эга бўлади. Иссиқ қонли ҳайвонларнинг ҳужайра ва тўқималаридан ажратиб олинган кўпчилик ферментлар учун энг қулай ҳарорат 37-40°C дир.

Ўсимлик таркибидаги ферментларнинг ҳарорат оптимуми 40°-60° га тенг бўлади. Паст (0° дан паст) ҳароратларда ферментларнинг активлиги пасаяди ёки бутунлай тўхтайтиди. Бироқ бунда улар денатурацияга учрамайди.

Методнинг принципи. Амилаза ферментининг активлигига турли шароитдаги ҳароратнинг таъсири текширилади.

Керакли асбоблар: пробиркалари билан штатив; пипеткалар; 50 мл ли стакан; спиртовка; термостат; муз ҳаммоми.

Реактивлар. 1. Суюлтирилган сўлак (оғиз дистилланган сув билан чайиб ташланади, кейин оғизга 10-15 мл сув солиб 2-3 минут ушлаб турилади ва стаканга солинади). Амилаза ферменти шираси. 2. 1% ли крахмалнинг 0,3 % ли натрий хлориддаги эритмаси. 3. Йоднинг калий йоддаги эритмаси (1 мл дистилланган сувда 1 г калий йод эритилади, эритма ҳажмини 300 мл га сув билан олиб борилади). 4. Мис сульфатнинг ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 5 % ли эритмаси.

Ишнинг бориши. Учта пробиркага 1-2 мл дан суюлтирилган сўлак (амилаза) солинади. Биринчи пробиркадаги сўлак 2-3 минут қайнатилади. Сўнгга ҳамма пробиркаларга 3-4 мл дан крахмал солинади. Биринчи ва иккинчи пробирка 15-20 минут 37°C ли термостатга инкубацияга қўйилади. Учинчи пробирка 15-20 минут муз ҳаммомига қўйилади.

Инкубациядан кейин ҳар бир пробиркадаги суюқлик иккига бўлиниб, пробиркаларга солинади ва А ҳамда Б қатордаги пробиркалар деб белгиланади. А қатордаги пробиркаларга бир неча томчи йоднинг калий йоддаги эритмасидан солинади, Б қатордаги пробиркаларга эса 20% ли натрий ишқоридан 2-3 мл ва 3-4 томчи 5% ли мис сульфат эритмасидан солиб қиздирилади, яъни Троммер реакцияси бажарилади. Тажрибадан олинган натижалар жадвалга ёзилади ва ферментларнинг термобиллиги ҳақида хулоса қилинади.

Пробиркаларнинг номери	Фермент	Таъриба шароити	Субстрат	Инкубация	пробиркалари	
					А қатор	Б қатор
1	Амилаза	Денатурацияга учраган ферментлар Натив ҳолатдаги фермент	Крахмал	15-20 минут 37°C		
2	Амилаза	Натив ҳолатдаги фермент	Крахмал	15-20 минут 37°C		
3	Амилаза		Крахмал	15-20 минут 37°C		

Ферментлар активлигига муҳит рН нинг таъсири

Ферментларнинг характерли хусусиятларига уларнинг муҳит рН нинг ўзгаришига сезгирлиги киради. Ферментларнинг активлиги рН қийматига қараб кескин ўзгариб туради. рН нинг оптимал қиймати турли ферментлар учун бир хил эмас. Масалан: рН нинг оптимал қиймати пепсин учун 1,5-2,0; сўлак амилазаси - 6,8-7,0; трипсин 7,8 га тенг. Кўпчилик ферментлар нейтрал ёки кучсиз ишқорли ёки кучсиз кислотали реакцияда ҳаммадан кўп активликка эга бўлади. Ферментлар изоэлектрик ҳолатда ҳаммадан катта активликка эга бўлади. Оптимал активлик зонаси доираларда ферментлар заррачалари электр майдонида одатда катодга ҳам, анодга ҳам қараб ҳаракатланмайди. рН нинг ўзгариши фермент фаолиятини пасайишига ёки бутунлай тўхташига олиб келади. Натижада ферментнинг актив марказ структураси бузилади.

Реактивлар: 1. 1% ли йоднинг калий йоддаги эритмаси. 2. Крахмалнинг 1% ли эритмаси. 3. Хлорид кислотасининг 0,2 н эритмаси.

Ишнинг бориши. 8 та пробиркага 1 мл дан дистилланган сув солинади, сўнгра биринчи пробиркага 1 мл 0,2 н ли хлорид кислотаси эритмасидан қўшилади ва аралаштирилади. Сўнгра шу пробиркадаги суюқликдан 1 мл олиниб, 2-пробиркага солинади ва аралаштириб, ундан ҳам 1 мл олинади-да, 3-пробиркага қўйилади ва ҳоказо. 8-пробиркадан 1 мл олиниб тўкиб ташланади. Шундай қилиб, хлорид кислотанинг ҳар хил концентрацияси ҳосил қилинади, улар муҳитнинг ҳар хил рН қийматига тўғри келади. Шундан кейин ҳар бир пробиркага 2 мл дан 1% ли крахмал эритмасидан ва 1 мл дан суюлтирилган сўлак эритмасидан қўшилади, пробиркалар чайқатилади ва 20 минут 37°С да термостатга қўйилади. Совутилгандан кейин ҳамма пробиркаларга 1-2 томчидан 1% ли йоднинг калий йоддаги эритмасидан қўшилади. 5 ва 6-пробиркаларда крахмалнинг тўла гидролизи рўй бергани белгиланади, бу пробиркаларда эритма муҳитининг рН 6,8-7,2 атрофида, шунинг учун амилаза оптимал активликка эга бўлади.

Ферментларнинг ўзига хослиги

Ферментлар биологик катализатор бўлиб, улар ўзига хос таъсир қилиш хусусиятига эга. Уларнинг бундай ўзига хослиги тирик организмларга хос бўлган муҳим хусусиятлардан бири ҳисобланади. Каталитик жараёнларда фермент-субстрат комплексининг ҳосил бўлиши, ферментларнинг оксил молекуласи тузилишига, унинг актив қисмлари билан субстратнинг тегишли гуруҳлари ўртасидаги химиявий боғлар ҳосил бўлишига боғлиқ. Ҳар бир фермент маълум бир субстратга ёки молекуладаги химиявий боғнинг маълум типигагина таъсир этади. Шундай қилиб, ферментларнинг ўзига хос моҳияти, фермент субстратга калит қулфга тушгандай мос келиши зарур.

Методнинг принципи. Амилаза ва сахароза ферментларини турли субстратга, яъни крахмал ва сахарозага таъсири текширилади.

Керакли асбоблар: пробиркалар билан штатив; пипеткалар; термостат, спирт лампаси.

Реактивлар. 1.Крахмалнинг 1 %ли эритмаси. 2.Сахарозанинг 2 % ли эритмаси. 3.Суюлтирилган сўлак; Амализа ферменти шираси. 4.Сахароза (10 г ачитқини 100 мл дистилланган сувда гомогенизация қилинади). 5.Натрий ишқорининг 20 %ли эритмаси. 6.Мис сульфатнинг 5 %ли эритмаси.

Ишнинг бориши. Биринчи ва иккинчи пробиркаларга 2-4 мл крахмал эритмасидан; учинчи ва тўртинчи пробиркаларга 2-4 мл суюлтирилган сўлак (амилаза), иккинчи ва тўртинчи пробиркаларга 2-4 мл сахароза ферменти солинади, сўнгра пробиркаларни чайқатиб, 20 минут 37°C ли термостатга инкубация қилиш учун қўйилади. Инкубациядан кейин 1 ва 2-пробиркаларга 1-2 томчи йоднинг калий йоддаги эритмасидан томизилади. 3- ва 4- пробиркаларга 2-4 мл натрий ишқорининг 20% ли эритмасидан, 2-4 томчи мис сульфатнинг 5% ли эритмасидан солиб киздирилади. Реакция натижалари жадвалга ёзиб, хулоса қилинади.

Пробиркалар номери	Субстрат	Фермент	Инкубация	Йод билан ҳосил бўлган ранг	Троммер реакцияси натижаси
1	Крахмал	Амилаза	20 мин. 37°C		
2	Крахмал	Сахароза	20 мин. 37°C		
3	Сахароза	Амилаза	20 мин. 37°C		
4	Сахароза	Сахароза	20 мин. 37°C		

Ферментларнинг активлигига таъсир қилувчи моддалар (ингибиторлар ва активаторлар)

Ферментларнинг активлигига реакция муҳитда иштирок этаётган бир қатор химиявий моддалар ҳам таъсир кўрсатади. Реакция муҳитда баъзи бир ионларнинг иштирок этиши ферментатив реакция тезлигини орттиради. Бундай моддалар активаторлар деб аталади. Активаторлик вазифасини кўпинча Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} каби металл катионлари бажаради. Ферментатив реакция активлигини пасайтирувчи моддалар **ингибиторлар** дейилади. Ингибиторларга цианидлар, оғир металл тузлари мисол бўла олади.

Реактивлар: сўлак ёки амилаза ферментининг шираси (солод), натрий хлориднинг 0,04 %ли эритмаси, мис сульфатнинг 0,1 %ли эритмаси, крахмалнинг 1 %ли эритмаси, йоднинг 1 %ли эритмаси.

Ишнинг бориши. Уч қатор (хар бир қаторда 6 тадан) пробирка тайёрлаб, ҳаммасига 1 мл дан сув қуйилади. Кейин хар бир қаторнинг биринчи пробиркасига 1 мл дан амилаза ферменти ширасидан қуйилади. Пипетка ёрдамида 1-пробиркадаги суюқлик аралаштирилиб, аралашма

2-пробиркага олинади ва яна бир марта аралаштириб 2-пробиркадан 3-пробиркага солинади ва ҳоказо. Охирги 6-пробиркадан 1 мл ортиқча аралашма олиб ташланади. Қолган қаторларда ҳам худди шундай қилинади.

Биринчи қатор пробиркаларига 1 мл сув, иккинчи қатор пробиркаларига натрий хлорид тузининг 0,04% ли эритмасидан, 1 мл учинчи қатор пробиркаларига мис сульфат тузининг 0,1% ли эритмасидан 1 мл қуйилади. Кейин ҳамма пробиркаларга 2 мл дан крахмал солинади ва 10 минутга 40°C инкубацияга қўйилади. Вақт тамом бўлгач ҳамма пробиркаларга 2-3 томчидан йод томизилади ва активатор ҳамда ингибиторлар таъсири аниқланади.

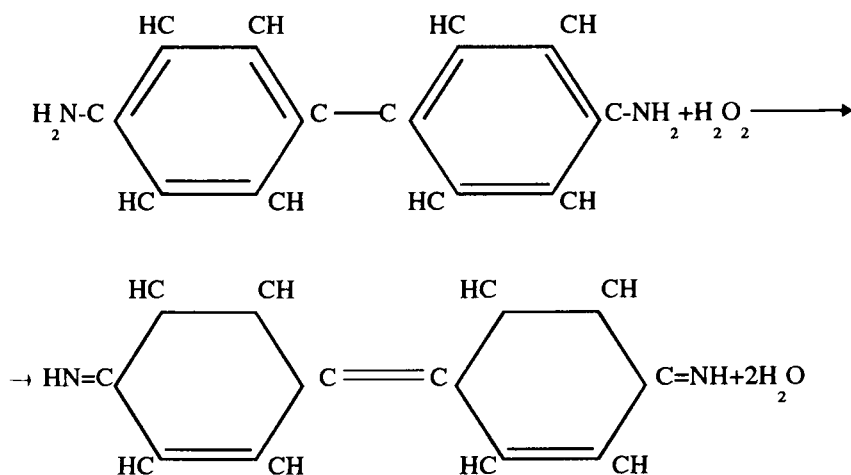
Пероксидаза активлигини аниқлаш

Пероксидаза ҳайвон ва ўсимлик тўқималарида кенг тарқалган, химиявий табиатига кўра гемопротеин бўлиб, простетик гуруҳининг таркиби темирпорфириндан иборат. Фермент бир қатор органик бирикмаларни (феноллар, полифеноллар, ароматик аминлар) водород пероксид иштирокида оксидланиш реакцияларини катализлайди.

Методнинг принципи. Пероксидаза бензидинни дифенохинондиимин-гача оксидланиш реакцияларини катализлайди:

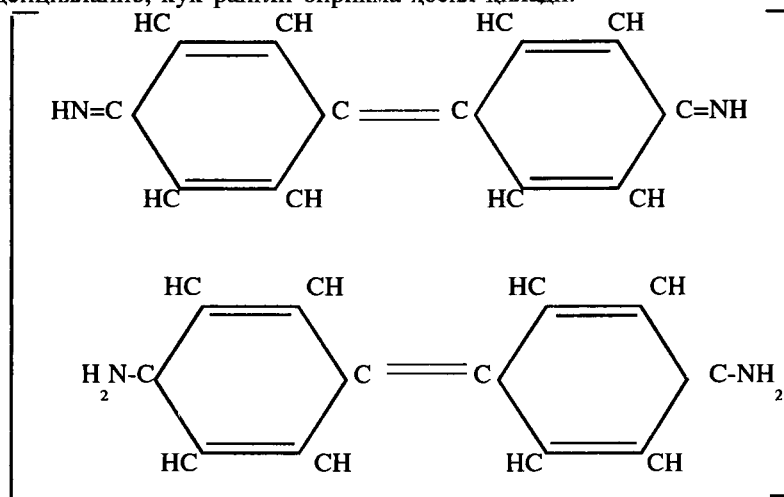
Керакли асбоблар: 25 мл ли колбалар; пипеткалар; спектрофотометр.

Реактивлар. 1. Янги қон. 1:1000 суюлтирилади. 2. 1% ли бензидиннинг сирка кислотадаги эритмаси.



Дифенохинондиимин

Дифенохинондиимин молекуласи бензидиннинг молекуласи билан конденцияланиб, кўк рангли бирикма ҳосил қилади.



Бензидин кўки

3. Водород пероксидининг 3% ли эритмаси. 4. Натрий ишқорининг 30% ли эритмаси. 5.Этил спирти. 6. 0,01 н калий перманганатнинг эритмаси. 7.Стандарт эритма, 25 мл ли колбага 2 мл 1% ли бензидин эритмаси, 3 мл 0,01 н калий перманганатнинг эритмасидан қўшилади ва 10 минут қолдирилади, шундан кейин 10 мл 30% натрий ишқорини эритмасидан солинади ҳамда колба белгисигача спирт қуйилади. Бу эритма фермент активлигини аниқлашдан олдин тайёрланади.

Ишнинг бориши. 25 мл колбага 2 мл бензидин эритмаси, 2 мл 3% ли водород пероксиди ва 1 мл суюлтирилган қон солинади. Колба чайқатилгач, 3 минутдан кейин 10 мл 30 % ли натрий ишқори эритмасидан қўшилади ва колба яна чайқатилади. Бўялган чўкма ҳосил бўлади, уни спиртда эритилгач колба белгисигача спирт қўшилади. Текшириляётган ва стандарт эритмалардаги рангнинг интенсивлиги спектрофотометрда ўлчанади.

Ферментнинг активлиги қуйидаги формула билан ҳисобланади.

$$X = \frac{h_2 \cdot 25}{h_1 \cdot 5}$$

Бунда h_1 – стандарт эритманинг оптик зичлигининг эктенкцияси;
 h_2 - текшириляётган эритманинг оптик зичлигининг эктенкцияси;
 25-колбадаги эритманинг ҳажми, мл; 5 - колбадаги бензидин, водород пероксиди ва қоннинг ҳажми, мл.

Глутаматдегидрогеназа ферментининг активлигини аниқлаш

Глутаматдегидрогеназа (Z-глутамат:НАДФ – оксидоредуктаза, К.Ф.1.4.1.3.) митохондриянинг ички мембранасига ва матриксига жойлашган. Бу фермент – субстратнинг оксидланиши, водород ажратилиши билан борадиган реакцияларни катализлайди. Донордан ажралиб чиқадиغان водород турли акцепторларга қўчирилади. Фермент активлигини аниқлаш НАДФН ни оксидланиш ёки НАДФ⁺ қайтарилиш тезлиги билан ўлчанади.

Керакли асбоблар: пробиркалар билан штатив; центрифуга; гомогенизатор; муз ҳаммоми; спектрофотометр; пипеткалар.

Реактивлар. 1. 0,25 М сахароза эритмаси. 2. 0,05 М Na, K – фосфатли буфер, pH 8,2. 3. 0,5% ли тритон X-100 эритмаси, Na₂K фосфатли буферда тайёрланади. 4. 0,25 М сахароза трис –HCl буфери, pH 8,2. 5. 10⁻³ М ЭДТА эритмаси. 6. 18×10⁻⁴ М НАДФ эритмаси. 7. 0,75 М глутамин кислотасининг эритмаси. 8. Тўқима.

Ишнинг бориши. Глутаматдегидрогеназанинг активлиги митохондрия фракцияларида аниқланади. Митохондрияни ажратиш учун 0,5 г тўқима олинади ва қайчи билан майдаланади. Тўқимани гомогенизация қилиш учун 0,25 М сахарозанинг 0,1 М ЭДТА даги эритмаси ишлатилади. Тўқиманинг 1:10 нисбатидаги гомогенати тайёрланиб, 1200 айл/мин. да 10 минут центрифуга қилинади. Чўкмани ташлаб юборилади, суюқлик қисмини 12000 айл/мин. да 10 минут центрифуга қилинади. Олинган чўкма икки марта 0,25 М сахароза эритмаси билан ювилади, шундан кейин тритон X-100 эритмаси билан митохондриянинг мембранаси бузилади, бунинг учун 1 мл тритон X-100 эритмасидан ва 1 мл митохондрия фракциясидан олиниб гомогенизация қилинади, сўнра 20 минут музга қўйилади. Митохондрия суспензиясини 30 минут 12000 айл/мин. центрифуга қилинади. Чўкма ташлаб юборилади, суюқлик билан глутаматдегидрогеназанинг активлиги аниқланади.

Фермент активлигини аниқлаш учун қўйидагича инкубацион аралашма тайёрланади (битта намунага мл ҳисобида):

0,25 М сахароза, трис	HCl буфер	0,6
ЭДТА		0,3
Сув		1,7
НАДФ		0,1

Спектрофотометр кюветасига 2,7 мл инкубацион аралашма ва 0,1 мл митохондриянинг экстрактидан солинади. Реакция инкубацион аралашмага 0,2 мл 0,75 М глутамин кислотасини қўшиш билан бошланади. Намунанинг оптик зичлиги ҳар 15 секундда 1,5-2 минут вақт давомида ўлчанади.

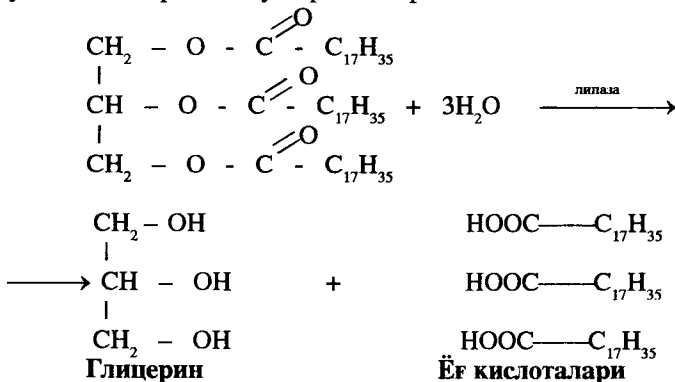
Глутамат дегидрогеназа активлиги (мк мол. НАДФ /мин./ 1 мг оксил) қуйидаги формула билан ҳисобланади.

$$X = \frac{\Delta E \cdot V 1000}{6,22 a}$$

Бунда $\Delta E-1$ минут давомидagi эритманинг оптик зичлигининг ўзгариши; V – намунанинг умумий ҳажми (3 мл); a – намунадаги оксилнинг микдори, мг; 6,22 – қайтарилган пиридиннуклеотидлар формасининг 340 нм тўлқин узунлигидаги микромолярли экстинция коэффициентини.

Липаза активлигига сафрони таъсири

Сутга озроқ липаза қўшилади ва фенолфталеин иштирокида ара-
лашма пушти ранг ҳосил қилгунча ишқор қўшилади, кейин 37° ли сув
ҳаммомига қўйилганда суюқлик аста-секин рангсизланади. Сафро
қўшилганда рангсизланиш тезлашади. Бу шундан далолат берадики, липаза
ўт кислоталарининг тузлари таъсирида активлашади.



Керакли асбоблар: пробиркалари билан штатив; сўв ҳаммоми.

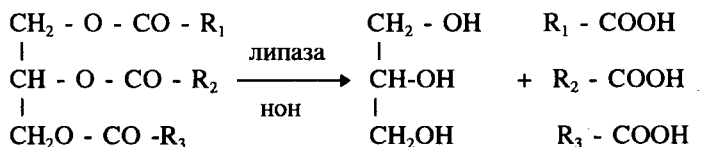
Реактивлар. 1. Қайнатишган сут сувда суюлтирилади. 2. Натрий карбонатнинг 10 % ли эритмаси. 3. Фенолфталеиннинг 0,5 % ли эритмаси спиртда тайёрланади. 4. Сафро. 5. Липаза экстракти – яъни ошқозон ости безининг экстракти – ошқозон ости беzi ёғларидан тозаланади, майда қилиб қирқилади ва 5 марта кўп сув қўшиб ҳовончада эзилади. Ҳосил бўлган экстракт дока оркали филтрланади.

Ишнинг бориши. Иккита пробиркага 1 мл сут солинади ва 1-2 томчидан фенолфталеин эритмасидан қўшилади. Ҳар бир пробиркага то пушти ранг ҳосил бўлгунча натрий карбонат эритмасидан томчилаб қўшилади ва айни пайтда 2-4 томчи липаза экстрактидан солинади. Биринчи пробиркага бундан ташқари 1-2 томчи сафро қўшилади. Пробиркалардаги суюқликлар чайқатилиб, 37°С сув ҳаммомига қўйилади, фенолфталеинни сафроли ва сафросиз тажрибалар рангсизланиш вақти кузатилади.

Липаза ферментининг активлигини аниқлаш

Липаза ферменти ўсимликларда кенг тарқалган бўлиб, айниқса улар мойли ўсимликлар уруғида кўп бўлади. Унаётган чигит таркибида ҳам липаза ферментининг активлиги энг юқори бўлади.

Липаза ферменти мойларни ёғ кислоталари ва глицерингача парчалайди.



Мойлар

Глицерин

Ёғ кислоталари

Липаза ферменти таъсирида ёғ кислоталарининг миқдори ортади, шунинг учун фермент активлиги реакция муҳитининг нордонлигини титрлаш усули билан топилади.

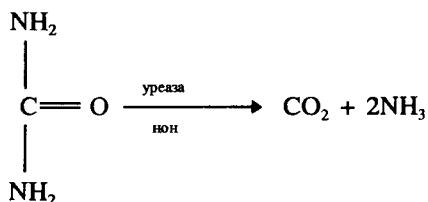
Ишнинг бориши. Липаза ферментини олиш учун 2-3 кунлик бўртган канақунжут мағзидан 2 грамм олиб, чинни ҳовончада бир хил масса ҳосил бўлгунча майдаланган шиша ёрдамида эзилади ва 5 мл 0,2 м ацетат буфер (рН - 4,8) қўшиб ҳажми 100 мл бўлган колбага қўйилади. Колбага 2 мл тоза пахта мойи қўшиб 2 соатга 40°C инкубацияга қўйилади. Бу вақт давомида колбани 3-4 марта яхшилаб чайқатиб турилади. Вақт тугагач, колбага 20 мл 96% ли этил спирти ва 20 мл эфир солинади. 2-3 томчи фенолфталеин қўшиб, 0,1 н калий гидроксиди ёрдамида титрланади.

Контрол ҳам худди тажрибага ўхшаш тайёрланади, фақат инкубацияга қўймасдан дарҳол титрланади.

Реактивлар: 2-3 кунлик бўртган чигит мағзи, ацетат буфер, 0,2М эритмаси (рН-4,8) пахта мойи, этил спиртининг 96% ли эритмаси, эфир, фенолфталеин, калий гидроксидининг 0,1 н эритмаси.

Уреазани активлигини аниқлаш

Уреаза ферменти мочевинани карбонат ангидрид ва аммиакгача парчалайди.



Мочевина

Ишнинг бориши. Соя ёки тарвуз уруғининг мағзидан 5 грамм олиб, чинни ҳовончада яхшилаб ун ҳосил бўлгунча эзилади. Сўнгра 2 та пробирка олиб, ҳар бирига 1 г соя ёки тарвуз уруғининг унидан солинади. 1-пробиркага 1 мл сув, 2-пробиркага 1 мл мочевиначининг 1% ли эритмаси қўйилади. Пробиркалар 40°С да 15 минут давомидида инкубацияга қўйилади.

Кейин ҳар иккала пробиркага 1-2 томчидан фенолфталеин томизилади. 2-пробиркадаги муҳит фермент таъсирида ҳосил бўлган аммиак ҳисобига ишқорий муҳит бўлиб, пушти ранга эга бўлади.

Реактивлар: соя ва тарвуз уруғлари, мочевиначининг 1% ли эритмаси, фенолфталеин.

Пепсин ферменти таъсирида оксилларнинг парчаланиши

Пепсин - оксилларнинг меъдада ўзгаришига сабаб бўладиган энг муҳим протеолитик фермент бўлиб, меъда ширасида учрайди. Меъда шиллиқ пардасининг ҳужайралари пепсиноген ишлаб чиқаради, пепсиноген меъда ширасидаги хлорид кислота таъсирида актив протеолитик фермент – пепсинга айланади. Пепсин учун оптимал водород ионлари концентрацияси $\text{pH} - 1,5-2,5$ га тенг бўлади. Кислотали муҳитда ($\text{pH} - 1,5-2,5$) у оксилларни гидролитик пептонларгача парчалайди. Пепсин оксил молекуласининг ичида, ўрталарида пептид боғларини узади. Пепсин, асосан ароматик аминокислоталарнинг аминокорухлари ҳосил қилган боғларни ва Ала-Ала, Ала-Сер каби пепид боғларни узади.

Меъда шиллиқ пардасининг ҳужайралари пепсиноген ишлаб чиқаради, пепсиногеннинг физиологик шароитларда пепсинга айланиши автокаталик жараёндир. Пепсиногеннинг молекула оғирлиги 42500 га, пепсинники эса 34500 га тенг. Активланиш жараёнида пепсиногендан 6 та полипептид ажралиб чиқади.

Шундай қилиб, хлорид кислота пепсинни таъсир қилиши учун оптимал шароит яратади. Ундан ташқари бу кислота таъсирида оксиллар шишиб, денатурацияга учрайди, натижада уларнинг ҳазм бўлиши осонлашади. Оксилларнинг пепсин таъсирида ҳазм бўлиши фибрин мисолида кўрилади, яъни пепсин таъсирида сувда эрийдиган пептон ҳосил бўлади.

Керакли асбоблар: пробиркалари билан штатив; сув ҳаммоми; 5 мл ли пипетка.

Реактивлар. 1.Фибрин. 2. 0,1% ли пепсиннинг 0,2% ли хлорид кислотадаги эритмаси. 3. 0,25 % ли хлорид кислотаси эритмаси. 4. 10% ли натрий карбонат эритмаси. 5. Мис сульфатнинг 1% ли эритмаси. 6. 10% ли натрий ишқорининг эритмаси.

Ишнинг бориши. Тўртта пробирка олиб, биринчисига 4 мл хлорид кислота эритмасидан, иккинчисига 4 мл пепсинни хлорид кислотадаги эритмасидан, учинчи пробиркага сода билан нейтралланган пепсиннинг хлорид кислотасидаги эритмасидан 4 мл, тўртинчи пробиркага эса

пепсиннинг хлорид кислотдаги эритмасини қайнатилган ва совутилган эритмасидан 4 мл солинади.

Ҳар бир пробиркага фибриннинг кичик-кичик бўлақларидан солинади, сўнгра ҳамма пробиркалар бир вақтда 37-40°C ли сув ҳаммомига қўйилади. 30 минутдан кейин реакциялар натижаси текширилади. биринчи пробиркада фибрин хлорид кислота таъсирида шишиб кетганлиги кузатилади, иккинчи пробиркада пепсиннинг хлорид кислотасидаги эритмаси таъсирида фибрин инкубациядан кейин эриб кетганлигини кўриш мумкин. Учинчи пробиркадаги фибрин ўзгаришсиз қолади, чунки пепсин нейтрал муҳитда актив ҳолатда бўлмайди. Тўртинчи пробиркадаги фибрин хлорид кислота таъсирида бўкиб қолади, чунки қайнатилганда пепсин ўз биологик ҳолатини йўқотади.

Ҳамма пробиркалардаги суюқликлар филтрланади, ҳар бир филтрат билан биурет реакцияси бажарилади ва олинган маълумотлардан ҳулоса ёзилади.

Тирозиназа ферментининг активлигини аниқлаш

Тирозиназа ферменти оксидланиш-қайтарилиш реакцияларини анализ қилувчи ферментларга мансуб бўлиб, ўсимликлар таркибида кенг тарқалган. Улар ўсимлик маҳсулотларида рангли моддалар меланинларни ҳосил бўлишида муҳим аҳаиятга эга.

Реактивлар: картошка, тирозиннинг 0,1%ли эритмаси (0,1 г тирозин 100 мл 0,01 н Na_2CO_3 эритмасида кучсиз қиздирилиб эритилади).

Ишининг бориши. Картошка қирғич ёрдамида майдаланиб 2-3 қават дока орқали сиқиб шираси олинади. Иккита пробиркага 1 мл дан картошка шираси солинади. 1-пробиркага 2-3 томчи сув, 2-пробиркага 2-3 томчи тирозиннинг 0,5% ли эритмаси қўйилади. Пробиркадаги суюқлик яхшилаб аралаштирилиб, 60 минут давомида 40°C инкубацияга қўйилади. Вақт-вақти билан 3-4 марта пробиркалар яхшилаб аралаштирилиб турилади. Вақт ўтгач тирозин қўшилган пробиркада қора ранг ҳосил бўлади. Бу ранг тирозиназа ферменти таъсирида тирозиндан ҳосил бўлган меланинга ҳосидир.

Фосфотаза ферментининг активлигини аниқлаш

Фосфотаза ферменти ўсимлик дунёсида кенг тарқалган бўлиб, моддалар алмашинуви жараёнида катта аҳамиятга эга. Бу фермент гидролазалар синфига мансуб бўлиб, фосфор кислотасининг мураккаб эфирларини гидролиз қилишда иштрок этади.

Ўзанинг турли қисмларида учрайдиган фосфотаза ферментлари ҳар хил муҳитда кўрсатадиган таъсирига қараб, «ишқорий фосфотазалар» (рН оптимуми 8 дан юқори) ва «Нордон фосфотазалар»га (рН оптимуми 6 дан паст) бўлинади.

Реактивлар: трис-буфер эритмаси (иловага қаранг), натрий глицерофосфатнинг 0,05% ли эритмаси, трихлорацетат кислотанинг 10% ли эритмаси.

Ишинг бориши. Ундирилган (3-5 кунлик) чигит ўсимталаридан 1-3 грамм тортиб олинади ва чинни ҳовончада 1-5 мл, трис - буфер ёрдамида (рН-5,5 ёки рН-9,0) бир хил масса ҳосил бўлгунча эзилади. Ҳосил бўлган гомогенат минутига 1500-3000 тезликда 10 минут давомида центрифугаланади. Сўнгра центрифугатни ҳажми 10 мл га етказилади. Бу эритма фосфотаза ферментининг манбаи ҳисобланади.

2 та пробирка олиб, ҳар бирига 1 мл буфер эритмасидан ва натрий глицерофосфатнинг 0,05% ли эритмасидан 1 мл дан солинади. Биринчи пробиркага фермент эритмасидан 2 мл қўшиб 37 °С га сув ҳаммомига 30 минут давомида қўйилади. Иккинчи пробиркага эса трихлорацетат кислотасининг 10% ли эритмасидан 2 мл солинади ва унинг устига 2 мл фермент эритмасидан қўйилади. Иккинчи пробирка ҳам сув ҳаммомига қўйилади. Вақт тугагач биринчи пробиркага ҳам трихлорацетат кислота-сининг 10% ли эритмасидан 2 мл қўйилади. Сўнгра ҳар иккала пробирка 10 минут давомида минутига 3000 тезликда центрифугаланади. Центрифугатда фосфор микдори колориметрик усулда аниқланади. Тажриба ва контрол пробиркадаги фосфор микдорининг фарқи ферментнинг активлигини кўрсатувчи белги ҳисобланади.

VIII БОБ. ВИТАМИНЛАР

Витами́нлар - кичик молекуляр оғирлигидаги моддалар бўлиб, органик бирикмаларнинг турли синфларига киради. Витаминлар - ҳайвонлар, микроорганизмлар, ўсимликларнинг энг муҳим физиологик ва биохимиявий жараёнларида иштирок этади. Уларнинг кўпчилиги икки компонентли ферментларнинг простетик гуруҳлари - коферментлар таркибига киради.

Организмда қандайдир витаминларнинг бутунлай бўлмаслиги авитаминозга, яъни бутун организмнинг маълум витаминнинг йўқлигига характерли белгилар билан касаллигига сабаб бўлади. Кўпинча витаминларнинг қисман етишмовчилиги ҳоллари - гиповитаминозлар учрайди, улар бирламчи ва иккиламчи бўлиши мумкин. Витаминлар ҳаддан ташқари кўп истеъмол қилинганда организмнинг интоксикацияси рўй беради, бу **гипервитаминозлар** деб аталади.

Ҳозирги вақтда айрим витаминлар ва уларнинг хиллари ўттизга яқин. Витаминлар овқатнинг турли компонентларига боғлиқ бўлишига қараб, фақат эрувчанлиги асосида, иккита катта гуруҳга; сувда эрийдиган ва ёғда эрийдиган витаминларга бўлинади.

Ёғда эрийдиган витаминлар гуруҳига А, Д, В ва К витаминлар киради.

Сувда эрийдиган витаминлар гуруҳига В - витаминлар гуруҳи: В₁-тиамин, В₂-рибофлавин, РР -никотинамид, В₆-пиридоксин, Н - биотин, пантотинат ва парааминобензоат кислота, холин, инозит, фолат кислота, В₁₂-цианкобаламин, В₁₅-пангамат кислотаси; С витамин (аскорбат кислота); Р витаминлар киради.

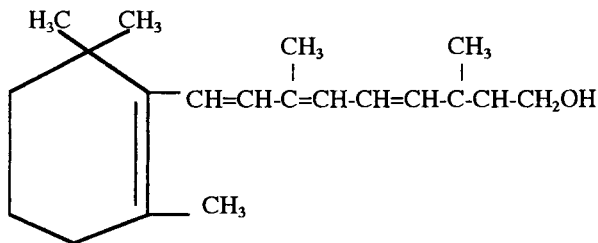
Ёғда эрийдиган витаминлар. Бу гуруҳ витаминларга А, Д, В, К гуруҳидаги витаминлар ва бошқалар киради. Витаминлар, ҳар бир гуруҳига химиявий тузилиши яқин бўлган ўхшаш биологик таъсир кўрсатувчи қатор бирикмалар киради. Масалан, А витамин гуруҳида А₁, А₂ витаминлар ва бошқалар; Е витамин гуруҳида 4 та витамин бўлади: Д витамин гуруҳида уларнинг сони 10 га яқин.

А гуруҳ витаминлари

А витамин ҳайвон тўқималарида, айниқса, жигарда кўп миқдорда бўлади. Ўсимликларда А витаминнинг ўзи мутлақо бўлмайди, лекин уларнинг таркибида ҳайвон организмда А витаминига айланадиган, унинг провитамини – ёғда эрийдиган сарик рангли бирикма-каротинлар учрайди. Каротинлар тўйинмаган рангли углеводлар -каротиноидлар оиласига киради. Улар ҳайвонлар ичагининг шилимшиқ пардасида парчланиб, А витаминига айланади, сўнгра жигарда тўпланади.

Овқатда А витамин бўлмаганда авитаминозлар учун характерли белгиларни, яъни ўсишининг тўхташи, кўзнинг пардаси қуриб қолиши, ксерофтальмия ва сўнгра унинг юмшаб, некротик емирилиши - кератоммаляция пайдо бўлганлигини кузатиш мумкин. А витамин биологик мембра-

наларнинг структура компонентлари ҳисобланади, жигарда оксил биосинтезини стимуляция қилади, мукополисахаридларнинг синтезида иштирок этади, суяк тўқималарининг тараққиётида ва ёруғликни сезиш жараёнида иштирок этади.



А витамин (ретинол)

Керакли асбоблар: пробиркалари билан штатив; пипеткалар.

Реактивлар. 1. Балик ёғи. 2. Хлороформ. 3. SbCl_3 тўйинган (33% ли) эритмаси. 4. Концентрланган сульфат кислота.

Ишнинг бориши. 1. Сурма (III) хлориди билан реакцияси. Пробиркага бир неча томчи балик ёғидан солиниб, 2 мл хлороформда эритилади ва 2 мл тўйинган сурма (III) - хлоридининг эритмасидан қўшилади. Реакция натижасида ҳосил бўлган маҳсулот кўк рангга эга бўлади. 2. Сульфат кислотаси билан реакцияси. Пробиркага 3-4 томчи балик ёғидан солинади, 20-25 томчи хлороформда эритилади ва 1 томчи концентрланган сульфат кислота қўшиб чайқатилади. Натижада кўк ва бинафша ранг ҳосил бўлади.

Умумий каротиноидларни аниқлаш

Умумий каротиноидлар Рачевский методи билан аниқланади.

Керакли асбоблар: пробиркалари билан штатив, пипеткалар; чинни идиш; 40°C сув ҳаммоми, бюретка.

Реактивлар. 1. Қон зардоби ёки ўсимлик материали. 2. Спирт. 3. Петролейин эфири.

Ишнинг бориши. Бўлувчи воронкага 0,1 мл қон зардоби ва 2 мл спирт солинади ва аралаштирилади, сўнгра 2 мл петролейин эфиридан қўшиб, чайқатилади ва 2 мл сувни томчилаб икки қаватга ажратиш ҳосил бўлгунча томизилади. Сўнгра сувли қават тўлиқ ажратиб ташланади ва петролейин-эфирли қават ҳажми аниқ 2 мл га олиб борилади. Кейин ана шу эритма микробюреткага солинади-да 40°C сув ҳаммомига қўйилган чинни идишга томчилаб томизилади. Томчилар идишда бўялган ҳалқа ҳосил бўлгунча қўшилади. Бўялган ҳалқа ҳосил бўлганда чўкмадаги каротинларнинг миқдори 0,05 мкг га тенг бўлади. Бюреткадаги петролейин-эфиридан қанча ҳажм кетганлиги ҳам белгилаб олинади. Агарда ҳалқа

ҳосил бўлиши учун 0,5 мл эфирли эритма сарфланган бўлса, унда 100 мл кон зардобдаги умумий каротинларнинг сони қуйидагича бўлади:

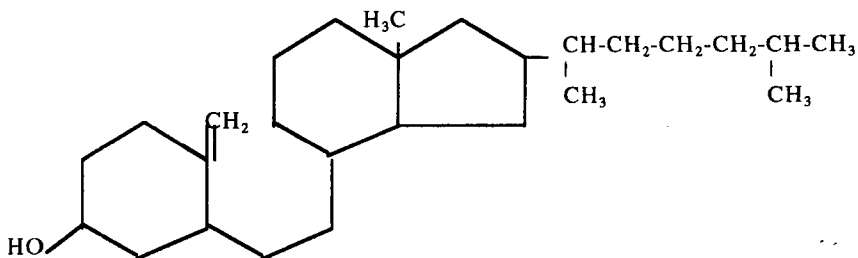
$$\frac{0,05 \cdot 2 \cdot 100}{0,5 \cdot 1,0} = 200 \text{ мкг (0,2 мкг\%)}$$

Д гуруҳ витаминлари

Д гуруҳ витаминлари (Кальцифероллар) химиявий тузилишига кўра, стероидларга ўхшаш бирикмалар бўлиб, табиатда кўп тарқалган, биологик фаълиги энг юқори бўлган витаминлар (D_2 ва D_3)дир.

Эргастерол ва холестерол D_2 ва D_3 витаминларнинг провитамини ҳисобланади. Ҳайвон организмдаги витаминлар ультрабинафша нурлари таъсирида стероллардан синтезланади. Организмда Д витамини етишмаса рахит касаллиги пайдо бўлади. Чунки суяк тўқималарида фосфор ва кальций алмашинувини бузади. Бунда ошқозон-ичак йўлларида кальций ва фосфорнинг сурилиши бузилади. Натижада суяқда аноорганик тузлар етишмаганлигидан у юмшайди ва ўз шаклини йўқотади.

Эргостерин нурланганда бир қатор стерин изомери ҳосил бўлади. Улардан бири кальциферол рахитга қарши кучли таъсир этади.



D_3 витамин (Холекальциферол)

Д гуруҳ витаминларининг рангли реакциялари

Реактивлар. 1.Анилин. 2.Концентрланган хлорид кислотаси. 3. $SbCl_3$ нинг 21-23% ли хлороформдаги эритмаси. 4.Сирка ангидриди. 5.Витаминлаштирилган балиқ мойининг 10% ли хлороформдаги эритмаси. 6.Бромнинг хлороформдаги эритмаси.

Ишнинг бориши. 1 мл балиқ мойига 4-5 мл анилин билан 0,5 мл концентрланган хлорид кислотаси қўшилади. Эмульсия сариқ рангга ўтади, киздирилади ва у қизил рангга қиради.

Сурма (III)- хлорид билан реакцияси. Қуруқ пробиркага 3-6 мл балиқ ёғининг хлороформдаги эритмасидан солиб, 8-10 томчи сирка

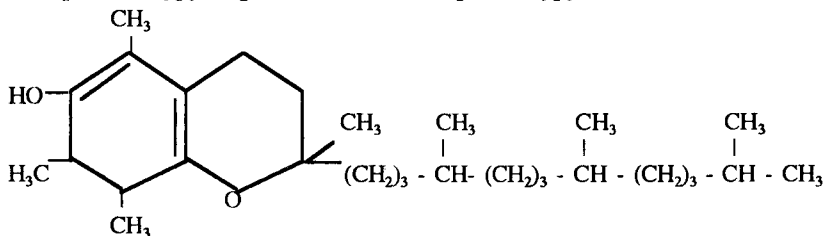
ангидриди ва шунча микдорда $SbCl_3$ нинг хлороформдаги эритмасидан қўшилади. Суюқлик сариқ ёки тўқ сариқ рангли ҳосил қилади.

Бром билан реакцияси. Пробиркага 8-10 томчи балиқ ёғи солинган ҳолда 4-8 томчи бромнинг хлороформдаги эритмасидан қўшилади. Бир қанча вақтдан сўнг яхши фарқланувчи яшил ёки кўк-яшил ранг ҳосил бўлади.

Е витамини (Токофероль)

Табиатда токофероллар (Е витамини) кўп бўлиб, биологик аҳамиятга эга бўлганлари α , γ ва - токофероллардир.

Уларнинг ҳаммаси хроман тузилишининг бензол халқасида метил ва гидроксил гуруҳлари ҳамда ён шох-фитол гуруҳини сақлайди.



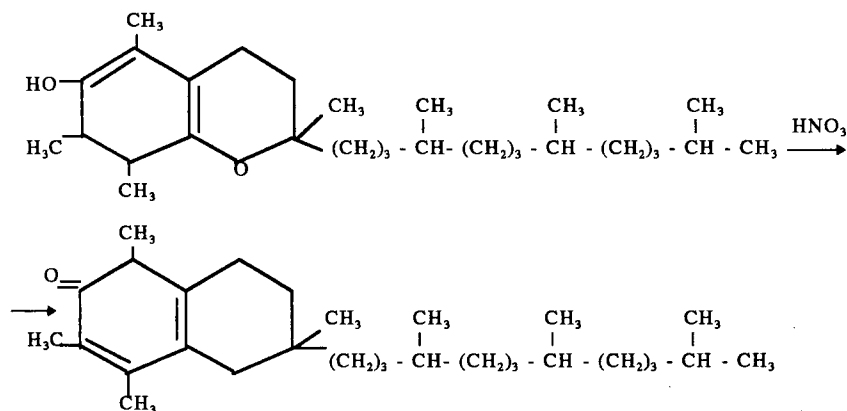
α -Токоферол

Е витамини ўсимликлар таркибида, айниқса маккажўхори, гўза, бугдой, наматақда учраб, уларнинг яшил қисмларида ҳамда уруғ қуртагида кўп бўлади. Е витамини кўпайиш витамини деб аталади. Е витамини сувда эримайди. У иссиққа айниқса, чидамли, шунингдек, кислоталар таъсирига ҳам чидамли, осон аниқланади ва ультрабинафша нурлар таъсирида бузилади. Бу ўз навбатида эркак ва урғочи ҳайвонларнинг жинсий аъзоларида турли патологик ўзгаришларга сабаб бўлади. Ҳайвонлар организмида Е витамини етишмаса, оқсил, ёғ ва углеводлар алмашинуви бузилади. Е авитаминозининг характерли белгиларидан бири тарғил чизқли мускулларда кузатиладиган дистрофия ҳодисасидир. Бунда мускулларнинг чизқлилари йўқолади, толалари ингичкалашади, емирилади ва нобуд бўлади, натижада улардаги моддалар алмашинувида ҳам маълум бузилишлар рўй беради. Е-витамини кўпгина бирикмаларни оксидланиб кетишдан сақлайди ва антиоксидантлар сифатида ишлатилади.

Е витаминининг рангли реакциялари

1. Нитрат кислотаси билан реакцияси.

Методнинг принципи. Е витамини концентранган нитрат кислотаси билан ўзаро таъсир этиб, яъни α -токоферолдан 0-токоферилхинон ҳосил бўлади, натижада бу бирикма қизил рангли беради.



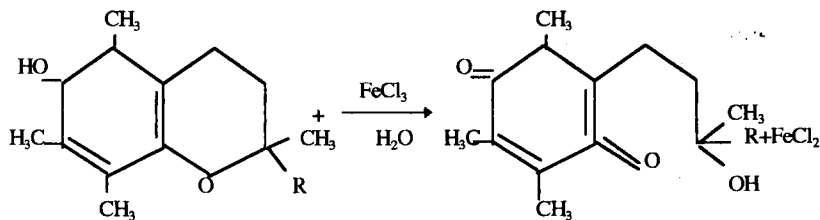
О-токоферилхинон

Керакли асбоблар: пробиркалари билан штатив; пипеткалар; сув ҳаммоми.

Реактивлар. 1. Концентрланган нитрат кислота. 2. Е витаминнинг ёғдаги эритмаси. 3. Дистилланган сув.

Ишнинг бориши. Иккита пробиркага 2-3 томчи Е витаминининг ёғдаги эритмасидан солинади. Биринчи пробиркага 1-2 мл дистилланган сув, иккинчи пробиркага шунча микдорда концентрланган нитрат кислотасидан қўшилади. Иккала пробирка ҳам қайнаб турган сув ҳаммомида 10 минут қиздирилади. Нитрат кислотаси солинган пробиркадаги витаминнинг ёғли қавати қизил ёки сариқ-қизил рангга бўялади.

2. Темир хлорид билан реакцияси. Токофероллар темир хлорид билан оксидланади, яъни темир -III - хлориди темир -II -хлоридгача қайтарилади, темирни II валентли иони билан ортофенантропин комплекс $\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3^{2+}$ ионни ҳосил қилади, шунинг натижасида эритма қизил рангга бўялади. Токофероллар темир хлорид билан оксидланганда пиран ҳалқаси узилиб γ -оксиалкилхинон ҳосил бўлади.



α - токоферол

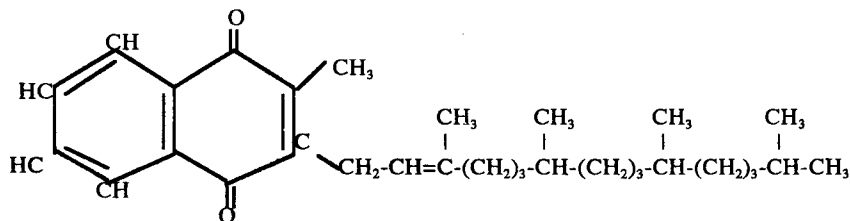
γ - оксиалкилхинон

Реактивлар. 1. Е витаминнинг ёғдаги эритмаси. 2. 0,2% ли темир хлориднинг спиртдаги эритмаси. 3. 05% ли ортофенантролиннинг спиртдаги эритмаси.

Ишнинг бориши. Пробиркага 1-2 мл Е витаминнинг ёгдаги эритмасидан солиб, 1 мл ортофенантролин эритмасидан ва томчилаб темир хлориднинг эритмасидан қизил ранг ҳосил бўлгунча қўшилади.

К ВИТАМИНАМ

Организмда К витамини етишмаса, тери остига ва мускуллар орасига қон қуюлади (геморрагиялар) ва қоннинг ивиш тезлиги пасаяди. К витаминнинг етишмаслиги асосан, қонда протромбин миқдорининг камайиши билан характерланади. К авитаминозда қоннинг ивишида иштирок этадиган яна бир нечта оксилнинг жигарда синтези тўхтайтиди. Агарда К авитаминозли ҳайвонларга витамин берилса қон плазмасида протромбин миқдори ортади ва геморрагик ҳодисалар йўқолади. К витаминлар ҳайвон организмда синтезланмайди. Микроорганизмлар ва ўсимликларда синтезланади. Улар айниқса, беда, исмалоқ, қарам баргларида кўп бўлади.



K₄ витамин (2-метил-3-фитил-1,4-нафтахинон)

К гуруҳга кирадиган витаминлар 2 метил-1,4 нефтохинонлар ҳосиласидир.

К витаминнинг сифат реакциялари

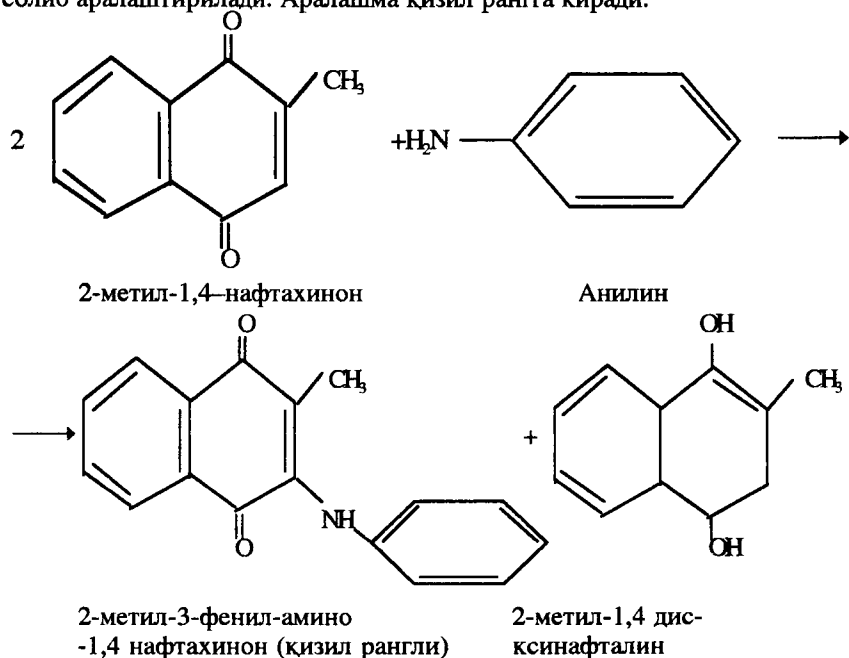
Керакли асбоблар: пробиркалар билан штатив; пипеткалар.

Реактивлар. 1. 0,1% ли викасолнинг спиртдаги эритмаси. 2. К витаминининг синтетик аналоглари. 3. Цистеиннинг 0,25 % ли эритмаси. 4. 10 % ли натрий ишқорининг эритмаси. 5.. Диэтилмелон эфирининг 1% ли эритмси. 6. Калий гидроксидининг 1%ли эритмаси. 7. Анилин.

1) Цистеин билан реакцияси. Пробиркага 1 мл 0,1% ли викасолнинг спиртдаги эритмаси солинади. Сўнгра 2 томчи 0,25% ли цистеин эритмасидан ва 2 томчи 10% ли натрий гидроксидининг аралашмасидан қўшилади. Натижада сариқ ранг ҳосил бўлади.

2) Диэтилмелон эфири билан реакция. Пробиркага 2 мл 0,1% ли викасолнинг спиртдаги эритмасидан солинади ва 0,5 мл 1% ли диэтилмелон эфиридан ва 0,1 мл 1% ли калий гидроксидидан аралаштирилади. Реакция натижасида бинафша-қизил ранг ҳосил бўлади.

3) Анилин билан реакция. Пробиркага 2 мл 0,2% ли 2-метил 1,4-нафтахиноннинг спиртдаги эритмасидан ва 1 мл анилин эритмасидан солиб аралаштирилади. Аралашма қизил рангга киради.



Сувда эрийдиган витаминлар

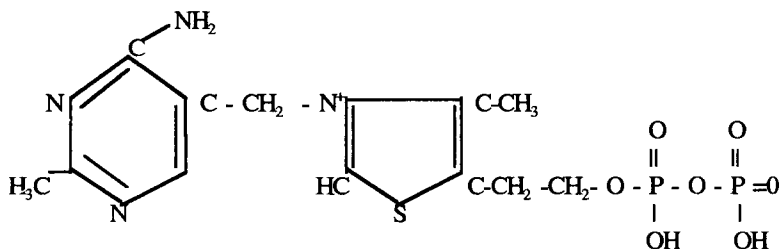
Сувда эрийдиган витаминлар гуруҳига В витаминлар комплекси, С ва Р витаминлари киради. Бу бирикмаларнинг таркиби ва хоссалари ҳар хил бўлиб, уларнинг умумий биологик роли ўхшашдир, улар моддалар алмашинуви ферментлари системаларида кофермент вазифасини бажаради.

В₁ витамини

Бу витамин (Тиамин) таркибида олтингугурт (грекча тιο) ва аминогуруҳни сақлайди, шунинг учун тиамин деб аталади. В₁ витамини авитаминозининг энг характерли ва ўзига хос белгилари: полиневрит, юрак фаолиятининг бузилиши, сув алмашинуви бузилиши, меъда-ичак йўлининг секретор функциясининг бузилишидир.

В₁ витамини ҳайвон тўқималарида асосан эркин ҳолда бўлмай, балки тиамин пирофосфат кўринишида учрайди. Ичакдан сўрилиб ўтган эркин витамин тўқималарда фосфорланиб, тиаминпирофосфат шаклини ҳосил қилиб, пироузум кислотанинг декарбоксилланишини катализ

қилувчи карбоксилаза ферментининг коферменти-кокарбоксилазани ташкил қилади.



Тиаминпирофосфат (кокарбоксилаза)

B_1 витамини ўсимликларда кенг тарқалган (тозаланмаган гуруч, нўхат уни ва бошқалар). B_1 витамин ачитқиларда жуда кўп бўлиб, буларда тиамин пирофосфат эфир шаклида учрайди.

Хайвонлар организмида B_1 витамини жигарда, буйракда, юрак мускули ва мияда ҳаммадан кўп миқдорда учрайди.

B_1 витаминнинг сифат реакцияси. Тиамин диазобензол-сульфокислотасининг таъсирида бирикма ҳосил қилиб, бу бирикма пушти ёки сариқ-пушти рангга эга бўлади.

Керакли асбоблар: пробиркалари билан штатив; пипеткалар.

Реактивлар. 1. Сут. 2. B_1 витаминнинг 0,001% ли сувдаги эритмаси.

3. Натрий гидроксидининг 5% ли эритмаси. 4. А-эритма (100 мл колбада 0,9 г сульфокислотаси 9 мл концентранган хлорид кислотада эритилади ва колбанинг белгисигача сув солинади. Эритма қоронғи идишда сақланади. 5. Б - эритмаси (натрий нитратнинг 5% ли эритмаси). 6. Диазореактив (бу реактив тажрибадан олдин тайёрланади), 50 мл ҳажмдаги колбани музли ҳаммомга ўрнатилади, 1,5 мл А - эритмасидан 7,5 мл ҳажмда Б-эритмасидан томчилаб солинади ва 15 минутдан кейин ишлатиш мумкин.

Ишнинг бориши. Пробиркага 2 мл натрий гидроксидидан ва 3 мл диазореактив эритмасидан солинади. Ҳосил бўлган аралашмага 24 мл сут қўшилади. Натижада пробиркада сариқ-пушти ранг ҳосил бўлади.

B_2 витамини

B_2 витамин (рибофлавин) -организмда оксидланиш-қайтарилиш жараёнларида иштирок этадиган ферментларнинг актив гуруҳлари таркибига кириб, субстратлардан водород атомининг цитохром системага ёки молекуляр кислородга кўчирилишини таъминлайди. Бу ферментлар органик кислоталар, аминокислоталар ва бошқа бирикмаларнинг оксидланиш реакцияларини катализилашда иштирок этади.

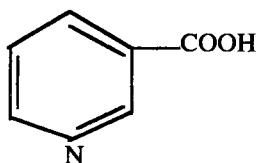
B_2 витаминнинг асосини диметилизоаллоксазин ташкил этиб, риботал спиртнинг қолдиғи билан боғланган, шунинг учун рибофлавин ёки 6,7 - диметил - 9 (1-d- рибитил) - изоаллоксазин деб аташ мумкин.

Реактивлар. 1.Рибофлавиннинг 0,015% ли эритмаси. 2.Кумуш нитратнинг 0,1% ли эритмаси.

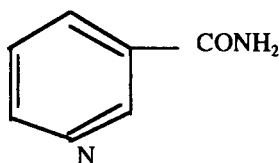
Ишнинг бориши. Пробиркага 1 мл рибофлавиннинг эритмасидан солинади ва 0,5 мл кумуш нитрат эритмасидан қўшилади. Натижада пушти ёки қизил ранг ҳосил бўлади.

B_3 витамини

Никотин кислота ёки унинг амиди антaпеллагрик витаминидир. Никотин кислота сув ва спиртда яхши эрийдиган кристаллик оқ моддaдир.



Никотин кислота



Никотин кислота амиди

Организмда B_3 витамини (pp витамини, никотинимид) етишмаса дерматитлар, меъда-ичак фаолиятининг бузилишига ва оғиз ҳамда тил шиллиқ пардалари яллиғланишига, нерв фаолиятини издан чиқишига олиб келади. Бу витамин ачиткиларда ва буғдой кeпагида, мол ва чўчқаларнинг жигарида анча кўп бўлади. Ўсимликлар ва баъзи микроблар, шунингдек, баъзи ҳайвонлар (каламushлар) ҳам B_3 витаминларини синтезлай олади.

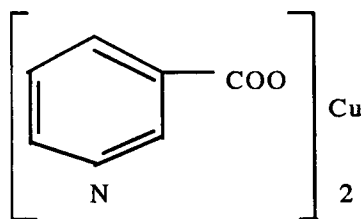
Никотин кислота, унинг амиди, моддалар алмашинувида муҳим роль ўйнайди. Тўқиманинг нафас олишини катализлайдиган бир қанча кофермент гуруҳларининг (НАД, НАДФ) таркибидa никотин кислота амиди киради.

B_3 витаминининг сифат реакциялари

Мис ацетати билан реакцияси. Никотин кислота, сирка кислотали шарoитда мис тузларининг таъсирида, кўк рангли никотин кислотанинг мисли тузини ҳосил қилади.

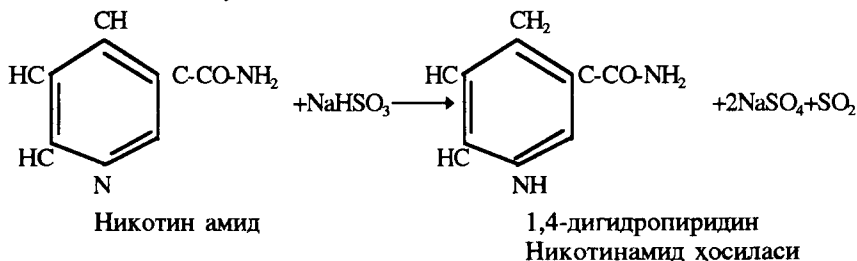
Реактивлар. 1.Никотин кислотасининг 0,75 % ли эритмаси. 2.Сирка кислотасининг 15% ли эритмаси. 3. Мис ацетатнинг 5 % ли эритмаси.

Ишнинг бориши. Пробиркага 2 мл никотин кислотасининг эритмасидан солиб, унга 1 мл 15% ли сирка кислотасининг эритмасидан қўшилади ва қайнагунча қиздирилади, шундан кейин 1,5 мл мис ацетат эритмасидан солинади. Пробиркада аввал ҳаво ранг лойка, сўнгра кўк чўкма никотин кислотасининг мисли тузи ҳосил бўлади.



Мис никотинати

Натрий гидросульфит билан реакцияси. Никотинамидга гидросульфит таъсир этганда сариқ рангли 1,4 дигидропиридин никотинамидли ҳосиласи пайдо бўлади.



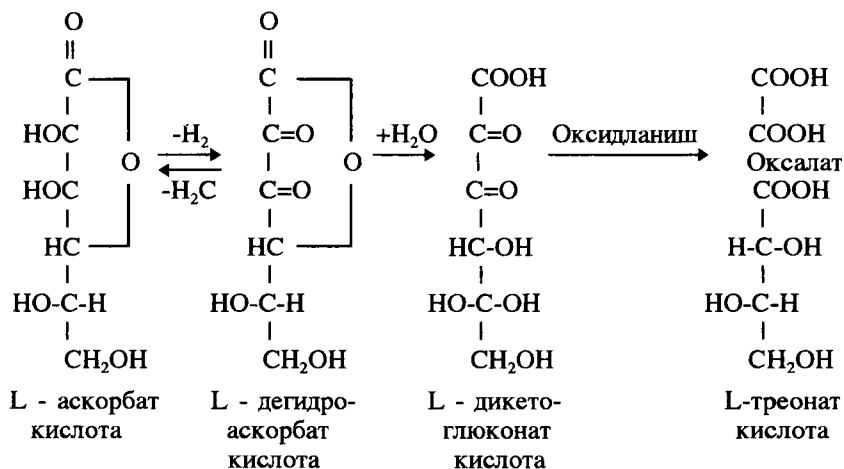
Реактивлар. 1.Никотин кислотаси ёки никотин кислотасининг амиди (кукун ҳолатда). 2.Натрий гидрокарбонатнинг 10% ли эритмаси. 3. Натрий гипосульфитнинг ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 5% ли эритмаси (ишлатиш олдидан тайёрланади).

Ишнинг бориши. Пробиркага никотин кислотаси ёки унинг амидининг кукунидан солинади ва 1-2 мл натрий гидрокарбонат эритмасидан аралаштирилади, кейин 1-2 мл натрий гипосульфит эритмасидан қўшилади. Пробиркадаги суюқлик сариқ рангда бўлади.

С витамини

С витамини L - аскорбинат кислота деб аталади. L - аскорбинат кислота сувда яхши эрийди. L - аскорбинат кислота ва унинг дегидро шакли водород атомларини, яъни электронлар билан протонларни олишга ҳам, беришга ҳам қодир бўлган оксидланиш-қайтарилиш системасини ҳосил қилади.

Аскорбинат кислотасининг дегидро шакли жуда чидамсиз бирикмалар дикетоглюконат кислотага айланиши қайтмас жараён бўлиб, оксидланиб парчаланиш билан тугалланади. С витамин оксидловчилар иштирокида нейтрал ёки ишқорий муҳитда киздирилганда жуда тез парчаланаяди.

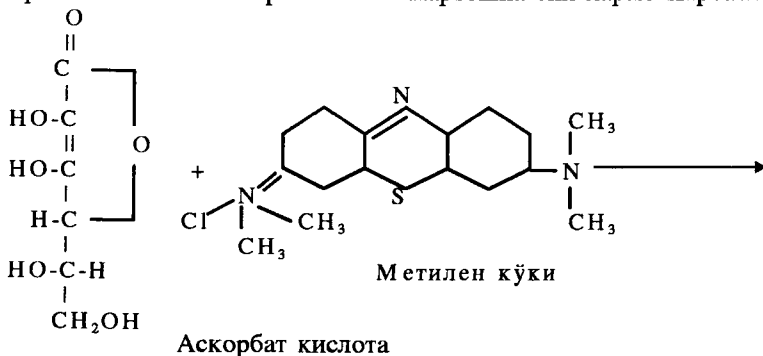


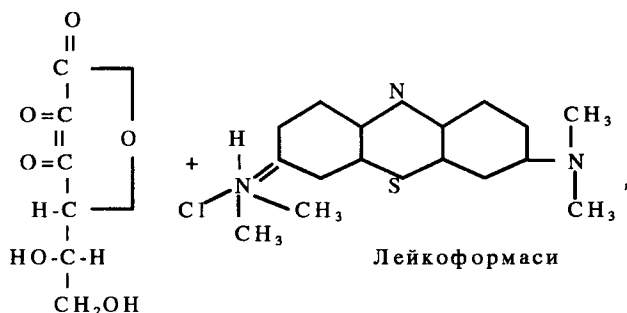
С витамин ўсимликларда ва кўпчилиқ ҳайвонлар (одам, маймун ва денгиз чўчқасидан ташқари) да синтезланади. Сут эмузувчиларнинг жигарида 25 мг % ва буйракларда 12 мг % С витамини бўлади. Ҳайвон организмда С витамини етишмаса оқсиллар алмашинувининг бузилиши, ошқозон-ичак тракти ва нафас олиш йўлларини турли касалликларга чидамсизлиги, ички органларда қон талашлар ва тишларнинг тушиб кетиши каби ҳоллари вужудга келади.

С витаминнинг сифат реакциялари

Метилен кўки билан реакцияси. Аскорбат кислотаси метилиен кўкини рангсиз бирикмагача қайтаради (лейкоформасига), ўзи оксидланиб дегидроаскорбат кислотани ҳосил қилади.

Реактивлар. 1. Метилен кўкининг 0,01% ли эритмаси. 2. Натрий карбонатнинг 5% ли эритмаси. 3. Картошка ёки қарам шарбати.



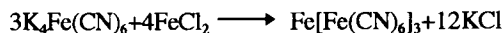
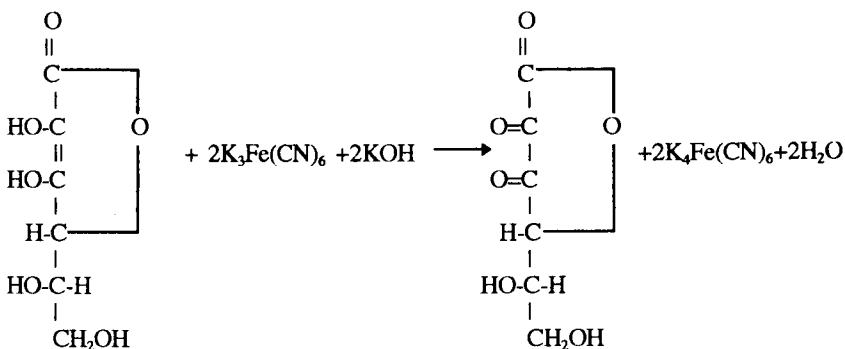


Дегидроаскорбат кислота

Ишининг бориши. Пробиркага янги тайёрланган картошка ёки қарам шарбатидан 1-2 мл солиб, 1-2 томчи метилен кўки эритмаси ҳамда 2-3 томчи натрий карбонат эритмасидан қўшиб киздирилади. Натижада кўк ранг интенсивлиги камаяди.

Калий феррицианид $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ билан реакцияси. Аскорбат кислотаси оксидланиб, калий феррицианид $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ни то калий ферроцианид $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ гача қайтаради ва уч валентли темир иони билан кислотали шароитда темир -(III)-гексоцианоферроат $\text{Fe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ ни, яъни Берлин зангориси ҳосил қилади.

Реактивлар. 1. Картошка ёки қарам шарбати. 2. Калий феррацианиднинг 5% ли эритмаси. 3. Калий ишқорининг 5% ли эритмаси. 4. Темир-(III) хлориднинг 1% ли эритмаси.



Берлин зангориси

Ишнинг бориши. Пробиркага 1 мл картошка ёки карам шарбатидан, 2 томчи калий ишқори ва шунча миқдор калий феррицианид эритмасидан солиб чайқатилади. Сўнгра 6-8 томчи 10% ли хлорид кислотаси ва 1-2 томчи темир - (III) - хлориднинг эритмасидан қўшилади. Натижада кўк ёки кўк-яшил чўкма Берлин зангорисини ҳосил қилади.

Озиқа маҳсулотларида С витаминининг миқдорини аниқлаш

С витамини - ҳайвон ва одам рационининг энг муҳим таркибий қисми ҳисобланади. Қуйида ўсимлик маҳсулотларида С витаминининг миқдори кўрсатилган (мг, %).

Укроп	135	Лимон	40
Карам	30	Янги картошка	35
Кўк пиёз	60	Сабзи	5
Қора смородина	300	Наъматак (мевасида)	3000

Озиқа маҳсулотларида аскорбат кислотасининг миқдорини аниқлаш учунг суюлтирилган кислоталарда С витамини экстракция қилинади (кислотали шароитга чидамлидир). Сўнгра 2,6-дихлорфенолиндофенолнинг эритмасидан олиб титрланади. Экстракт таркибида аскорбат кислотаси бўлса, 2,6-дихлорфенолиндофенолни қайтаради.

Экстрактдаги ҳамма аскорбат кислоталар оксидланиб бўлгандан кейин 2,6-дихлорфенолиндофенол қайтарила олмайди ва эритма қизил рангга бўялади (яъни, нейтрал шароитда 2,6-дихлорфенолиндофенол кўк рангга, кислотали шароитда эса қизил рангга эга). Титрлаш учун кетган 2,6-дихлорфенолиндофенолнинг миқдорини ва унинг нормаллигини аниқлаб, маҳсулотдаги аскорбат кислотасининг миқдори ҳисобланади.

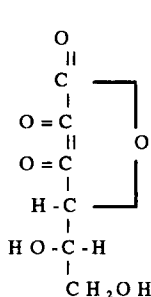
Керакли асбоблар: микробюретка; 25 ва 100 мл ли колбалар; 1 ва 10 мл ли пипеткалар; ҳовонча; тарози; воронка; фильтр қоғози.

Реактивлар. 1.Хлорид кислотасининг 25% ли эритмаси. 2. 2,6-дихлорфенолиндофенолнинг 0,001 н эритмаси. 3. Картошка, карам.

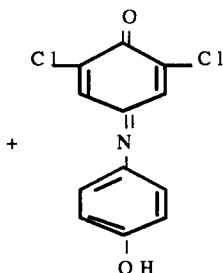
Картошка таркибида С витаминини аниқлаш. 5 г картошка ҳовончада 16 мл хлорид кислотасидан қўшиб эзилади. Ҳовончада ҳосил бўлган суяқлик колбага солинади ва филтрланади. Филтрат 2,6-дихлорфенолиндофенол эритмаси билан пушти ранг ҳосил бўлгунча титрланади. 100 г картошка таркибида С витамини миқдорини қуйидаги формула билан ҳисобланади.

$$X = \frac{0,088 \cdot a \cdot 100}{5}$$

Бу ерда: X - 100 г маҳсулотдаги С витамин миқдори, мг; 0,088 - аскорбат кислотасининг миқдори бўлиб, бу 1 мл 2,6-дихлорфенолиндофенол эритмасига тўғри келади, мг; a - титрлаш учун сарф бўлган дихлорфенолиндофенол эритмасининг ҳажми; 5 - текширувдаги маҳсулотнинг оғирлиги, г.



Аскорбат кислота



2,6 дихлориндофенил
(оксидланган формаси)

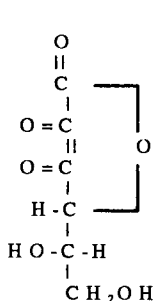
Крахмалдаги С витаминининг миқдорини аниқлаш. 2 г карам ҳовончада 10 мл сирка кислотаси билан эзилади, ҳосил бўлган экстракт филтрланади. Филтратдан 3 мл олиб колбага солинади ва 2,6-дихлорфенолиндофенол эритмаси билан пушти ранг ҳосил бўлгунча титрланади. 100 г карам таркибидаги С витаминнинг миқдори (X) қуйидаги формула билан аниқланади:

$$X = \frac{0,088 \cdot a \cdot 10 \cdot 100}{3}$$

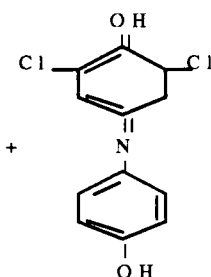
Бу ерда: 10-сирка кислотали экстрактнинг ҳажми;

a - титрлаш учун сарф бўлган, 2,6- дихлорфенолиндофенол эритмасининг ҳажми;

3-титрлаш учун олинган экстракт миқдори.



Дегидроаскорбат
кислота



2,6-дихлорфенолиндофенол
(қайтарилган формаси)

Цитринни (Р витамин) аниқлаш

Р-витамин активлигига эга бўлган моддаларга фенол табиатли бирикмалар киради. Буларга рутин, геспередин, кварцетин ва бошқалар киради. Булар ўсимлик гуллари ва меваларида кўп миқдорда учрайди.

Ишинг бориши. 2-5 грамм лимон пўстлогидан олиб чинни ҳовончада шиша кукунлари ёрдамида спирт билан бир хил масса ҳосил бўлгунча эзилади. Масса рангсиз бўлгунга қадар спиртнинг оз-оз порцияси билан ювилади. Филтрат спирт ёрдамида 50 ёки 100 мл ҳажмга етказилади. Кейин аралашмадаги спирт Вюрц колбасида ажратилади. Колба тагидаги қолдиқ (3-5 мл) чинни косачага қўйилади ва спирт сув ҳаммомида тўлиқ ҳайдалади. Кейин косачага 3-5 мл сув қуйиб қолдиқ эритилади. Сувли эритма билан қуйидаги реакциялар қилинади.

1. Пробиркага 1 мл эритма олинади ва унга 4-5 томчи темир хлорид эритмаси томизилади ва яшил ранг ҳосил бўлади.

2. Пробиркага 1 мл эритма олинади. Унинг устига эҳтиёткорлик билан пробирка девори бўйлаб 1 мл концентранган сульфат кислота қўйилади. Икки суюқлик ўртасида сариқ рангли айлана ҳосил бўлади.

Реактивлар: лимон меваси, этил спиртнинг 80% ли эритмаси, темир хлориднинг 1% ли эритмаси, сульфат кислотанинг концентранган эритмаси.

IX БОБ. ОРГАНИК КИСЛОТАЛАР

Органик кислоталар ўсимликлар таркибида учрайдиган бошқа муҳим бирикмалар - углеводлар ва оксиллар каби жуда кенг тарқалган моддалар ҳисобланади. Улар ўсимликларнинг уруғи, барги, илдизлари, гули ва меваларида учрайди. Нордон мевалар таркибида органик кислоталар эркин ҳолда ва қисман нордон тузлар сифатида учрайди. Баъзи ўсимликлар масалан, ровоч, отқулоқнинг баргларида ва поясида эркин органик кислоталар ёки уларнинг нордон тузлари кўп тўпланади. Ўсимликларнинг турли қисмларида органик кислоталар турли миқдорда учрайди.

Уруғда улар 0,5%га яқинни ташкил қилса, барг ва меваларда 8-12% ни ташкил қилади. Улар айниқса ловия, лимон ўсимликлари таркибида кўп тўпланади.

Ўсимликлар таркибида учрайдиган органик кислоталар миқдори ўсимлик тури, тупрок-иклим шароити ва бошқа факторлар таъсирида ўзгариб туради. Масалан, минерал ўғитлар, айниқса унинг нитрат формалари ўсимлик таркибидаги органик кислоталар миқдорининг ортишига сабабчи бўлади. Амалий аҳамиятга эга бўлган органик кислоталарга цитрат, малат, оксалат ва сукцинат кислоталарни мисол қилиб кўрсатиш мумкин. Кўпчилик қишлоқ хўжалик маҳсулотларининг сифати уларнинг таркибидаги органик кислоталар миқдори билан белгиланади.

Органик кислоталарни ўсимликлар таркибидан ажратиб олиш уларнинг сувда, спиртда ва эфирда эришига асосланган. Органик кислоталарни ажратиб олишнинг энг қулай усули минерал кислоталар билан нордонлаштирилган эфирда экстракция қилишдир.

Ўсимликларнинг умумий кислоталилигини аниқлаш

Ўсимликларнинг умумий ёки титрланувчи кислоталилигини аниқлаш, улардан ажратиб олинган сувли экстрактлар таркибидаги барча эркин органик кислоталар ва улар тузларини ишқор билан титрлашга асосланган. Бунга маълум индикаторларни қўллаш билан эришилади. Одатда, титрлаш натижаси шу объектда кўп учрайдиган асосий органик кислотанинг фоиз миқдори билан ифодаланади.

Ишнинг бориши. Ўсимлик материалидан (барг, мева, уруғ ёки бошқа органлар) 10-20 г тортиб олинади ва чинни ҳовончада 2-10 мл сув қўйиб шиша кукунлари ёрдамида бир хил масса ҳосил бўлгунча эзилади. Ҳосил бўлган масса 50 мл сув ёрдамида ҳажми 200 мл ли ўлчов қолбага қўйилади ва дистилланган сув билан чизикчага тўлдириб 1 соатга қолдирилади. Вақт тугагач экстракт фильтридан 50 мл олиб, ҳажми 100 мл ли қолбага қўйилади. Қолбага бир неча томчи фенолфталеиннинг спиртли эритмасидан қўшиб, ўювчи натрийнинг 0,1 Н эритмаси билан оч пушти ранг ҳосил бўлгунча титрланади. Агар фильтрат рангли бўлса тимолфталеин билан титрлаш яхши натижа беради. Бунда кўк ранг ҳосил қилгунча титрланади. Рангли фильтрларни фенолфталеин билан ҳам титрласа бўлади, бироқ пушти ранг ҳосил бўлгунча эмас, балки умуман

ранг ўзгаргунча яшил ёки рангсиз бўлгунча титрланади. Нейтраллаш пайтида рангнинг ўзгариши яққол кўринади. Рангли экстрактларни худди шундай ҳажмда филтрат қуйилган ва фенолфталеин томизилган ёнма-ён турган колба билан таққослаб титрлаш тавсия қилинади.

Агар филтрат ҳаддан ташқари тўқ рангли бўлиб, уларни рангининг ўзгаришига қараб титрлашни иложи бўлмаса, унда рН-метрлар ёрдамида титрлаш мумкин. Потенциометрик титрлаш рН га тенг бўлганда тўхтатилади. Текширилаётган ўсимлик материалнинг умумий кислоталилиги (нордонлиги) 100 г куруқ ўсимлик материални титрлаш учун сарфланган 0,1 Н ишқорнинг миқдори билан ёки шу маҳсулот таркибидаги кўп миқдорда учрайдиган органик кислотанинг миллиграмм миқдори билан ифодаланади.

$$X = \frac{a \cdot T \cdot K \cdot 100}{H \cdot 50}$$

X-текширалаётган ўсимлик материалнинг кислоталиги, % - ҳисобида, а-титрлаш учун сарфланган 0,1 Н ўювчи натрийнинг миқдори, мл; Т- титрга тузатма. V - умумий экстракт ҳажми, мл. 50 титрлаш учун олинган филтрат миқдори мл. Н-ўсимлик материалнинг вазни, г. К-кўп учрайдиган органик кислота бўйича ҳисоблаш коэффициенти.

Мисол. 20 г ўсимлик материалнинг экстракти 200 мл га етказилди. Титрлаш учун 50 мл тиниқ филтрат олинди. Бунга 3,5 мл ишқор сарфланди. Ишқорнинг титри 0,9900 га тенг. Кислоталик малат кислотаси бўйича аниқланди. Унда юқоридаги формула қуйидаги кўринишга эга бўлади.

$$X = \frac{3,50 \cdot 0,9900 \cdot 200 \cdot 0,0067 \cdot 100}{20,0 \cdot 50} = 0,469 \%$$

Реактивлар. Ўювчи натрийнинг 0,1 Н эритмаси, фенолфталеин индикатори (1 г фенолфталеин 60 мл этил спиртида эритилиб, сув билан етказилади).

Цитрат кислотани аниқлаш

Цитрат кислота ўсимликларда кенг тарқалган трикарбон гуруҳли органик кислота ҳисобланади. Цитрат кислота ўсимлик мевалари ва баргларида тўпланади. У айниқса, гўза баргларида кўп учрайди. Ўзбекистонда гўза баргларидан цитрат кислотани ажратиб олиш академик О.Содиқов томонидан ишлаб чиқилган.

Ишнинг бориши. Ўсимлик материалларида цитрат кислотали шиарларни қуйидагича ажратилади. Ўсимлик материалдан 50-100 г (қуруғидан 5-10 г) олиб чинни ҳовончада бир хил масса ҳосил бўлгунча эзилади ва ҳажми 250 мл бўлган колбага қуйилади, унинг устига 100 мл дистилланган сув қўпилади. Сўнгра сульфат кислотанинг 20% ли эритмасидан 10 мл (1:10) қуйилади ва 15-30 минутга қолдирилиб, умумий ҳажми дистилланган сув билан 200 мл га етказилади. Колбадаги аралашма яхшилаб чайқатилади

ва 2 соатга қолдирилади. Вақт тамом бўлгандан сўнг фосфорвольфромат ёки метафосфат кислотанинг 5%ли эритмасидан 5-10 мл қўшилади, аралаштириб центрифугаланади ёки филтрдан қурук ўлчовли (250 мл ли) колбага ўтказилади. Умумий ҳажми дистилланган сув билан чизикчача олиб борилади.

Цитрат кислота микдорини аниқлаш

Юқоридаги ишда тайёрланган филтрат ёки центрифугатдан 50 мл олиб, ҳажми 200 мл ли колбага қуйилади ва 5 мл калий бромид тузининг 30% ли эритмасидан, 10 мл сульфат кислотанинг сув билан 1:1 нисбатида аралаштирилган эритмасидан қўшилади. Аралашма яхшилаб чайқатилади ва яна уни устига 20 мл калий перманганат тузининг 5% ли эритмасидан қўшилади. Колба мўрили шкафта 10 % минут қолдирилади. Агар реакция натижасида ҳосил бўлган қўнғир рангли марганец (II)-оксид чўкмасининг ранги йўқола бошласа, тажриба такрорланиб, калий перманганат эритмасидан кўпроқ олиш тавсия қилинади. Реакциянинг охирида ортикча оксидловчи модда темир (II)-сульфат оксиднинг тўйинган эритмасидан 20 мл қўшиш билан рангсиз ҳолгача қайтарилади. Реакция натижасида ҳосил бўлган пентобром ацетатни чўкмага тушириб олиш учун колба 12-18 соатга совитгичда қолдирилади. Сўнгра филтрдан ўтказилиб, филтратдаги чўкма муздай сув билан сув нейтрал ҳолга келгунча (метилоранж ёрдамида) 3-4 марта ювилади. Яхши ювилган чўкма оппоқ ёки бир оз рангли кўринишга эга бўлади.

Пентабромацетат чўкмаси олдиндан массаси аниқланган чинни тегельга солинади ва сульфат кислота қўйилган эксикаторда қурилади. Қурилган чўкма тигельда тортилиб, ундан тигель оғирлиги айрилса, чўкма оғирлиги маълум бўлади. Пентабромацетатнинг 1 мг ми 0,483 мг цитрат кислотага тўғри келади.

Реактивлар. Калий бромиднинг 30%ли эритмаси, сульфат кислота-нинг 48 % ли эритмаси, калий перманганатнинг 5% ли эритмаси, темир (II) -сульфатнинг тўйинган эритмаси.

Сукцинат кислотани аниқлаш

Бу кислота дастлаб қаҳрабо таркибидан ажратиб олинганлиги учун унга шу ном берилган сукцинат кислота кўпчилик ўсимликлар таркибида учрайди. У айниқса пишмаган меваларда кўп бўлади.

Ишнинг бориши. 5-10 г қурук ўсимлик материали чинни ҳовончада майдаланади ва 4 мл сульфат кислотанинг сув билан аралашмасидан (1:4) қўшилади. 1,5-2 соат ўтгач ҳовончага сувсизлантирилган натрий сульфатдан 4-5 грамм қўшилади ва яхшилаб бир хил гомоген масса ҳосил бўлгунча эзилади. Аралашма, ҳажми 200 мл бўлган колбага қуйилади ва унга 100 мл эфир қўшилади. Колбани оғзи маҳкам (герметик равишда) беркитилиб 15-30 минут давомида механик тебратгич асбобида чайқатилади. Сўнгра эфирли аралашма бўлувчи воронкага қўйилади ва уни ус-

тига 100 мл сув қўшилади. Воронка вақти-вақти билан чайқатилиб турилади. 30 минут ўтгач органик кислоталар ўтган сувли фаза ажратилади. Сув таркибидаги эфир қолдиқлари буғлантириш йўли билан ажратилади. Сувли аралашма уй ҳароратигача совитилади ва ҳажми 200 мл бўлган ўлчов қолбага қўйилади ҳамда дистилланган сув билан чизикчага етказилади, аралашмадан 100 мл олиб, ҳажми 200 мл ли қолбага қўйилади ва 1 Н барий ишқори эритмаси билан нейтралланади ҳамда 1 мл барий хлориднинг 10% ли эритмасидан қўшилади. Кейин қолба қайнаб турган сув ҳаммомида 10 минут давомида қиздирилади. Бунда қолбага ҳаво совитгичи уланган бўлиши керак. Сўнгра қолбадаги аралашма чинни косачага қўйилади ва сув ҳаммомида қайноқ ҳолатгача буғлантирилади. Чинни косачада қолган қуюқ аралашма 20 мл сув ёрдамида эритилади ва 80 мл этил спирти қўшиб 1-2 соатга қолдирилади. Вақт тугагач Бухнер воронкаси орқали спирт ажратилади. Фильтрда қолган чўкма эса сув билан ювилиб қолбага қўйилади. Аралашма қайнаб турган сув ҳаммомида қиздирилиб қолган спиртдан тозаланади, сўнгра қолбани қиздиришни давом эттириб, аста-секин калий перманганат тузининг 5% ли эритмасидан турғун қизил ранг ҳосил бўлгунча қўшилади.

Аралашма қайнаб турган сув ҳаммомида қиздирилиб қолган спиртдан тозаланади, сўнгра қолбани қиздиришни давом эттириб, аста-секин калий перманганат тузининг 5% ли эритмасидан турғун қизил ранг ҳосил бўлгунча қўшилади.

Аралашма сульфат кислота ёрдамида нордонлаштирилиб ортикча перманганат водород пероксиди ёрдамида йўқотилади.

Ҳосил бўлган эритма чинни косачага қўйилади ва сув ҳаммомида 10-15 мл қолгунча буғлантирилади. Сўнгра 5 г сувсизлантилган натрий сульфат тузидан қўшиб 1-2 соатга қолдирилади. Кейин қоғоз пакетларга солиниб сокслет аппарати ёки қолбада диэтил эфир билан 1 соат давомида экстракция қилинади. Кейин эфир ҳайдалади ва 20 мл дистилланган сув қўшиб 0,1 Н ўювчи калий билан фенолфталеин ёрдамида титрланади. Бунда 1 мл сарфланган ишқор 5,9 мг сукцинат кислотага тенг бўлади. Сукцинат кислота миқдори қуйидагича аниқланади.

$$X = \frac{a \cdot 5,9 \cdot V \cdot 100}{c \cdot V}$$

X-сукцинат кислота миқдори, мг % да: a-титрлаш учун сарфланган ўювчи калийнинг миқдори, мл; V- текширилаётган материалдан ажратиб олинган аралашма ҳажми, мл; V_1 -анализ учун олинган аралашма, мл; C- текширилаётган материал массаси, г.

Реактивлар: сульфат кислотанинг сув билан аралашмаси (1:4); сувсизлантилган натрий сульфат тузи, диэтил эфир, барий ишқорининг 1Н эритмаси, барий хлориднинг 10%ли эритмаси, этил спиртининг 96% ли эритмаси, калий перманганат тузининг 5 %ли эритмаси, сульфат кислота (зичлиги 1,84) водород пероксиди, ўювчи калийнинг 0,1 Н эритмаси.

Х БОБ. ГОРМОНЛАР

Гормонлар биологик актив органик моддалар қаторига кириб, улар асосан махсус чиқариш йўллари бўлмаган эндокрин безлар ёки ички секреция безларида (грекча endo - ички ва kinen ажратаман деган сўзлардан олинган) ишлаб чиқарилиб, гуморал йўл билан бошқа тўқималар етказилади.

Гормонларнинг баъзи вакиллари модда алмашинувини бошқариб турса ҳам, ҳайвон гормонларининг кўпчилиги автоном хужайра системаларининг ишини химиявий алоқа йўли билан бир бутун организм фаолияти сифатида бошқаради.

Ички секреция безларига: қалқонсимон без; қалқонсимон олди безлари ёки паратиреоид безлар; буйрак усти безлари; меъда ости беzi - унинг маълум қисмлари; жинсий безлар; уруғдон ва тухумдонлар; гипофиз ёки мия ортиги; бўқоқ беzi киради.

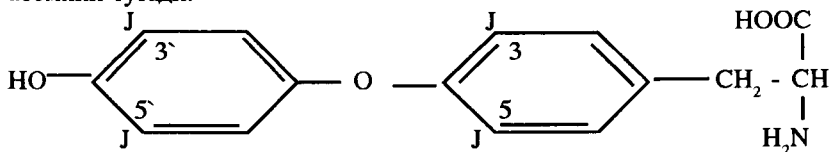
Ички секреция безлари функцияси бузилганда турли касалликлар пайдо бўлади. Улар айрим безлар функциясининг зўрайиб кетиши натижасида гормонни ортиқча ишлаб чиқариш (гиперфункция) ёки активлиги сусайиши натижасида кам ажратишига (гипофункция) га боғлиқ.

Химиявий тузилиши, табиати ва таъсир усулига қараб гормонларни қуйидаги уч гуруҳга бўлиш мумкин.

1. Стероид гормонлар. 2. Аминокислоталар ҳосиласи бўлган гормонлар. 3. Пептид ва оксил табиатли гормонлар.

Қалқонсимон без гормонида йодни очиш реакцияси

Қалқонсимон без энг муҳим эндокрин безларининг биридир. Одамда қалқонсимон безнинг оғирлиги - 25-30 г атрофида бўлади. Қалқонсимон без, асосан, тироксин гормони ишлаб чиқариб, у таркибида тўртта йод атомини тутати.



Тироксин, 3,5',5',5, - тетрайодтиронин

Қалқонсимон безга характерли бўлган оксил тиреоглобулин бўлиб, бу оксилнинг молекуляр оғирлиги 600000 га тенг бўлиб, гормон хоссаларига эга.

Қалқонсимон безда гормон ишлаб чиқарилишининг бузилиши натижасида бир қатор касалликлар келиб чиқади. Безнинг функцияси пасайганда гормон кам миқдорда ишлаб чиқарилиб, организмда гипотиреоз ҳолати пайдо бўлади. Бундай ҳолларда организмда микседема ва кретинизм касалликлари келиб чиқади. Қалқонсимон безнинг кенг тарқалган эндемик формаси - бўқоқ бўлиб, бу касалликнинг асосий белгиси қалқонсимон

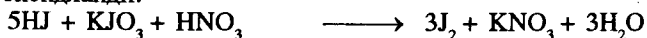
безнинг ҳаддан ташқари катталашиб кетишидир (гипертрофия). Бўқок пайдо бўлиши ташқи муҳитда (тупроқда, сувда, ўсимликларда, озиқ-овқатларда) йод етишмаслиги билан боғлиқ. Агар қалқонсимон безнинг функцияси ортиб кетса, гипертиреоз ҳолати рўй беради. Тиреотоксикоз касалликларида моддалар алмашинуви тезлашганидан организмнинг озиб кетиш ҳоллари рўй беради, тебранувчан бўлиб қолади, юраги тез-тез уради. Тиреотоксикоз ҳолатида қалқонсимон безда йод алмашинуви тезлашиб, безнинг қондан йодитни ютиш кучаяди.

Қалқонсимон без гормонлари моддалар алмашинувининг ҳамма турларига таъсир кўрсатади. Қондаги тироксин миқдори гипофизнинг тиреотроп гормони томонидан қатъий тартибга солиб туради. Қондаги тироксин миқдори билан гипофизнинг тиреотроп функцияси тескари (реципрок) алоқада бўлади. Унда тироксин миқдори кўпайиб кетса, тиротроп гормони чиқарилиши камаяди, аксинча, тироксиннинг миқдори камайса, гипофиз гормони кўпроқ ҳосил бўлиб, қалқонсимон безни стимуляциялайди, натижада тироксин анчагина сарф бўлади ва унинг қондаги миқдори ортади. Бу жараёнларга марказий нерв системаси гипоталамус орқали ўзининг регуляцияловчи таъсирини кўрсатади.

Керакли асбоблар: пробиркалар билан штатив; пипеткалар; стакан; сув ҳаммоми.

Реактивлар. 1) Тиреоидин таблеткаси (битта таблеткадаги 0,1 г масса таркибида 0,17-0,23 мг йод мавжуд). 2) Суюлтирилган нитрат кислота (1:1). 3) Калий йодатнинг (KIO_3) 10% ли эритмаси. 4) Хлороформ.

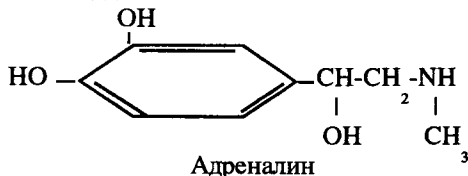
Ишнинг бориши. Тиреоидин таблеткаси майдаланади ва ҳосил бўлган кужуни пробиркаларга солинади. Шундан кейин 2 мл нитрат кислотасидан қўшиб, қайнаб турган сув ҳаммомида 3-4 минут қиздирилади. Кейин пробиркани совутиб, 2 мл калий йодат эритмасидан қўшиб, бир неча марта чайқатилади ва пробирка стакандаги сувга солиб совитилади. Бир неча минутдан кейин 1-1,5 мл хлороформли пастки қаватни пушти-бинафша ранг эгаллайди. Бу ранг ҳосил бўлишининг сабаби гидролиз натижасида пайдо бўлган йодит кислотани калий йодат эркин ҳолдаги йодгача оксидлайди:

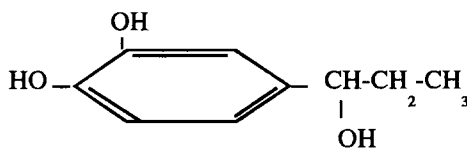


Хлороформ қаватидаги йод пушти-бинафша ранг ҳосил қилади.

Буйрак усти безининг мия қавати гормонлари

Буйрак усти безининг мия қавати адреналин ва норадреналин гормонларини ишлаб чиқади.





Норадреналин

Адреналин ва норадреналин бир хил биологик таъсирга эга, уларнинг таъсири фақат миқдор жиҳатдан фарқланади. Бу гормонларнинг энг муҳим биологик функцияси қон босимини оширишдан иборат. Норадреналиннинг бу таъсири адреналинникига қараганда кучлироқ.

Адреналин организмда углеводлар алмашинувига кучли таъсир кўрсатади ва моддалар алмашинувини кучайтиради. Адреналин жигар гликогенининг парчаланишини кучайтириб, қонда глюкоза миқдорини кўпайтиради.

Адреналин - жуда чидамсиз модда, у осон оксидланиб, қайтарувчанлик хусусиятини намоён қилади. Масалан, у қумуш нитрат эритмасидан қумуш металлгача қайтариш хусусиятига эга. Адреналин нейтрал ва ишқорий шароитда осон оксидланади. Адреналиннинг оксидланиш натижасида ҳосил бўлган маҳсулотлар (дегидроадреналин, адренохром ва бошқалар) организмдаги оксидланиш жараёнларида иштирок этади.

Адреналиннинг сифат реакциялари

1. Темир-III-хлорид билан реакцияси: адреналинга темир хлорид эритмасидан қўшилганда, яшил ранг ҳосил бўлади, бунда адреналиннинг пирокатехин халқаси темир хлориди билан яшил рангли комплекс бирикма ҳосил қилади. Пирокатехин ҳам шундай реакция беради.

Керакли асбоблар: пробиркалар билан шатив; 1,2 мл ли пипеткалар.

Реактивлар. 1. Адреналиннинг 0,01% ли эритмаси (ампулада) 2. Темир-III-хлориднинг 3% ли эритмаси. 3. Пирокатехиннинг 0,05% ли эритмаси.

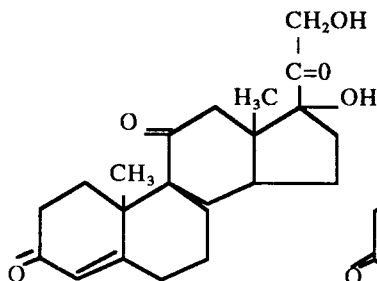
Ишнинг бориши. Биринчи пробиркага 1-2 мл сув, иккинчи пробиркага 1-2 мл адреналин эритмаси, учинчи пробиркага 1-2 мл пирокатехин эритмасидан солинади. Сўнгра ҳамма пробиркаларга 2 томчидан темир хлориднинг эритмасидан қўшилади. Адреналин, пирокатехинли пробиркаларда яшил ранг ҳосил бўлади.

2. Калий йодат (KIO_3) билан реакцияси. 1. Адреналиннинг 0,01% ли эритмаси. 2. Калий йодатнинг 1% ли эритмаси. 3. Сирка кислотасининг 10% ли эритмаси.

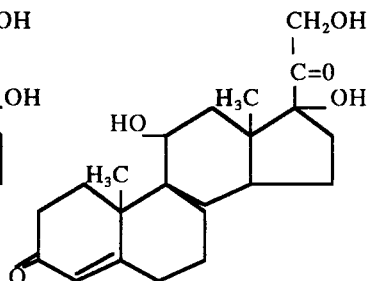
Ишнинг бориши. Пробиркага 0,5 мл адреналиннинг эритмасидан олиб унга 1 мл 1% ли калий йодат ҳамда 10 томчи 10% ли сирка кислотасининг эритмасидан қўшилади. Натижада қизил-яшил ранг ҳосил бўлади.

Буйрак усти безлари пўстлоқ қаватининг гормонлари

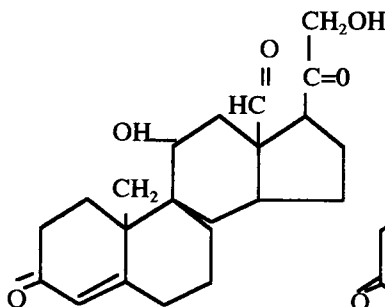
Буйрак усти безларининг пўстлоқ қавати ёғларда эрийдиган бир қанча муҳим гормонларни ишлаб чиқаради. Пўстлоқ қаватидан олинган экстракт таркибида 34 дан ортиқ стероид аниқланиб, шулардан бир нечтаси гормон активлигига эга, қолганлари гормонлар синтезида иштирок этадиган оралиқ бирикмалар, баъзилари эса таъсир этувчи моддаларнинг парчаланиш маҳсулотларидир. Булар асосан циклопентанопергидрофенантреннинг тетрациклик структурасига эга бўлиб, яъни стероидлар холестерин, ўт кислоталари, провитами́нлар, жинсий гормонлар учун ҳам умумийдир, шунинг учун бундай моддалар **кортикостероидлар** деб аталади. Минерал кортикоидлар электролит ва сув балансига жавоб беради, бунга асосан дезоксикортикостерон киради. Углевод ва оксил алмашинуви регуляциясига жавоб берувчи глюкокортикоидларга альдостерон, кортизон, кортизол гормонлари киради. Бу безнинг функцияси пасайганда, қон зардобиди Na^+ , Cl^- , бикарбонат ва глюкозанинг камайиши, мускулда Na^+ ни камайиши, K^+ ва сув микдорининг ортиши, зардобда K^+ ва азотнинг ортиши ҳоллари кузатилади. Жигар ва мускулда гликоген микдори камаяди. Сийдик билан Na^+ , Cl^- ва бикарбонат чиқарилиши кўпайиб K^+ ва умумий азот чиқарилиши камаяди.



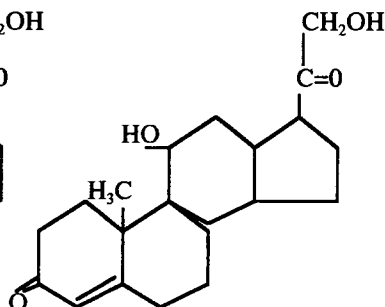
Кортизон



Кортизол (гидрокортизон)



Альдостерон



Кортикостерон

Кортизоннинг сифат реакциялари

1. Фенилгидразин сульфат билан реакцияси.

Кортизон карбониль гуруҳи ҳисобиға фенилгидразин билан гидрозон ва озонни ҳосил қилади.

Керакли асбоблар: пробиркалари билан штатив; 1,10 мл ли пипет-калар, сув ҳаммоми.

Реактивлар. 1.Фенилгидразин сульфат эритмаси: 0,1 г фенилгидразин 100 мл 50% ли сульфат кислота эритмасида эритилади. 2. «Кортизон-ацетат» препарати. 3. Метил спирти.

Ишнинг бориши. 1 мг кортизон-ацетат 1 мл метил спиртида эритилиб 5 мл фенилгидразин эритмасидан қўшилади ва сув ҳаммомида киздирилади. Бир неча минутдан сўнг сарик ранг ҳосил бўлади.

2. Фелинг реактиви билан реакцияси. Кортизон мис тузларини мис оксидига қайтариш хусусиятига эға.

Реактивлар. 1. Кортизон-ацетат препарати. 2. Фелинг реактиви. 1. 500 мл колбада 34, 64 г мис сульфат ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) эритилади ва колба белгисигача дистилланган сув қўшилади. 2. 500 мл колбаға 173 г сегнет тузини солиб 200-250 мл дистилланган сувда эритилади, сўнг унга 100 мл 50% ли натрий ишқори эритмасидан солиб, ҳажми сув билан колба белгисигача етказилади. Реактивни қўлланишдан олдин тенг ҳажмда биринчи ва иккинчи эритмалардан олиб аралаштирилади.

Ишнинг бориши. Пробиркаға 10 мг кортизон-ацетати солиб, 1 мл метил спиртида эритилади ва 1 мл Фелинг реактивидан қўшилади, сўнгра сув ҳаммомида киздирилади. Натижада қизил чўкма -мис оксиди ҳосил бўлади.

Ошқозон ости беzi гормони - инсулин

Ошқозон ости беzi гормони - инсулин - Лангерганс оролчаларининг β - хужайраларидан ишлаб чиқарилади. Организмда инсулин етишмай қолганда, қонда қанд микдори камаяди (гипергликемия) ва организмдан қандни сийдик билан бирға чиқиб кетиши ортади, бу ҳодиса **глюкозурия** деб аталади, оқибатда диабет деб аталадиган касаллик келиб чиқади.

Кристалл ҳолдағи инсулиннинг молекуляр оғирлиғи 36000 га тенг бўлиб, иккита полипептид занжиридан иборат: А (21 та аминокислота қолдиғи) ва Б (30 та аминокислота қолдиғи бор). Бу полипептид занжирлари дисульфид боғлари орқали боғланган. Инсулиннинг биологик аҳамияти шундан иборатки, у гликоген синтези учун шароит яратиб беради.

Инсулиннинг сифат реакциялари. Инсулин ҳамма оксилларға хос бўлган биурет ва олтингугурт тугувчи аминокислоталарға хос реакциясини беради.

Керакли асбоблар: пробиркалар билан штатив; 1,2 мл ли пипет-калар; спирт лампаси.

Реактивлар: 1. Инсулин эритмаси (ампулада). 2. Натрий ишқорининг 10% ли эритмаси. 3. Мис сульфатнинг 1% ли эритмаси. 4. Қўрғошин ацетатнинг 0,5% ли эритмаси.

1. Биурет реакция. Пробиркага 1-2 мл инсулин эритмасидан солинади. Кейин тенг ҳажмда натрий ишқори эритмаси ва 1-2 томчи мис сульфатнинг эритмасидан қўшилади. Натижада бинафша ранг ҳосил бўлади.

2. Олтингугурт тутувчи аминокислоталар учун реакция. Пробиркага 1-2 мл инсулин эритмаси ва тенг ҳажмда натрий ишқори эритмасидан солиб қайнагунча қиздирилади. Сўнгра 2-3 томчи қўрғошин ацетат эритмасидан қўшиб қиздирилади. Натижада пробиркада қора чўкма ҳосил бўлади.

XI БОБ. ҚОН

Қон артериялар, веналар ва капелляларда доимо айланиб турадиган суюқлик бўлиб, турли мураккаб физиологик функцияларни бажаради: 1. Органлар ва тўқималарни кислород билан таъминлайди ва ажралиб чиққан карбонат ангидридни олиб кетади. 2. Озиқ моддаларини ичакдан тўқималарга ва органларга етказиши. 3. Моддалар алмашинувидаги охириги маҳсулотларни чиқариш органларига, (ўпка, буйрак ичак, тери) ташийди. 4. Қоннинг регулятор функцияси-ниҳоятда муҳим бўлиб, у осмотик босимни, муҳитнинг рН доимийлиги, кислота-ишқор мувозанатини сақлаб туриш, гормонлар, витаминлар, минерал моддалар транспорти, сув ҳамда иссиқлик алмашинуви жараёнларини тартибга солиб туради. 5. Химоя функциясини бажаради.

Қон ҳайвон организмнинг умумий массасини тахминан 8-10 %ини ташкил қилади. Қон —плазма ва шаклий элементларидан: эритроцитлар, лейкоцитлар ва тромбоцитлардан тузилган.

Қон таркибига оксиллар, ёғлар, углеводлар, моддалар алмашинувининг турли оралиқ маҳсулотлари, гормонлар, витаминлар, ва минерал тузлар киради. Тўқимадаги моддалар алмашинувининг бузилиши қоннинг таркибини ўзгаришига олиб келади Шунинг учун организмнинг соғломлиги қоннинг таркибий қисмларини миқдорий анализ қилиб билинади.

Қон зардобининг оксил фракцияларини аниқлаш

Қон зардобини оксил фракцияларини экспресс-метод билан аниқлаш, оксилларни турли концентрациядаги фосфатли эритмалар билан чўктиришга асосланган. Маълум оксил фракциялари эритмаларининг оптик зичлиги фотоэлектроколориметр ва спектрофотометр билан аниқланади.

Оксил фракцияларини аниқлашнинг экспресс-методи, маълум шароитда озиқланаётган ҳайвонларнинг оксил алмашинувидаги ўзгаришини билиш учун ишлатилади.

Керакли асбоблар: бюретка; пипеткалар, пробиркалари билан штатив, цилиндрлар; колбалар, фотоэлектроколориметр ёки спектрофотометр.

Реактивлар. 1. Асосий эритма: - бу эритмани тайёрлаш учун 226,8г KH_2PO_4 олиб, 400 мл 33,5 NaOH тутган эритмада тўлиқ эритилади. Кейин эритма хона ҳароратигача совутилиб, ҳажми дистилланган сув билан 500 мл га етказилади.

2. Биринчи эритмани тайёрлаш учун асосий эритмадан 92,6 мл (ёки 123,5 г) олиб, 100 мл ли колбага солинади ва дистилланган сув билан колба белгисигача етказилади. 3. Иккинчи, учинчи, тўртинчи эритмани тайёрлаш учун асосий эритмадан 100 мл колбаларга 75 ,0 мл (100 г), 50,8 мл (78,5г) ва 48,7 мл солиб, ҳажми сув билан колбанинг белгисигача етказилади.

Ишнинг бориши. 1. Олтита пробирка олиб, уларни 0,1,2,3,4, 5 рақамлари билан белгиланади. 2. 0 рақамли пробиркага 10 мл дистилланган сув, 1, 2, 3, 4 номерли пробиркаларга 5 мл дан суюлтирилган фосфат эритмаларидан (1,2,3,4 – эритмалардан), 5- пробиркага 0,5 мл қон зардоби, 0,75 мл дистилланган сув ва 3,75 мл асосий фосфат эритмасидан солинади. 3. 5-пробиркадаги суюқлик аралаштирилади, сўнгра шу пробиркадан 1,2,3,4 пробиркаларга 0,5 мл дан, 0 рақамли пробиркага 1 мл аралашмадан солинади ва пробиркалар чайқатилади. 4. 15 минутдан кейин 1,2,3,4 пробиркалардаги эритмаларнинг оптик зичлиги фотоэлектроколориметрда - қизил ёруғлик фильтри билан аниқланади. 0 рақамли пробиркадаги эритма контрол сифатида ишлатилади. 5. 1,2,3,4- пробиркаларидаги аралашмаларнинг оптик зичлиги аниқлангандан кейин, оксил фракциялари ҳисобланади. Биринчи пробиркадаги аралашманинг оптик зичлигидан иккинчи пробиркадаги аралашманинг оптик зичлигини айириб ташланади. Оптик зичликларнинг фарқи, альбуминнинг оптик зичлигига тўғри келади. Иккинчи пробиркадаги аралашманинг оптик зичлигидан учинчи пробиркадаги аралашманинг оптик зичлиги айириб ташланади. Бу фарқ альфа-глобулинларнинг оптик зичлигини кўрсатади. Учинчи пробиркадаги аралашманинг оптик зичлигидан тўртинчи пробиркадаги аралашма оптик зичлиги айириб ташланади. Бу оптик зичликларнинг фарқи β - глобулинларнинг оптик зичлигини кўрсатади. Сўнгра 1 ва 4-пробиркалардаги аралашмаларнинг оптик зичлигининг фарқлари қўшилади ва йиғиндисини 100 % деб олиб, ҳар бир оксил фракциясини нисбий фоизи ҳисобланади. Ҳар бир фракция грамм-фоизи ҳисобланади. Бунинг учун умумий оксилларнинг миқдори рефрактометрия методи билан топилади. Оксилларни умумий миқдорини 100 % деб олиб, ҳар бир оксил фракцияларни нисбий фоизидан, фракцияларни абсолют фоизи ҳисоблаб топилади.

Сигир қони зардобдаги оксил фракцияларининг тахминий ҳисоби

Оқсил фракциялари	Пробиркалар номери	Оптик зичлик	Оптик зичликларнинг фарқи	Нисбий, %	Абсолют, %	Қон зардобдаги умумий оқсилларнинг миқдори, %
Альбуминлар α -глобулин	1	0,685	0,364	53,14	4,65	
	2	0,321	0,049	7,15	0,65	
β -глобулинлар	3	0,272	0,082	11,97	1,05	
γ -глобулинлар	4	0,190	0,190	27,74	2,48	
Йиғиндис		1,468				8,76

Қон, сийдикда глюкоза микдорининг ортотолуидин реактиви билан аниқлаш

Методнинг принципи. Кислотали муҳитда юқори ҳарорат таъсирида глюкоза билан О-толуидин кўк-яшил комплекс ҳосил қилади, бу рангнинг интенсивлиги глюкозанинг концентрациясига боғлиқ, оптик зичлиги спектрофотометр билан ўлчанади.

Керакли асбоблар: пробиркалари билан штатив; 1,2 мл ли пипеткалар, центрифуга, спектрофотометр; сув ҳаммоми.

Реактивлар. 1.Ортотолуидин реактиви: 0,15 г тиомочевинани 94 мл сирка кислотасида эритилади ва 6 мл ортотолуидин қўшилади. Бу реактив холодильникда сақланади. 2. Трихлорсирка (5 %ли) кислотасининг эритмаси. 3.Глюкозанинг стандарт эритмаси, 100 мг %; бу эритмани тайёрлаш учун, 100 мг глюкозани 100 мл қолбага солиб, 0,2% бензой кислотасининг эритмасида эритилади. Бу реактив холодильникда сақланади.

Ишнинг бориши. Центрифуга пробиркасига 0,9 мл 5% ли трихлорсирка кислотаси солинади ва 0,1 мл қон ёки сийдик қўшилади. Пробирка чайқатилади ва 2500 айл/минутда 10 минут центрифуга қилинади. Сўнгра тиниқ суюқликдан 0,5 мл олиб пробиркага солинади ҳамда 4,5 мл ортотолуидин реактивидан қўшилади. Пробиркалар тикин билан беркитилади ва 8 минут қайнаб турган сув ҳаммомида олиб турилади.

Шундан кейин пробиркалар совутилади ва спектрофотометрда 630 нм тўлқин узунлигида ўлчанади. Бу билан бир вақтда контрол ва стандарт намуналар билан ҳам шундай иш олиб борилади. Контрол намунани тайёрлаш учун 0,5 трихлорсирка кислота ва 4,5 мл ортотолуидин реактивидан қўшилади. Стандарт намуна тайёрлаш учун қоннинг ўрнига 0,1 мл глюкозани стандарт эритмаси олинади ва тажриба намунасига ўхшаб иш олиб борилади. Контрол ва стандарт намуналар центрифуга қилинмайди.

Глюкозанинг концентрацияси юқори бўлган ҳолларда, айниқса сийдикнинг анализида, намунани 2 ёки 10 мартагача дистилланган сувда суюлтирилади. Олинган натижани суюлтириш сонига кўпайтирилади.

Глюкозанинг микдори қуйидаги формула билан ҳисобланади.

$$C_{он} = C_{см} \frac{E_{он}}{E_{см}} \quad \text{мг \% глюкоза.}$$

Бу ерда:

$C_{он}$ - пробиркадаги глюкозанинг концентрацияси, мг % да;

$C_{см}$ - стандарт намунадаги глюкозанинг концентрацияси, мг % да;

$E_{он}$ - намуна оптик зичлиги;

$E_{см}$ - стандарт намунанинг зичлиги.

Қон зардобдаги кальций микдорини аниқлаш

Кальций организмда жуда муҳим роль ўйнайди. У кўпроқ суяк тўқималарида фосфорли, карбонатли, фторли бирикмалари ҳолида учрайди. Суяк тўқималарида унинг концентрацияси камайиб кетса, қон орқали яна таъминланиб турилади. Қон зардобдаги кальцийнинг тахминан 40 фоизи альбуминлар билан боғланган мураккаб комплекс бирикмалар ҳолида учрайди. Кальций икки валентли катион бўлиб, нерв системасининг кўзгалувчанлигини камайтиради, актомиозинни, АТФ азани, лецитиназани активлаштиради ҳамда дегидротаза, депептидаза ва бошқа ферментларни тормозлайди, қоннинг ивишига ҳам таъсир этади.

Қон зардобдаги кальцийнинг микдори муҳим кўрсаткич ҳисобланиб, қон зардобиди орқали организм катион билан таъминланиб турилади. Шунинг учун ҳайвон қони зардобдаги кальцийнинг микдори доим текширилиб турилади.

Ҳар хил турдаги ҳайвонларнинг қон зардобдаги кальцийнинг микдори (мг %).

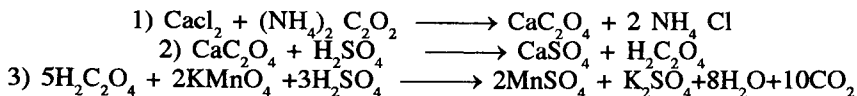
От	12 - 14	Чўчқа	12-14
Сигир	10-13	Ит	10-12
Туя	II - 12,5	Товуқ	12-22
Эчки	23 - 26		

Организмдаги кальций алмашинуви бир қатор омилларга боғлиқ. Унинг алмашинуви озиқалардаги кальций ва фосфорларнинг нисбатига, Д витаминнинг ва қалқон олди беши, буйрак усти безларининг физиологик ҳолатига боғлиқ. Бир қатор касалликларда қон зардобдаги кальцийнинг микдори ўзгаради. Қондаги кальций микдорининг камайиши (гипокальце-мия) яхши овқатланмасликда, рахит, туғма шол каби касалликларда кузатилади.

Гиперпаратиреоз, суяк тўқимасини шишларида Д витамини катта дозада қўлланилганда қонда кальцийнинг микдори кўпаяди.

Методнинг принципи. Қон зардобдаги кальций оксалатлар ҳолида чўктирилади. Чўкма ювилади, сўнгра сульфат кислотада эритилади ва ажралиб чиққан оксалат кислотаси калий перманганат эритмаси билан титрланади.

Реакция қуйидаги ҳолда боради:



Оқоридаги реакциядан кўриниб турибдики, оксалат кислотасининг оксидланишига кетган калий перманганати микдори, кальций микдорига эквивалентдир.

Керакли асбоблар: пробиркалари билан штатив; центрифуга, 2 ва 10 мл ли пипеткалар; шиша таёқча; микробюретка; сув ҳаммоми.

Реактивлар. Оксалат кислотасининг аммоний тузини 4 % ли эритмаси. Аммиакнинг 2 ли эритмаси. Сульфат кислотасининг 5,0% ли эритмаси. Калий перманганатнинг 0,01 н эритмаси.

Ишнинг бориши. 1. 2 та центрифуга пробиркаларига 2 мл дан дистилланган сув солинади.

2. Шу пробиркаларга 1 мл дан қон зардоби солиб, яхшилаб аралаштирилади.

3. Пробиркаларга пипетка билан 0,5 мл дан оксалат кислотанинг аммоний тузининг тўйинган эритмасидан солинади. Пробиркалардаги суюқликлар яхшилаб аралаштирилади ва кальцийни тўлиқ чўктириш учун 15 минутга қолдирилади.

4. Сўнгра пробиркалар центрифугага жойлаштирилади ва 10-15 минут давомида 3000 айл/мин центрифуга қилинади.

5. Центрифугадан пробиркалар олинади, пробиркалардаги суюқлик эҳтиёткорлик билан тўкилади, кальций чўкмаси пробирканинг тагида қолади.

6. Пробиркалардаги кальций чўкмасининг устига бюретка билан 4 мл дан дистилланган сув ёки 4 мл 2% ли аммиак эритмасидан солиб аралаштирилади ва 10-15 минут давомида 3000 айл/мин центрифуга қилинади.

7. Чўкмаси қолдириб суюқлик тўкиб юборилади, кальций оксалат чўкмасига 1 мл 50% ли сульфат кислотасидан солиб, чўкма шиша таёқча билан аралаштирилади ва пробирка 2-3 минут қайнаб турган сув ҳаммомига қўйилади.

8. Иссиқ эритма 0,01 н калий перманганатнинг эритмаси билан очпушти ранг ҳосил бўлгунча титрланади (ҳосил бўлган ранг 30 секунд ва 1 мин. вақт оралиғида йўқолмаслиги керак).

9. Қон зардобидаги кальцийни аниқлаш билан бир вақтда контрол тажриба ҳам ўтказилади, яъни дистилланган сув ва реактивлардаги кальцийнинг миқдори аниқланади. Бунинг учун центрифуга пробиркасига 3 мл дистилланган сув ва 0,5 мл дан оксалат кислотанинг аммонийли тузи эритмасидан солиб аралаштирилади, 15 минутдан кейин центрифугаланади, аммиак билан ювилади, яъни қон зардобида қандай иш олиб борилган бўлса, контрол тажрибада ҳам шундай иш амалга оширилади.

Тажриба намунасини (қон зардоби) титрлаш учун сарф бўлган калий перманганатнинг миқдоридан, контрол намунасини титрлаш учун сарф бўлган калий перманганатнинг миқдори айириб ташланади (1 мл 0,01 н MnO_4 эритмаси 0,2 мг кальцийга тўғри келади).

Кальций миқдорини ҳисоблаш учун мисол. Кальций миқдори куйидаги формула билан ҳисобланади: $X = 0,2 \cdot (a-b) \cdot 100$.

Бу ерда: X - кальцийнинг миқдори, мг % да, 0,2 мг даги кальцийнинг миқдори бўлиб, бу 1 мл 0,001 н калий перманганатга тўғри келади; а-

тажриба намунасини титрлаш учун сарф бўлган перманганатнинг миқдори, в - контрол намунасини титрлаш учун сарф бўлган перманганатнинг миқдори; 100 - мг % ҳисоблаш учун.

Қон зардобини титрлаш учун 0,01 н KMnO_4 эритмасидан 0,95 мл сарф бўлди, контрол намунасини титрлаш учун 0,3 мл 0,01 н KMnO_4 эритмаси сарф бўлди. Қон зардобидagi кальцийнинг миқдори қуйидагига тенг бўлади:

$$(0,95 - 0,3) \cdot 0,2 \cdot 100 = 13 \text{ мг \%}$$

Қон зардобидagi фосфор миқдорини аниқлаш

Фосфор тўқималарнинг тузилишида энг муҳим структура элементи ҳисобланади. Организмдaти суяк тўқималари таркибининг 85 фоизига яқинини фосфор ташкил қилади. Фосфор нуклеин кислоталар, нуклеопротеинлар, фосфопротеинлар, бир қатор коферментлар НАД, НАДФ, ФМН, ФАД пиридоксальфосфат, ТПФ ва фосфорли эфирлар, углеводларни синтези учун энг керакли компонент ҳисобланади.

Фосфорли бирикмалар - гликолиз, гликогенолиз, оксидланиш- фосфорланиш ва бошқа қатор моддалар алмашинуви жараёнларида иштирок этади. Фосфат кислотасининг тузлари буфер системалар таркибига кириб, қоннинг рН ни нисбий доимийликда ушлаб туради.

Хайвон қони зардобидagi анорганик фосфор миқдорининг ўзгариши организмнинг физиологик ҳолатига, ёшига, озиқаларнинг характериға боғлиқ. Хайвон қони зардобидagi анорганик фосфорнинг миқдори нормада қуйидагича бўлади, (мг % ҳисобида):

Сигирларда	4,6-5,5
Бузоқларда	6 -7,0
Чўчқаларда	3,0-4,0

Қон зардобидagi анорганик фосфор миқдорини камайиши одатда озиқа рационининг таркибида фосфор Д витамини етишмаслиги (гиповитаминоз Д), шунингдек, кальций ва фосфорнинг нисбати бузилганда кўриш мумкин.

Хайвонлар озиқа рационидagi кальцийнинг фосфорға энг мақбул нисбати қуйидагича бўлади: 1,5:1; 2:1, ёз даврида 2,5:1. Бу нисбат хайвонларнинг туриға, ёшиға, маҳсулдорлигига ва уларнинг физиологик ҳолатига боғлиқ. Қон зардобидagi анорганик фосфорнинг камайиши, организмда фосфор алмашинуви бузилганлигидан далолат беради.

Методнинг моҳияти шундан иборатки, қон зардобидagi анорганик фосфор билан молибдат кислотаси, молибдат кислотасининг фосфорли комплексларини ҳосил қилади, бу маҳсулот реакция натижасида қайтарилганда кўк рангни ҳосил қилади. Ранг ҳосил бўлиши тезлиги текшири- лаётган объектдagi фосфорнинг миқдорига боғлиқ.

Қайтарувчи сифатида эйконоген, гидрохинон, аскорбин кислотаси ва бошқаларни ишлатиш мумкин.

Керакли асбоблар: пробиркалари билан штатив; 1, 2, 5 ва 10 мл ли пипеткалар; фильтр қоғози; воронка; 25 мл ли Кьелдал колбаси; сув ҳаммоми; фотоколориметр ёки спектрофотометр.

Реактивлар. 1.Трихлорацетат кислотасининг 20 % ли эритмаси. 2.Аммоний молибдатнинг 2,5% ли эритмаси, 5 н сульфат кислотанинг эритмасида тайёрланади. 3. KN_2PO_4 нинг стандарт эритмаси, 1 мл эритмасида 0,04 мг фосфор сақлайди. Эритмани тайёрлаш: 0,1757 г KN_2PO_4 ни дистилланган сувда эритилади ва умумий ҳажми 1 л га етказилади. 4. Концентрланган сульфат кислота. 5. Пергидрол.

Ишнинг бориши. 1. Куруқ тоза пробиркага 2 мл (қон зардоби; 6 мл дистилланган сув ва 2 мл 20% ли трихлорсирка кислотасидан солинади ва яхшилаб аралаштирилади.

2. 5-10 минутдан кейин фильтр қоғози орқали филтрланади. Тиник филтрат аорганик фосфорни аниқлаш учун ишлатилади.

3. 5 мл филтратдан олиб пробиркага солинади, 1 мл аммоний молибдат ва 0,5 мл аскорбин кислотасидан солинади, сўнгра пробиркадаги солинган моддаларнинг ҳажми сув билан 10 мл га етказилади ва 5 минут 37° даги сув ҳаммомига қўйилади.

4. 30 минутдан кейин спектрофотометрда 750 нм тўлқин узунлигида кўрилади.

Умумий фосфорни аниқлаш. Микрокьелдал колбасига 0,05 мл қон олиб 0,2 мл 5 н сульфат кислотасидан қўйилади ва тўлиқ рангсизлангунча минерализация қилинади. Фосфор микдорини аниқлаш юқорида ёзилган шароитда олиб борилади.

Кислотада эрувчи фосфорни аниқлаш. 0,25-0,5 мл трихлорсирка кислотали филтратдан олиб, юқорида аорганик фосфорни аниқлаш учун тайёрланганидан микрокьелдал колбасига солиб минерализация қилинади, юқорида ёзилган аорганик фосфорни аниқлаш методи билан фосфор аниқланади.

Фосфор микдорини ҳисоблаш учун калибрланган график тузилади. Бунинг учун KN_2PO_4 нинг асосий стандарт эритмаси тайёрланади, бу эритманинг 1 мл таркибида 0,04 мг фосфор сақлайди. Олтита пробирка олиб, пробиркаларга қуйида жадвалда кўрсатилган реактивлардан қўйилади.

Реактивлар	Пробирка номери					
Фосфорнинг стандарт эритмаси, мл	1	2	3	4	5	6
Дистилланган сув, мл	2,95	2,9	2,8	2,7	2,6	3
Молибдат реактиви, мл	1	1	1	1	1	1
Аскорбин кислота, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

30 минутдан кейин спектрофотометрда 750 нм тўлқин узунлигида кўрилади.

График чизиш учун ординат ўқига оптик зичлик катталиги, абсцисс ўқига эса фосфор миқдори мг ҳисобида кўрсатилади. Анализ қилинаётган 1 мл қон зардобидagi фосфорнинг миқдорини топиш учун қуйидаги формуладан фойдаланилади:

$$X = \frac{C \cdot 100}{V}$$

Бу ерда:

X - анорганик фосфорнинг миқдори (мг %);

C - калибрланган графикдан топилган фосфорнинг миқдори (мг);

100 - натижаларни мг % да ҳисоблаш учун коэффициент;

V - филтрат таркибидagi қон зардобининг, ҳажми.

Қон зардобидagi умумий фосфорнинг миқдорига қараб умумий фосфолипидларни аниқлаш

Методнинг принципи. Трихлорацетат кислота таъсирида қон оксидлари билан биргаликда фосфолипидлар чўкмага тушади. Ҳосил бўлган чўкмадаги фосфорнинг миқдори спектрофотометрик метод билан аниқланади.

Реактивлар. 1.Трихлорацетат кислотасининг 10% ли эритмаси. 2.Перхлорат кислотасининг 57% ли эритмаси. 3. Аммоний молибдатнинг 4% ли эритмаси. 4. Аминонафтолсульфон кислотасининг асосий эритмаси (эйконоген эритмаси), 30 г натрий бисульфит ёки натрий метабисульфит, 6 г натрий сульфит ва 0,5 г эйконогендан тайёрланади. Натрий бисульфит 100-150 мл дистилланган сувда эритилади, сўнг эритмага эйконоген қўшилади. Эйконоген шиша таёқча билан аралаштирилиб эритилади, озроқ ҳажмда сув олиб, натрий сульфит эритилади. Кейин иккала реактив аралаштирилади ва ҳажми 250 мл га (сув солиб етказилади). 2-3 соатдан кейин филтрланади ва эритмани қоронғи идишга солиб, совуқхонада сақланади. Ишлатишдан олдин асосий эритмани 1:2,5 марта суюлтирилади. 5. Асосий стандарт эритмани тайёрлаш. Бу эритмани тайёрлаш учун KH_2PO_4 дан 4,39 г олиб, 1 л дистилланган сувда эритилади. Бу эритманинг 1 мл таркибида 1 мг фосфор сақлайди.

Ишлатиш учун шу стандарт эритма 100 марта суюлтирилади, бу 1 мл эритма таркибида 0,01 мг фосфор сақлайди. Шу эритмадан стандарт эритмалар (намуналар) тайёрланади.

Керакли асбоблар: 1000 ва 250 мл ли колбалар; 1,2,10 мл ли пипеткалар; қумли ҳаммом; шиша таёқча, филтр қоғози, воронка; спектрофотометр.

Ишнинг бориши. Тажриба намунасини тайёрлаш.

Пробиркага 0,2 мл қон зардобы солинади ва унга 2,8 мл дистилланган сув қўшилади. Сўнгра 3 мл 10% ли трихлорсирка кислота эритмасидан қўшиб чайқатилади, 5 минутдан кейин минутига 2500 айлана тезликда

Фермент билан субстрат турли ҳароратда инкубация қилинади. Ацетилхолиннинг ферментатив гидролизланиши инкубацион аралашма ҳосил қилган рангга қараб аниқланади.

Кўпгина ҳайвон тўқималаридан ажратиб олинган ферментлар учун энг мақбул ҳарорат 37-40° ҳисобланади. Ҳарорат пасайганда ферментатив катализ секинлашади, 0°С да эса реакция бормайди.

Керакли асбоблар: пробиркалари билан штатив; пипеткалар, сув ҳаммоми; муз ҳаммоми.

Реактивлар. 1. Ацетилхолиннинг 0,5% ли эритмаси, қон зардобин-холинэстераза ферменти манбаи. 1:50 марта суюлтирилган бромтимол кўкнинг 0,2 % ли эритмаси (2,5 г бромтимол индикатори 4,5 мл 0,1 н натрий ишқори эритилади, ҳосил бўлган эритма 50 мл ли қолбага солинади ва унга 12,5 мл 0,1 н бор кислотасининг эритмасидан қўшилади, сўнгра эритма ҳажми 0,1 М КСl эритмаси билан қолбанинг белгисигача етказилади. Ишлатишдан олдин эритма 2,5 марта суюлтирилади).

Ишининг бориши. Учта пробирка олинади, ҳар бирига 2,5 мл қон зардобин ва 0,5 мл бромтимол кўк индикаторидан солинади. Биринчи пробирка 40°С ли сув ҳаммомига, иккинчисини – хона ҳароратидаги сув ҳаммомига, учинчисини музли ҳаммомга қўйилади. 10 минутдан кейин ҳамма пробиркаларга 0,5 мл ацетилхолин эритмасидан солиб суюқликлар аралаштирилади ва яна ўша ҳароратларда сақланади. 10-15 минутдан кейин пробиркаларда ҳосил бўлган ранглар белгиланади ва ферментатив ҳароратга боғлиқ эканлиги аниқланади.

XII БОБ. СУТ

Сут - тиниқ бўлмаган суяқлик бўлиб, мазаси ширинроқ ва кучсизроқ ўзига хос хидга эга. Сутнинг ранги маълум даражада унинг таркибидаги А провитаминнинг микдорига боғлиқ бўлиб, каротин унга сарикроқ тус беради.

Сут - сут плазмасидан ва ёғдан иборат. Қуйидаги турли ҳайвонлар сутининг таркиби келтирилган (%):

Ҳайвонлар	Сув	Оқсил	Ёғлар	Лактоза	Минерал моддалар
Сигир	87,3	3,4	3,6	5,0	0,7
Эчки	87,0	3,7	4,0	4,5	0,9
Қўй	84,0	5,1	6,1	4,2	1,0
Чўчка	82,0	6,1	6,4	4,0	1,1
Ит	77,0	9,7	9,3	3,1	0,9
Қуён	70,0	15,5	1,9	2,9	
Қийик	66,0	14-20	17,0	2,8	1,5

Сутнинг таркибида асосан қуйидаги оқсиллар бор: казеиноген, лактоальбуминлар, лактоглобулинлар, липопротеинлар, ферментлар ва бошқалар. Энг муҳим сут оқсилларига - казеиноген киради. Фосфат кислота оқсил таркибидаги оксиаминокислоталар - серин ва треонин қолдиғи билан боғланади. Казеиноген тўлиқ қийматли оқсил бўлиб, яъни таркибида ҳамма аминокислоталар йиғиндиси бор. Таркибида етарли микдорда кальций ва фосфор борлиги учун организмда яхши хазм бўлади. Бошқа сут оқсиллари ҳам биологик тўлиқ қийматлидир. Улар қайнатишганда кагуляцияга учрамайди. Казеиноген - сут ачиганда денатурацияга учрайди, унинг изоэлектрик нуқтаси (ИЭТ)-4,7. Сут рН липидларнинг асосий қисми - триглицеридлардир. Ёғлар сутда эмульсия ҳолатда учрайди. Сут таркибидаги углеводларнинг 99,9% ни лактоза ва 0,1% глюкоза ташкил қилади. Лактоза (1,4 - галактозидоглюкоза) - дисахарид ва сут безлари учун хосдир. Организмда лактоза кальций, магний, фосфорнинг хазм бўлишида ва В гуруҳдаги витаминларнинг синтезида иштирок этади.

Сутнинг таркибида каротин ва А витаминларга бой, шунингдек яна С, Д, В₁, В₂, В₃, В₆ витаминлар ҳам учрайди. Сутнинг таркибида ферментлар (амилаза, каталаза, ксантиноксидаза, дегидраза ва бошқалар); пигментлар (ксантофилл, каротин, лактооксидаза, дегидраза ва бошқалар); гормонлар (пролактин, окситоцин ва бошқалар) ҳамда иммуномоддалар бор.

Сутнинг таркибида минерал моддалардан кальций - 140 мг%, фосфор - 80-100 мг%, калий - 140 мг% ҳамда камроқ нисбатда темир учрайди. Сутнинг таркиби ҳайвонларнинг индивидуал хусусиятларига, зотиға, лактация даврининг вақтиға ва озиқанинғ характериға боғлиқдир. Организмнинг физиологик ва патологик ҳолати ҳам сутнинг микдорига ва таркибига таъсир қилади.

Сутнинг сифатий реакциялари

1. Казеинни чўктириш ва ажратиб олиш. Сутга кислоталар (масалан, сирка, сут, хлорид) ёки аммоний сульфатнинг, натрий хлориднинг тўйинган эритмаларини таъсир эттириб, казеин ажратиб олиш мумкин. Казеин сувда эрмайди, ишқорий эритмаларда тез эриб кетади. Сутдан казеинни ажратиб олинганда унинг зардоби қолади. Сут зардоби таркибида лактоальбуминлар ва лактоглобулинлар, лактоза ва минерал тузлар бор. Ёғлар ҳам казеин чўкмаси билан биргаликда чўқади.

Керакли асбоблар: колбалар; стаканлар; цилиндр 100 мл ли пипетка; шиша таёқча; фильтр қоғоз, воронка.

Реактивлар. 1. Сирка кислотасининг 0,1% ли эритмаси, 2. Натрий ишқорининг 1% ли эритмаси. 3. Натрий гидрокарбонатининг 5% ли эритмаси. 4. Сут.

Ишнинг бориши. Стакандаги 20-30 мл сут унга нисбатан 3-4 хажмдаги кўп сув билан суюлтирилиб яхшилаб аралаштирилади ва унга томчилаб сирка кислотанинг 0,1% ли эритмасидан то казеиннинг оқ чўкмаси ҳосил бўлиши тамом бўлгунча қўшилади, ёғлар ҳам казеин билан биргаликда чўқади. Кислота керакли миқдорда қўшилади, чунки ортиқча кислотада казеин яхши эрийди. Чўкма филтрлангач 2-3 марта дистилланган сув билан ювилади. Чўкма ва филтрат кейинги ишлар учун ишлатишга олиб қўйилади.

Чўкманинг озгина қисмига (казеин, ёғ) натрий гидроксидининг эритмасидан ёки натрий гидрокарбонатидан таъсир эттирилса казеин эрийди, ёғ эса муаллақ ҳолатда қолади. Суюқлик ҳўл филтр қоғоз орқали филтрланади. Ёғ филтр қоғозда қолади. Филтрат билан оксил учун реакциялар бажариб кўрилади (рангли ва чўктириш реакциялари).

2. Лактоальбуминлар ва лактоглобулинларни ажратиб олиш.

Керакли асбоблар: 50 мл ли колба; пробиркалари билан штатив; филтр қоғоз; воронка.

Реактивлар. 1. Филтрат. 2. Натрий хлориднинг тўйинган эритмаси.

Ишнинг бориши. Казеиннинг сирка кислотаси таъсирида чўктириб олинган филтратидан олиб, натрий хлориднинг тўйинган эритмаси билан аралаштирилади (1:1) ва қайнатилади. Натажада лактоальбуминлар ва лактоглобулинлар чўкмага тушади ва филтрланади. Чўкма ювилгач дистилланган сувда эритилади. Ҳосил бўлган эритма билан оксиллар учун рангли реакциялар қилиб кўрилади.

3. Казеин миқдорини аниқлаш.

Керакли асбоблар: 50 мл ли колба; термометри билан сув ҳаммоми; бюретка.

Реактивлар. 1. Натрий салицилатнинг 5 % ли сувдаги эритмаси.

2. Фенолфталеиннинг 2% ли эритмаси. 3. Натрий гидроксидининг 0,02 н эритмаси.

$$X = \frac{a \cdot 0,1}{4,1}$$

4. Сут оксилларига оғир металл тузларнинг таъсири.

Реактивлар. 1.Кўрғошин ацетатининг 0,5% ли эритмаси. 2.Мис сульфатининг 5% ли эритмаси. 3.Сут.

Сут шакарининг сифат реакциялари

$$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} + \text{I}_2 + 2\text{NaOH} \rightarrow \text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12} + 2\text{NaI} + \text{H}_2\text{O}$$

Лактоза Лактон кислотаси

Реактивлар: 1. Сут. 2. Мис сульфатнинг 7% ли эритмаси. 3. Натрий гидроксиднинг 2% ли эритмаси. 4. Натрий фторитнинг 5% ли эритмаси. 5. Хлорид кислотанинг 5% ли эритмаси. 6. Натрий тиосульфатнинг 0,1 н эритмаси. 7. Крахмалнинг 5% ли эритмаси. 8. Йоднинг 0,1 н эритмаси.

20 мл филтратдан олиб, 100 мл ли колбаларга солинади ва 20 мл дан йоднинг эритмасидан қўшилади, сўнгга тўхтовсиз аралаштириб туриб

10 мл натрий ишкорининг эритмасидан томизилади. Иккала колба тикин билан беркитилгач, 20 минутдан кейин 10 мл хлорид кислотасининг эритмасидан, 5 томчи крахмал эритмасидан қўшилади ва натрий тиосульфатнинг эритмаси билан эритма рангсизлангунча титрланади. 1 мл 0,1 н натрий тиосульфатнинг эритмаси 18,01 мг лактоза тўғри келади.

Ҳисоблаш.

$$X = \frac{(a - b) \cdot K \cdot 18,01 \cdot 50 \cdot 100}{20 \cdot 5}$$

Бу ерда: X-100 мл сутдаги лактозанинг миқдори, мг, %.

a - контрол намунани титрлаш учун сарф бўлган натрий тиосульфат эритмасининг ҳажми, мл;

b - тажриба намунасини титрлаш учун сарф бўлган натрий тиосульфат эритмасининг миқдори, мл;

K - 0,1 н натрий тиосульфат эритмаси титрини тузатиш коэффициент.

Сигир сутида ўртача лактозанинг миқдори 4,6%.

Сутдаги С витамини миқдорини аниқлаш

Керакли асбоблар: 50 ва 100 мл ли колбалар; пипеткалар; бюретка.

Реактивлар. 1. Хлорид кислотасининг 2% ли эритмаси. 2. 0,001 н 2,6 -дихлорфенолиндофенолнинг эритмаси. 3. Сут.

Ишнинг бориши. 10 мл сутга уч ҳажм дистилланган сув қўшиб суюлтирилади. 50-100 мл колбага 1 мл хлорид кислота эритмасидан ва 5 мл суюлтирилган сут солинади, сўнгра ҳажми сув билан 15 мл га етказилади. Контрол намуна учун колбага 1 мл хлорид кислотасининг эритмаси ва 14 мл сув солинади. Колбалардаги суюқликлар чайқатилади, сўнгра 2,6 - дихлорфенолиндофенол эритмаси билан оч пушти ранг ҳосил бўлгунча титрланади. Контрол намунани титрлаш учун кетган 2,6 - дихлорфенолиндофенолнинг миқдоридан тажриба намунасини титрлаш учун кетган миқдорини айириб ташлаб, 2,6 - дихлорфенолиндофенолнинг миқдори аниқланади. Ҳисоблаш:

$$X = \frac{b \cdot K \cdot C \cdot 0,088 \cdot 100}{5}$$

Бу ерда: X - сутдаги С витаминининг миқдори, мг %,

b- 2,6 - дихлорфенолиндофенол эритмаси титрини тўғрилаш коэффициенти;

C - сутнинг суюлтириш даражасини ифодаловчи сон;

0,088 – аскорбин кислотасининг сони (мг), яъни бу сон 1 мл титрлаш учун сарф бўлган 0,001 н. 2,6 - дихлорфенолиндофенолнинг эритмасига тўғри келади;

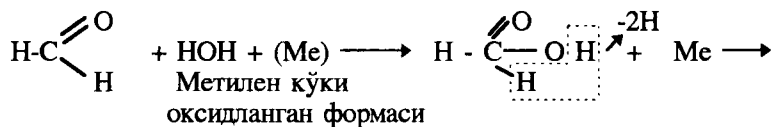
5 - титрлаш учун олинган сутнинг миқдори, мл;

100 - мг % да ҳисоблаш учун.

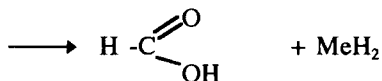
Сутнинг ферментлари

Сутнинг таркибида жуда кўп ферментлар бўлиб, улар сутга сут безлари ва микрофлоралар орқали келади. Турли ҳайвонлар сутининг таркибида гидролаза (амилаза, липаза, фосфотаза, лактаза ва бошқалар), оксидоредуктаза (пероксидаза, анаэробли дегидрогеназалар, каталаза ва бошқалар) ферментлари бор.

Альдегиддегидрогеназа ферментини аниқлаш. Сутга қўшилган метилен кўки эритмасининг рангсизланишидан альдегиддегидрогеназа ферменти борлигини билиш мумкин. Бу фермент таъсирида метилен кўкининг қайтарилган рангсиз лейкоформасига айланади:



Формальдегид



Чумоли кислотаси Қайтарилган формаси
рангсиз

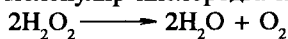
Сутга альдегиддегидрогеназа сут безлари орқали жуда оз миқдорда киради. Сутда микрофлоралар кўпайганда фермент ҳам кўплаб йиғилади.

Керакли асбоблар: пробиркалари билан штатив; сув ҳаммоми, термометр; пипеткалар.

Реактивлар: 1. Формальдегиднинг 0,5 % ли эритмаси. 2. Метелин кўкининг эритмаси (0,001 % ли). 3. Сут.

Ишнинг бориши. Битта пробиркага 2-3 мл қайнатилган сут (контроль), бошқасига 2-3 мл янги соғилган сутдан (тажриба) солинади. Иккала пробиркага 1 мл дан формальдегид эритмасидан ва 1 мл метилен кўки эритмасидан солиб 70° ли сув ҳаммомига қўйилади – реакциянинг бориши кузатилади. Янги сут солинган пробиркадаги аралашма рангсизланади, қайнатилган сут солинган пробиркадаги аралашма эса рангсизланмайди, чунки қайнатилган сутда бу фермент ўз активлигини йўқотади.

Каталаза ферментини аниқлаш. Каталаза ферменти таъсирида пергидрол сувга ва молекуляр кислородга парчаланadi:



Сутга пергидрол қўшилса кислород ажралиб чиқади, бу каталаза ферменти борлигидан далолат беради.

Керакли асбоблар: пробиркалари бклан штатив; пипеткалар.

Реактивлар. 1. Сут. 2. Пергидролнинг 1% ли эритмаси.

Ишнинг бориши. Битта пробиркага 2-3 мл сут ва шунча микдорда пергидролнинг 1%ли эритмасидан солинади. Каталаза таъсирида кислород пуфакчалари ажралиб чиқади. Иккинчи пробиркага 2-3 мл қайнатилган сут ҳамда 2-3 мл пергидрол эритмасидан солинади. Қайнатилган сутда фермент юқори ҳарорат таъсирида денатурацияга учраган, шунинг учун бу пробиркада ферментатив реакция бормаиди.

Сут таркибидаги кальций микдорини аниқлаш

Сутдаги умумий минерал моддаларнинг тахминан 1/6 қисмини кальцийли бирикмалар ташкил қилади. Хайвонлар сутида кальцийнинг ўртача микдори қуйидагича: ситирларда 140 мг%; эчкиларда 142 мг, отларда 83 мг %.

Сут - кальций ва фосфорга бой бўлган овқат ҳисобланади. Сутдаги 78% кальций анорганик тузлар ҳолатида, 22% кальций казеин оқсили билан бириккан ҳолатда учрайди.

Сутдаги кальцийнинг микдори -Ваард методи билан аниқлашга асосланган.

Керакли асбоблар: пробиркалари билан штатив; пипеткалар; центрифуга; сув ҳаммоми; 20, 25 мл ли цилиндрлар.

Реактивлар. 1. Сут - 10 марта суюлтирилган, 25 мл ли цилиндрга 1 мл сут ва 9 мл сув қўшиб аралаштирилади. 2. Оксалат кислотасининг 4% ли эритмаси. 3. Аммиакнинг 2% ли эритмаси. 4. Сульфат кислотасининг 1 н эритмаси. 6. Калий перманганатнинг (KMnO_4) 0,01 н эритмаси.

Ишнинг бориши. Битта центрифуга пробиркасига 1 мл суюлтирилган сут, иккинчи пробиркага 1 мл сув солинади, сўнг иккала пробиркага 0,5 мл аммоний оксалатнинг эритмасидан қўшиб аралаштирилади ва 30 минутга қолдирилади. Кейин эса 10-15 минут центрифуга (2500 айл/мин) қилинади. Фильтрат тўкиб юборилгач иккала пробиркадаги чўкмага 4 мл дан аммиакнинг 2% ли эритмасидан солинади ва яна 8-10 минут центрифуга қилинади. Кальций оксалат чўкмаси ишқорий шароитда эримайди, минерал кислоталарда эса яхши эрийди. Иккала пробиркага 1 мл дан сульфат кислотасининг 1 н эритмасидан солинади ва шиша таёқча билан яхшилаб аралаштирилади. Сўнгга пробиркалар (таёқлари билан) 3-4 минут қайнатилган сув ҳаммомига қўйилади. Иссиқ эритмаларни 0,01 н KMnO_4 эритмаси билан пушти ранг ҳосил бўлгунча титрланади.

Сутдаги кальций микдори (мг %) қуйидаги формула билан ҳисобланади:

$$X = \frac{0,2 \cdot (O - K) \cdot 100}{0,1}$$

Бу ерда: 0 - тажриба намунасини титрлаш учун сарф бўлган 0,01н KMnO_4 эритмасининг микдори;

К-Контрол намунани титрлаш учун сарф бўлган $0,01 \text{ KMnO}_4$ эритмасининг миқдори;

0,2 - кальций миқдорини, яъни 1 мл $0,01 \text{ н KMnO}_4$ эритмасига тўғри келади, мг;

100- мг % ҳисоблаш учун;

0,1- суюлтирилган сутнинг таркибидаги сутнинг миқдори, мл.

Сутнинг кислоталилигини аниқлаш

Сутнинг кислоталилигини аниқлаш уни айниб қолмаслигини билишда катта амалий аҳамиятга эга. Сут узоқ муддат сақланганда ачийди ва натижада сут кислотаси йиғилади. Сутнинг кислоталилиги градусларда ифодаланади. 100 мл текшириладиган сутни нейтраллаш учун сарф бўлган $0,1 \text{ н}$ ишқорнинг мл даги миқдори 1° га тўғри келади. Янги сигир сути $15-18^\circ$, туриб қолган сут - $20-22^\circ$, қайнатилганда ивиб қолган сут - $24-27^\circ$ га эга.

Керакли асбоблар: 50-100 мл ли колбалар; пипеткалар; бюретка.

Реактивлар. 1. Натрий гидроксидининг $0,1 \text{ н}$ эритмаси. 2. $0,1\%$ ли фенолфталеиннинг спиртдаги эритмаси. 3. Сут.

Ишнинг бориши. Колбага 10 мл текшириладиган сут, 20 мл дистилланган сув ва 2-3 томчи фенолфталеиннинг эритмасидан солинади, сўнгра колба чайқатилади ҳамда $0,1 \text{ н}$ натрий гидроксидининг эритмаси билан пушти ранг ҳосил бўлгунча титрланади.

Ҳисоблаш: титрлаш учун сарф бўлган ишқор миқдори 10 га кўпайтирилади (100 мл да ҳисоблаш учун). Бу сон сутнинг кислоталилигини градусда кўрсатади.

ХIII БОБ. МУСКУЛ ТЎҚИМАСИ

Мускул тўқимаси - гўштнинг муҳим компоненти ҳисобланиб учга бўлинади: таргил чизикли, силлиқ ёки чизиксиз ва юрак мускули. Мускуллар масалан, қон айланишида, нафас олишда, томирлардаги тонусларни бир хилда ушлаб туриш ва бошқа жараёнларда жуда муҳим физиологик функцияларни бажаради. Мускул таркиби куйидагича тузилади (% ҳисобида): сув -72-82; оқсиллар 16,5-20,9; липидлар (липидларнинг миқдори ўзгариб туради, чунки бу нарсга емишга боғлиқ); азотли моддалар (тахминан 1 % АТФ, АДФ, АМФ, инозит кислота-эркин аминокислоталар, креатин, креатинин, фосфокреатинин, карнозин, ансерин ва бошқалар), азотсиз моддалар (ликоген - 0,3-0,4; глюкоза, гликолиз маҳсулотлари, гликогенолиз ва трикарбон кислоталар цикли), витаминлар макро ва микроэлементлар (- 1, -1,5).

Оқсиллар - мускул тўқимасининг энг муҳим таркибий қисмларидан бири бўлиб, улар саркоплазматик, миофибриллар ва строма оқсилларига бўлинади. Саркоплазматик оқсилларга миогенлар, миоальбуминлар, миоглобулинлар ва миоглобинлар киради. Миогенлар -оқсилларни, яъни мускул оқсилларининг 30% ини ташкил этади. Миогенлар иккига бўлинади: А ва Б миогенлар. А миогенлар альдолаза ферментининг таркибига киради, Б миогенлар каталитик таъсир қила олмайди.

Миоглобулинлар сувда эримайди, тузли эритмалар билан ажратиб олинади. Улар хромопротеинларга кириб, оқсил ва гемдан ташкил топган. Молекуляр оғирлиги 17000. Миоглобин, гемоглобинга ўхшаб, молекуляр кислородни боғлаб олиш ва бериш хусусиятига эга.

Миофибриллар оқсилларга миозин, актин тропомиозин ва тропонин киради. Оқсиллар мускулларни қисқаришида иштирок этиб ҳамма оқсилларнинг 50 % ини ташкил қилади. Миозин - АТФ ни парчалаш хусусиятига эга. У актин билан бирикади ва қисқарувчи комплекс -актиомиозинни қисқариши химиявий энергия ҳисобига содир бўлиб, бунда магний иони иштирокида миозин таъсирида АТФ парчаланиб АДФ ва анорганик фосфат кислотани ҳосил қилади.

Актин оқсили сувда эрийди, миозин билан комплекс ҳосил қилади ва ҳамма оқсилларнинг 15% ини ташкил қилади. Строма оқсиллари мускул оқсилларининг 10% ини ташкил қилади, сувда ва тузли эритмаларда эримайди. Бу гуруҳ оқсилларига коллаген ва эластинлар киради. Майдаланган мускулни экстракция қилинганда оқсилсиз моддалар осон сувли эритмага ўтади.

Мускул тўқимасининг таркибида турли хил ферментлар: масалан, катепсинлар, липазалар, оксидоредуктазалар бор.

Миозинни ажратиш

Миозин (актимиозин) - мускул оксиди бўлиб, мускул тўқимасидан тузли эритмалар ёрдамида экстракция қилинади. Ҳосил бўлган экстрактлар сув билан суюлтириб ёки диализ қилиб, чўкмага туширилади. Миозин мускул оксидларининг 55% ини ташкил этади. Бу оксиднинг изоэлектрик нуқтаси рН 5,5 да намоён бўлади.

Керакли асбоблар: муз ҳаммоми; қайчи; 1000 мл ли колбалар; центрифуга; дока.

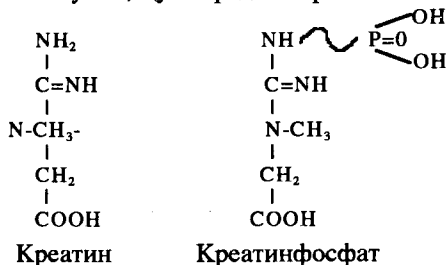
Реактивлар. 1. 0,15 М фосфат буфери, 0,3 М КСІ эритмасида тайёрланади рН 6,5. 2. 0° С гача совитилган дистилланган сув.

Ишнинг бориши. Янги сўйилган ҳайвон мускули тўқимасидан олиб майдаланади. Бу жараён -2°С да олиб борилади. 100 г майдаланган мускулга 300 мл 0,15 М фосфат буферининг 0,3 М КСІ даги эритмасидан солиб экстракция қилинади. Экстракция - 1°С да 10 минут давомида аралаштириб олиб борилади. Сўнгра аралашмага хона ҳароратидаги сувдан қўшиб, ҳажми 1000 мл га етказилади ва дока орқали филтрланади. Сўнгра филтратни мешалка билан актомиозин чўкмаси ҳосил бўлгунча аралаштириб туриш (бир-икки соат) лозим. Чўкма центрифуга қилиниб, ажратиб олинади. Шундан кейин суюқликка 0°С совитилган 1500 мл дистилланган сув 10 минут давомида аралаштириб қўшилади-да 0°С да 2 соат қолдирилади. Сўнгги жараёнда миозиннинг чўкмаси центрифуга қилиниб миозин ажратиб олинади ва унинг изоэлектрик нуқтаси аниқланади.

Мускул тўқимасида креатин ва креатинфосфатни аниқлаш

Креатин - кўндаланг тарғил мускулнинг муҳим таркибий қисми ҳисобланади. Скелет мускуллариининг таркибида креатиннинг микдори 400-500 мг %, юрак мускулида креатин 2-3 марта кам бўлади. Мия тўқимасида тахминан 100 мг %, паренхиматоз органларда 10-50 мг % миқдорда креатин бор.

Мускул тўқимасида креатин эркин ҳолатда ва фосфорли ҳосилалари (креатинфосфат, фосфокреатин) ҳолатида учрайди. Креатин-фосфат макроэргик бирикма бўлиб, хужайрада энергия манбаи ҳисобланади.



Мускулларнинг қисқариши доимо энергия ҳисобига содир бўлади, яъни АТФ ҳисобига - АТФ ни регенерацияси креатинфосфатдаги энергияга бой гуруҳни фермент креатинкиназа иштирокида кўчирилиши ҳисобига боради. Мускулдаги креатинфосфатнинг миқдори 30-70 мг %,

креатинкиназа

Креатин + АДФ $\longrightarrow$ креатин + АТФ бўлади. Мускул тўқимасидаги эркин креатин ва креатинфосфатнинг миқдори тўқиманинг физиологик ҳолатига боғлиқ.

Креатинни аниқлаш. Эркин ҳолатдаги креатинни аниқлаш оксилсиз эритмада, диацетил билан α - нафтол иштирокида рангли реакция натижасида аниқланади.

Керакли асбоблар: пробиркалари билан штатив, муз ҳаммоми, центрифуга; термостат.

Реактивлар. 1. HClO_4 - 0,5 М эритмаси, 2. КОН - 2 М эритмаси. 3. Диацетилнинг 0,05 % ли эритмаси; бу реактивни тайёрлаш учун 1,6 г диметилглиоксим олиб, 200 мл сульфат кислотасининг 5 н эритмасидан кўшиб, қолба қумли ҳаммомда қиздирилади. Тўлиқ эригандан кейин суюқлик 100 мл ли қолбага солинади ва ҳажми дистилланган сув билан 100 мл га етказилади. 1% ли диацетил эритмаси музхонада сақланади, ишлатишдан олдин сув билан суюлтирилади.

Оксилсиз экстрактни (олиш) тайёрлаш. Фосфорли бирикмаларни аниқлаш 0-4°C олиб борилади. 1-2 г мускул тўқимасидан олиб, суюқ азотда музлатилади. Сўнгра ҳовончада эзилиб, 200-300 мг қолбага солинади. Олдиндан совутилган HClO_4 0,5 М эритмаси билан ҳажми 10 мл га етказилади, яхшилаб аралаштирилгач, оксилларни чўктириш учун центрифуга қилинади. 7-8 мл оксилсиз эритмадан олиб, 2 М КОН эритмаси билан нейтралланади (нейтраллаш учун кетган КОН миқдори ҳисобига олинади). Кейин эритма совутилиб, чўкмага тушган KClO_4 филтрлаб ажратилади. Бу филтратни креатин ва креатинфосфатни аниқлаш учун ишлатиш мумкин.

Ишнинг бориши. Креатин миқдорини аниқлаш учун калибрланган график тузилади. Бунинг учун бир неча пробиркалар олиб, 0,1-0,5 мкмол креатинни бор стандарт эритмадан 1 мл дан солинади: 1 мл дан 1% α -нафтолнинг ишқордаги эритмасидан ва 0,5 мл 0,05 % ли диацетил эритмасидан солинади. Намуналарнинг ҳажми дистилланган сув билан 5 мл га етказилади, сўнгра яхшилаб аралаштирилади ва 30 минут хона ҳароратида қоронғи жойда қолдирилади. Кейин спектрофотометрда 540 нм тўлқин узунлигида оптик зичлиги ўлчанади. Олинган натижалардан график чизилади.

Текширилаётган намуналардаги креатинни аниқлаш учун ҳам юқорида ёзилган тартибдагидек иш олиб борилади. Намунанинг оптик зичлиги белгилангандан сўнг, графикдан қанча миқдорда креатин борлиги аниқланади.

Креатинфосфатни креатинга қараб аниқлаш

Креатинфосфатни аниқлаш шунга асосланганки, у аммоний молибдатнинг кислотадаги эритмаси таъсирида анорганик фосфат кислота ва креатинга парчаланadi. Ишқорий муҳитда пикрин кислотаси билан ҳосил қилган рангнинг оптик зичлиги спектрофотометрда ўлчаб аниқланади.

Реактивлар. 1. 1,4% ли аммоний молибдатнинг 2 н сульфат кислота-сидаги эритмаси. 2. 0,7 % ли аммоний молибдатнинг 1 н сульфат кислота-сидаги эритмаси. 3. Натрий ишқорининг 2 н эритмаси. 4. Пикрин кислота-сининг тўйинган эритмаси. 5. Креатиннинг стандарт эритмаси (бу эритма-нинг 1 мл да 5 мкмол креатин бор). 6. Универсал индикатор.

Ишнинг бориши. Нейтралланган оксилсиз эритмадан 1-2 мл олиб пробиркага солинади ва тенг ҳажмда 1,4 % ли аммоний молибдатнинг 2 н сульфат кислотасидаги эритмасидан қўшилади. Пробирка чайқатилгач, 40 минут 37°C ҳароратда термостатда қолдирилади. Шундан кейин фильтр-ланади, фильтратдан 1,5-3 мл олиб, 2 н натрий ишқорининг эритмаси билан нейтралланади. Эритмага 0,15 мл 2 н натрий ишқорининг эритма-сидан ва 0,25 мл пикрин кислотасининг тўйинган эритмасидан қўшиб, ҳажми дистилланган сув билан 5 мл га етказилади. Энди уни аралаштириш ва 10-15 минут ранг ҳосил бўлиши учун қолдириш керак. Шундан сўнг спектрофотометрда 540 нм тўлқин узунлигида оптик зичлиги ўлчанади. Намунанинг оптик зичлигига қараб, калибрланган графикдан қанча миқ-дорда креатин борлигини аниқлаш мумкин. Калибрланган гарфик тузиш учун эса пробиркаларга 1 мл дан 0,1-0,5 мкмол креатиннинг стандарт эритмасидан солиб, юқорида ёзилган шароитда иш олиб борилади.

Мускулдаги креатинфосфатнинг (X мг %) концентрацияси қуйидаги формула билан ҳисобланади:

$$X = \frac{a \cdot 10 \cdot 100}{2 \cdot C}$$

Бу ерда: *a* - калибрланган графикдан топилган тажриба намунаси-даги креатин миқдори, мг;

10- тўқима гомогенатининг ҳажми;

100 - фоизда ҳисоблаш коэффиценти;

2 – аниқлаш учун олинган фильтратнинг ҳажми;

C - мускул тўқимасининг оғирлиги, мг.

Мускул тўқимасида аденозинтрифосфатазининг активлигини аниқлаш

Mg²⁺ АТФаза ферменти АТФ нинг гидролитик парчаланишини катализлайди ва бу реакция натижасида энергия ажралиб чиқади:



Бу ферментнинг активлиги тўқималарда сарфланган АТФ нинг миқдорини кўрсатади.

Методнинг принципи. Ферментатив реакциянинг активлиги, АТФаза таъсирида АТФнинг парчаланишидан ҳосил бўлган неорганик фосфат кислотанинг миқдорига қараб аниқланади.

Керакли асбоблар: гомогенизатор, аналитик тарози, қайчи 1 ва 2 мл ли пипеткалар, пробиркалари билан штатив, воронкалар, фильтр қоғоз, термостат, спектрофотометр; центрифуга.

Реактивлар. 1. Мускул тўқимаси. 2. 0,25 М сахарозанинг трис-НСІ эритмаси (рН-7,4). 3. Трихлорсирка кислотасининг 20% ли эритмаси. 4. Инкубацион аралашма: Трис-НСІ (рН-7,5.) -0,2 М, КСІ- 0,05 М, NaCl -0,58 М, ЭДТА - 0,01 М, MgCl₂- 0,02 М, АТФ -0,02 М. 5. Буфер аралашма, рН - 4 - бу буфер аралашма: 0,2 М сирка кислотаси ва 0,4 М СН₃COONa· 3Н₂O эритмасидан тайёрланади. 6. Аммоний молибдатнинг 1 % ли эритмаси. 7. 1 %ли аскорбин кислотасининг 1 М мис сульфатдаги эритмаси.

Ишнинг бориши. 100 мг мускул тўқимаси майдаланади ва 5 мл 0,025 М сахарозанинг Трис - НСІ (рН-7,4) эритмаси билан гомогенизация қилинади. Ҳосил бўлган гомогенат дока орқали филтрланади. Иккита пробиркага 2 мл дан гомогенат солинади. Биринчи пробирка контрол намунаси ҳисобланиб, унга 1 мл 20% ли трихлорсирка кислота эритмасидан қўшилади. Шундан кейин иккала пробиркага 2 мл дан инкубацион аралашмадан қўшилади ва 30 минут 37°С термостатга - инкубацияга қўйилади. Инкубация даври тугагач, тажриба намунасига 1 мл 20 % ли сирка кислотасининг эритмасидан қўшилади. Сўнгра пробиркалардаги суюқликнинг ҳажми 0, 25 М сахарозанинг эритмаси билан 10 мл га етказилади ҳамда 10 минут 2500 айл/минут тезликда центрифуга қилинади. Чўкма тўкиб юборилади, суюқлик қисми билан эса рангли реакция олиб борилади.

Бунинг учун 1 мл центрифугатдан олиб, унга 2 мл аммоний молибдат эритмаси, 1 мл аскорбин кислотасининг мис сульфатдаги эритмаси ва 6 мл ацетат буферидан қўшилади. Эритмалар аралаштирилгач, 30 минутга қолдирилади. Шундан кейин ҳосил бўлган рангнинг интенсивлиги спектрофотометрда 750 нм тўлқин узунлигида ўлчанади.

АТФаза ферментининг активлиги микромоль миқдори билан белгиланади ва бу 1 г тўқима таркибидаги фермент 1 минутда қанча АТФ ни парчалай олишини кўрсатади. АТФаза ферментининг активлиги қуйидагича ҳисобланади (мкмоль/Р_i/г/мин).

$$E = \frac{(a - b) \cdot 5}{0,031 \cdot C \cdot 30}$$

Бу ерда: *a* - тажриба намунасидаги фосфорнинг миқдори (бу миқдор калибрланган графикдаи топилади), мг;

b- контрол намунасидаги фосфорнинг миқдори (бу миқдор ҳам калибрланган графикдан топилади), мг;

0,031-Р_i нинг микдори (мг) бўлиб, бу бир мкмоль АТФ ни АТФаза таъсирида парчаланишидан ҳосил бўлади,

5 - гомогенатнинг ҳажми, мл;

С – тўқиманинг оғирлиги, г;

30 - инкубация вақти.

Калибрланган графикни тузиш. Бунинг учун стандарт эритма тайёрланади, бу эритманинг 1 мл да 0,025 мг фосфор бор. Шу эритмадан фосфорнинг турли концентрацияси тайёрланади: 0,0123 мг; 0,025 мг, 0,0373 мг, 0,050 мг; 0,0623 мг; 0,0746 мг; 0,0869 мг, 0,0982 мг; 1,105 мг.

Бунинг учун пробиркаларга 0,5, 1,0; 1,5, 2,0; 2,5; 3,0, 3,5; 4,0; 4,5 мл стандарт эритмалардан солинади. Сўнгра юқорида ёзилган рангли реакция бажариб кўрилади ва 30 минутдан кейин оптик зичлиги спектрофотометрда 750 нм тўлқин узунлигида ўлчанади. Сўнгра натижалардан калибрланган график тузилади. Шу графикдан тажриба ва контрол намуналардаги фосфорнинг микдори топилади.

XIV БОБ. БИОЛОГИК ОБЪЕКТЛАРДА ФОСФОРНИ АНИҚЛАШ

Ўсимликлар таркибида турли-туман фосфорли бирикмалари учраб, улар асосан анорганик ва органик фосфордан иборат бўлади. Анорганик фосфатлар ўсимлик тўқималари ва ҳужайраларида буферлик вазифасини бажариш билан қаторда, ўсимликлар томонидан ўзлаштирилаётган ва уни танаси бўйлаб ҳаракат қиладиган асосий транспорт шакли ҳамдир. Шу билан бирга улар органик фосфатларни ҳосил қилувчи манба ҳам ҳисобланади.

Органик фосфор кислотада эрувчи ва кислотада эримайдиган икки хил шаклда учрайди. Кислотада эрувчи фосфорли бирикмаларга нуклеотидлар, шакарларнинг фосфорли эфирлари: кислотада эримайдиган фосфор бирикмаларга эса фосфолипидлар, нуклеин кислоталар ва бошқалар киради. Фосфорли бирикмаларнинг ҳар бирини алоҳида-алоҳида ёки уларнинг умумий миқдорини аниқлаш мумкин.

Умумий фосфорни колориметрик усулда аниқлашда бир қатор бирикмалардан; эйкеноген, амидол, аскорбат кислота ва бошқалардан фойдаланиш мумкин.

Ишнинг бориши. Куруқ ўсимлик материалидан 50-200 мг тортиб олинади ва кичик ҳажмли Кьелдал колбасида қуйдирилади. Бунинг учун колбага 2-3 мл концентрланган сульфат кислота қуйилади ва 1-2 минут давомида яхшилаб аралаштирилади. Сўнгра 0,2-0,3 мл водород пероксиди қўшиб аста-секин қиздирилади. Агар колбадаги суюқлик тез қиздирилса, фосфор қисман йўқолиши мумкин. Эритма жигар ранг тус олгандан сўнг яна 2-5 томчи водород пероксиди қўшиб, қиздириш давом эттирилади. Колбадаги суюқлик рангсизланиши билан реакция тўхтатилади. Шундан сўнг яна бир марта 15-20 минут давомида қаттиқ қиздирилади. Колбадаги суюқлик рангининг ўзгармаслиги, реакциясининг тамом бўлганидан дарак беради. Сўнгра колба совитилиб, ундаги суюқлик чекланган 100 мл ли колбага қуйилади ва дистилланган сув билан чизикчага тўлдирилади. Аралашмадаги умумий фосфор колориметрик усулда аниқланади.

Реактивлар: ўсимлик материали, сульфат кислотанинг концентрланган эритмаси, водород пероксиди.

Фосфор миқдорини эйконоген ёрдамида аниқлаш

Бу усул Фиске ва Суббароу томонидан таклиф қилинган бўлиб, фосфат кислотанинг нордон муҳитда молибдат аммоний иштирокида фосфомолибдат аммоний ҳосил қилишга асосланган. Бу комплекс бирикма эйконоген билан бирга кўк ранг ҳосил қиладди. Рангни интенсивлиги фосфор кислота миқдорига пропорционалдир.

Ишнинг бориши. Юқоридаги усул билан тайёрланган аралашмадан 1 мл олиб биринчи пробиркага солинади. Нейтраллаш учун 2 томчи

фенолфталеин қўшиб, ўювчи натрийнинг 20% ли эритмасидан пушти ранг ҳосил бўлгунча солинади. Сўнгра ортикча ишқор 1 н сульфат кислота билан ранг йўқолгунча нейтралланади. Пробиркадаги суюқликнинг ҳажми 3,5 мл га етгунча дистилланган сув қўйилади. Иккинчи (контрол) пробиркага эса 3,5 мл дистилланган сув қўйилади. Ҳар иккала пробиркага молибдат аммонийнинг 2,5 н сульфат кислотадаги 1,25% ли эритмасидан 1,25 мл, эйконоген эритмасидан 0,25 мл қўшилади ва яхшилаб аралаштирилади. Хона ҳароратида 30 минут қолдирилади. Реакция натижасида ҳосил бўлган эритма ранги ФЭК да ўлчанади. Фосфор микдори калибровка чизиғи бўйича аниқланади.

Реактивлар: фенолфталеиннинг 1%ли эритмаси, сульфат кислотанинг 1 н эритмаси, молибдат аммонийнинг 2,5 н сульфат кислотадаги 1,25%ли эритмаси. Эйконоген эритмаси. 15 г натрий гидросульфити ва 0,5 г натрий сульфит 70 мл дистилланган сувда эритилади ва филтрланади. Совитилгандан сўнг филтрланиб, сув билан 100 мл га етказилади. Эйконоген (1,2,4-амино-нафтолсульфонат кислота).

Фосфор микдорини аскорбат кислота ёрдамида аниқлаш

Фосфорни аскорбат кислота ёрдамида аниқлаш Скулачев томонидан таклиф қилинган бўлиб, жуда оз микдордаги фосфорни аниқлашга имкон беради. Бу усул айниқса анорганик фосфор билан бирга лабил органик фосфор бирикмалари бўлган материалларни текширишда муҳим аҳамиятга эга. Чунки бу усул шароитида лабил органик бирикмалар анча турғун бўлади.

Ишнинг бориши. Юқоридаги усулда тайёрланган аралашмадан 0,1 мл олиб, В реактивидан 1,4 мл қўшилади, аралаштириб 20 минут 45°C да инкубацияга қўйилади. Вакт тугагач, пробирка совитилади ва ФЭК да (қизил ёруғликдаги филтрда) ўлчанади. Контрол пробиркага текшириляётган аралашма ўрнига 0,1 мл сув олинади. Фосфор микдори калибровка чизиғи бўйича аниқланади.

Реактивлар: А реактиви, аскорбат кислотанинг 10% ли эритмаси. Б реактиви, молибдат аммонийнинг 1 н сульфат кислотадаги 0,42% ли эритмаси.

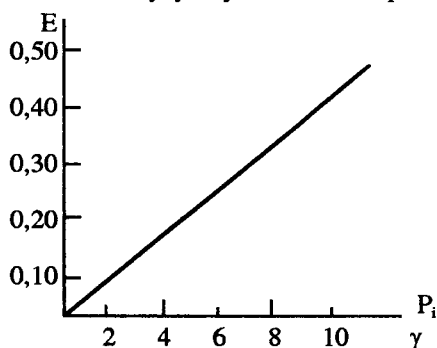
В реактиви ҳар вақт янгитдан тайёрланиши керак. Калий дигидрофосфат тузи.

Калибровка чизиғини тузиш. Текшириляётган материалдаги фосфорни аниқлаш учун аввало калибровка чизиғи тузилади. Бунинг учун фосфор концентрацияси маълум бўлган стандарт эритмалардан фойдаланилади.

Стандарт эритма кристалланган калий дигидрофосфат тузидан тайёрланади. Асосий эритмани тайёрлаш учун KN_2PO_4 тузидан 0,1756 г тортиб олинади ва 1 л сувда эритилади. Асосий эритмадан 25 мл олиб

яна 1 л ли ўлчов колбага қуйилади ва чизигигача дистилланган сув билан тўлдирилади. Шу йўл билан тайёрланган эритманинг 1 мл да 0,0001 мг фосфор бўлади. 5 та пробиркага 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 мл дан тайёрланган стандарт эритма солинади, улардаги фосфор концентрацияси 0,00002 ; 0,00006 ; 0,00008 ; 0,0001 мг га тўғри келади. Пробиркалар ўювчи натрий билан фенолфталеин бўйича нейтралланади ва юқоридаги усулларнинг қайси бири билан ишланса ўша усул реактивлари ишлатилади. Сўнгра 30 минутга хона ҳароратида қолдирилиб ФЭК да оптик зичлиги аниқланади. Одатда 5 мм ли ёки 10 мм ли кюветалардан фойдаланилади. Калибровка чизигини чизганда абсцисса ўқиға фосфор миқдори, ординатаға эса эритма рангининг интенсивлиги (экстинкцияси) тушилади.

Фосфорни аниқлаш учун тузилган калибровка чизиги.



Фосфорли бирикмаларнинг айрим фракцияларини аниқлаш

Ўсимликлар таркибидаги турли-туман фосфорли бирикмаларни фракцияларга ажратиш усуллари хилма-хилдир. Лекин уларнинг ҳаммаси ҳам бир принципга, фосфорли бирикмаларнинг турли хил эритувчилар ёрдамида кетма-кет ажратиш, уларнинг айрим гуруҳларини гидролизлаш ва фосфат миқдорини юқорида кўрсатган усулларнинг бир-бири билан аниқлашдан иборатдир.

Кислотада эрийдиган фосфорни ажратиш

Бу гуруҳга кирувчи фосфорни совуқ шароитда 0, +2 °C да олиб борилади. Яхшилаб майдаланган ва бир хил масса ҳосил бўлгунча эзилган ўсимлик материални (2 г янги узилган барг, 0,5 - 1 г уруғ) ҳажми 50 мл бўлган центрифуга пробиркасига қуйилади ва унинг устига совитилган хлорат кислотанинг 5% ли эритмасидан 15 мл қўшилади. Пробирка пўкак билан маҳкам беркитилиб, музли идишга қуйилади ва 20 минут давомида махсус тебратувчи асбоб ёрдамида чайқатилади. Сўнгра центри-

фугада минутига 4000-5000 тезлик билан 10 минут давомида центрифугаланади. Суюқлик ҳажми 50 мл ли колбага қуйилади, чўкма эса яна совитилган хлорат кислотанинг 5% ли эритмаси билан аралаштирилиб, юқоридаги жараён яна такрорланади ва суюқлик 50 мл ли колбага қуйилади. Бу жараён яна бир марта такрорланиб, колбадаги кислотали суюқликнинг умумий ҳажми дистилланган сув билан 50 мл ли чизикча етказилади.

Шу йўл билан ажратиб олинган кислотада эрувчи фракцияда анорганик фосфорлар, осонлик билан гидролизланувчи фосфорли органик бирикмалар (карбоксилфосфатлар, лабил пирофосфатлар, аминоксфосфатлар, глюкоза - 1-фосфат) ва фосфат кислотанинг турғун эфирлари (инозитгексофосфатлар, гексоза - 6 - фосфат, триозафосфатлар ва бошқалар) киради. Олинган экстрактда кислотада эрувчи анорганик фосфор (экстракт қуйдирилмасдан) ва 10 минутли кислотали гидролиздан сўнг ажраладиган ва осонлик билан гидролизланувчи кислотада эрийдиган фосфор аниқланади.

Кислотада эрувчи умумий фосфорни аниқлаш

Ҳажми 50 мл ли Кьелдал колбасига 10 мл кислотали экстракт қуйиб, 3 мл концентрланган сульфат ва 2 мл 57% хлорат кислотада қўшиб қуйдирилади. Экстракт тўлиқ қуйиб бўлгач, ҳажми 25 мл чизикли колбага қуйилади ва дистилланган сув билан чизикча тўлдирилади. Ҳажми 10 мл ли пробирка ёки цилиндрга эритмадан 2 мл олиб нейтралланади ва юқоридаги усулларнинг бири ёрдамида фосфор аниқланади.

Фосфор микдори қуйидагича ҳисобланади. Янги узилган ўсимлик баргидан 2 г олинди. Экстрактнинг умумий ҳажми 50 мл. Қуйдириш учун 10 мл экстракт олинди. Экстрактнинг ҳажми 25 мл га етказилди. Бундан фосфорни аниқлаш учун 2 мл намуна олинади. Калибровка чизиги бўйича олинган намунада 0,010 мг фосфор аниқланади. Кислотада эрувчи умумий фосфор микдори қуйидагича топилади.

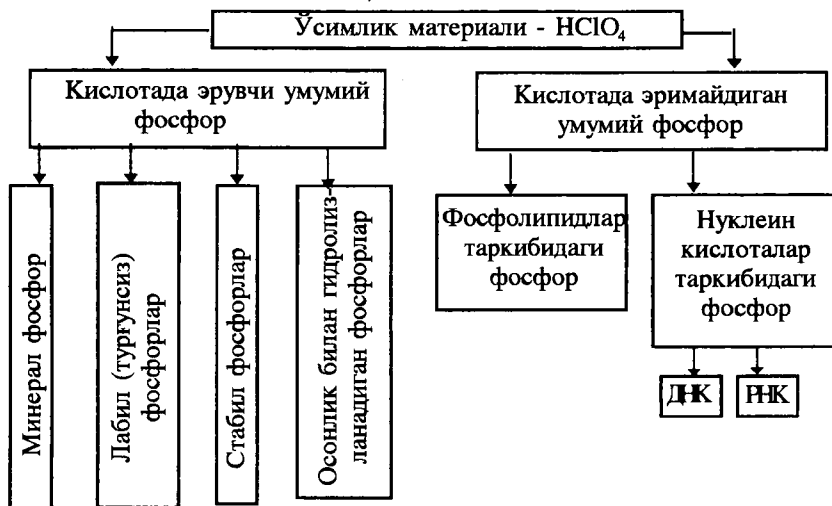
$$X = \frac{0,010 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{2 \cdot 10 \cdot 2} = 31,25 \text{ мг}$$

Демак, 100 г ҳўл баргда 31,25 мг кислотада эрувчи умумий фосфор мавжуд.

Кислотада эрувчи анорганик фосфорни аниқлаш

Асосий экстрактдан (анализ қилинаётган материални хлорат кислота билан ишлангандан сўнг) 5 мл олиб, ҳажми 10 мл ли ўлчов колбага қуйилади. Унинг устига фосфорни колориметрик усулда аниқлаш учун зарур бўлган реактивлардан қўшилади (фосфор микдорини аниқлаш методларига қаранг). Сўнгга фосфор микдори калибровка чизигига қараб аниқланади.

Фосфорли бирикмаларнинг айрим фракцияларини аниқлаш схемаси



Осонлик билан гидролизланувчи кислотада эрувчи анорганик фосфорни аниқлаш

Асосий экстрактдан 5 мл олиб, ҳажми 50 мл ли колбага қуйилади ва унинг устига хлорид кислотанинг 2 н эритмасидан 5 мл қўшилади. Колбани сув совитгич ўрнатилган пробка билан беркитилади ва қайнаб турган сув ҳаммомида 10 минут ушланади. Кейин колба совуқ сув ёрдамида тезда совитилади. Шу йўл билан тайёрланган гидролизатдан 5 мл олиб, ҳажми 10 мл ли ўлчов колбага қуйилади. Унинг устига фосфорни аниқлаш учун зарур бўлган реактивлардан қўшиб, колориметр ёрдамида фосфор аниқланади.

Осонлик билан гидролизланувчи фосфор билан анорганик фосфорнинг фарқи лабил фосфор миқдорига тенг бўлади. Лабил фосфорларга нуклеотид ва трифосфатлар, глюкоза 1-фосфат ва бошқа бирикмалар киради.

Умумий кислотада эрувчи фосфордан осонлик билан гидролизланувчи фосфор фарқи фосфорнинг тургун эфирлари (стабил фосфор) миқдорига тенг бўлади. Буларга триозафосфатлар, гексоза 6-фосфат, инозитгексофосфат (фитин) ва бошқалар киради.

Умумий кислотада эрувчи фосфор билан неорганик фосфор ўртасидаги фарқ кислотада эрувчи органик фосфор миқдорига тенгдир.

Фосфолипид фракциясини ажратиш

Кислотада эрувчи фосфорни ажратиб олгандан сўнг, центрифуга пробиркасида қолган чўкма 5-10 мл этил спиртининг 80% ли эритмаси билан ювилади, сўнгра кўп марта спирт эфир (3:1) аралашмаси билан 36-40 соат давомида экстракция қилинади. Сўнгра таркибида фосфорлипид тутувчи экстрактлар қолбага йиғилади. Унинг умумий ҳажми 35 мл га тенг бўлиши керак. Экстракт 10 минут давомида 3000 тезлик билан центрифугаланади. Эритма Кьелдал қолбасига қуйилади ва секинлик билан қиздирилиб эритувчилардан тозаланади. Қолбадаги қолдиққа 5 мл сульфат ва хлорат (3:2) кислота аралашмасидан қўшиб қуйдирилади. Қуйдириш эҳтиёткорлик билан бажарилиши керак, чунки дастлабки минутларда қолбадаги эритма кучли равишда кўпикланади. Қуйдириш тамом бўлгач, қолбадаги рангсиз суюқлик ҳажми 25 мл ли ўлчов қолбага қуйилади ва дистилланган сув билан чизикқача тўлдирилади. Ана шу эритмадан 2 мл олиб, керакли реактивлардан қўшилади ва фосфор микдори аниқланади.

Нуклеин кислота таркибидаги фосфорни аниқлаш

Кислотада эрувчи фосфор ва фосфорлипидларни ажратиб олгандан сўнг, пробиркада қолган чўкма 20 мл ўювчи натрийнинг 1 н эритмаси билан яхшилаб аралаштирилади ва 18 соат давомида 37° С да термостатда сақланади. Сўнгра 20 минут давомида 4000 тезлик билан центрифугаланади. Ишқорий эритмадан умумий фосфор аниқланади. Кейинги ишлар совуқ шароитда бажарилиши керак.

ДНК ни чўктириш учун центрифуга пробиркасига эритмадан 5мл қуйилади ва совитилади. Совитилган эритмага хлорид кислотанинг 6 н эритмасидан томчилаб рН 6,6-6,8 га етгунча қўшилади. Сўнгра ДНК ни чўктириш учун 5 мл хлорат кислотанинг 1 н эритмасидан (совитилган) қўшилади ва 3 соат давомида ДНК тўлиқ чўкмага тушгунча совуқхонада сақланади. Чўкмани 20 минут давомида 4000 тезлик билан центрифугалаб ДНК ажратилади. Эритмада РНК компонентлари қолади. Шу эритмадан умумий ва анорганик фосфор аниқланади.

Нуклеин кислоталарни экстракция қилиш

ДНК чўкмаси 10 мл хлорат кислотанинг 0,5 н эритмаси билан 100° С да 20 мин. давомида икки марта экстракция қилинади. Ҳар сафар эритма 10 мин. давомида 3000 тезлик билан центрифугаланиб ажратилади. Эритмалар қўшилиб ундаги умумий ва анорганик фосфор аниқланади. Ишқорий эритмадаги умумий фосфор (P_1) ва ДНК ни чўктиргандан кейин эритмадаги умумий фосфор (P_2) ни аниқлаш билан нуклеин кислота таркибидаги умумий фосфор (P_1-P_2) топилади.

Нуклеин кислоталарнинг ишкорий эритмасида ДНК ўзгармайди бироқ РНК қисман мононуклеотидларгача парчаланади. ДНКни чўктиргандан кейинги эритмадаги умумий фосфор (P_2) ва шу эритмадаги аорганик фосфор (P_3) ни аниқлаш билан РНК таркибидаги фосфор (P_2 - P_3) топилади.

ДНК таркибидаги фосфор эса ДНК компонентлари экстракция қилингандан кейин қолган эритмадаги умумий фосфор (P_2) билан шу эритмадаги аорганик фосфорнинг айирмасига (P_4 - P_5) тенг бўлади.

Реактивлар: $KClO_4$ нинг 5% ли ва 57% ли эритмаси сульфат кислотанинг концентрланган эритмаси, хлорид кислотанинг 2 н ва 6 н эритмаси, хлорат кислотанинг 0,5 н ва 1 н эритмаси, натрий гидроксидининг 1 н эритмаси, этил спиртнинг 80% ли ва 96% ли эритмаси, эфир.

ИЛОВА **Буфер эритмалар тайёрлаш**

Фосфат-цитрат буфери, pH 2,2 - 8,0.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, нисбий молекуляр массаси 178, 05, 0,2 М эритма тайёрлаш учун 35,61 г туз 1 л сувда эритилади.

Цитрат кислота H_2O , нисбий молекуляр массаси 210, 14, 0,1 М эритма тайёрлаш учун 21,018 г кислота 1 л сувда эритилади.

pH	0,2 М Na_2HPO_4 , мл	0,1 М цитрат кислота, мл	pH	0,2 М Na_2HPO_4 , мл	0,1 М цитрат кислота, мл
2,2	0,40	19,60	5,2	10,72	9,28
2,4	1,24	18,76	5,4	11,15	8,85
2,6	2,18	17,82	5,6	11,60	8,40
2,8	3,17	16,83	5,8	12,09	7,91
3,0	4,11	15,89	6,0	12,63	7,37
3,2	4,94	15,06	6,2	13,22	6,78
3,4	5,70	14,30	6,4	13,85	6,15
3,6	6,44	13,56	6,6	14,55	5,45
3,8	7,10	12,90	6,8	15,45	4,55
4,0	7,71	12,29	7,0	16,47	3,53
4,2	8,82	11,72	7,2	17,39	2,61
4,4	8,82	11,18	7,4	18,17	1,83
4,6	9,35	10,65	7,6	18,73	1,27
4,8	9,86	10,14	7,8	19,15	0,85
5,0	10,30	9,70	8,0	19,45	0,55

Борат буфери (0,2 М), pH 7,4-9,0.

Натрий тетраборат ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). Мол массаси - 381,43. 19,072 г натрий тетраборат тузи 1 л сувда эритилади. Борат кислота, молекуляр массаси 61,84⁰ 12,37 г борат кислота 1 л сувда эритилади.

pH	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,05 М, мл	Борат кислота 0,2 М, мл	pH	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,05 М, мл	Борат кислота 0,2 М, мл
7,4	1,0	9,0	8,2	3,5	6,5
7,6	1,5	8,5	8,4	4,5	5,5
7,8	2,0	8,0	8,7	6,0	4,0
8,0	3,0	7,0	9,0	8,0	2,0

Ацетат буфери (0,2 М), рН 3,6-5,8
Натрий ацетат, нисбий молекуляр массаси =136,09

рН	Натрий ацетат 0,2 М, мл	Ацетат кислота 0,2 М, мл	рН	Натрий ацетат 0,2 М, мл	Ацетат кислота 0,2 М, мл
3,6	0,75	7,25	4,8	5,90	4,10
3,8	1,20	8,80	5,0	7,00	3,00
4,0	1,80	8,20	5,2	7,90	2,10
4,2	2,65	7,35	5,4	8,60	1,40
4,4	3,70	6,30	5,6	9,10	0,90
4,6	4,90	5,10	5,8	9,40	0,60

Трис- буфери (0,05 М), рН 7,2-9,1.

Трис нисбий молекуляр массаси 121,14, эритма ҳажмини дистилланган сув билан 100 мл га етказилади.

рН		Трис 0,2 М, мл	Хлорид кислота, 0,1 М, мл	Н ₂ О, мл
23 °С	37 °С			
7,20	7,05	25	45,0	100мл гача
7,36	7,22	25	42,5	--,,--
7,54	7,40	25	40,0	--,,--
7,66	7,52	25	37,5	--,,--
7,77	7,63	25	35,0	--,,--
7,87	7,73	25	32,5	--,,--
7,96	7,82	25	30,0	--,,--
8,05	7,90	25	27,5	--,,--
8,14	8,00	25	25,0	--,,--
8,23	8,10	25	22,5	--,,--
8,32	8,18	25	20,0	--,,--
8,40	8,27	25	17,5	--,,--
8,50	8,37	25	15,0	--,,--
8,62	8,48	25	12,5	--,,--
8,74	8,60	25	10,0	--,,--
8,92	8,78	25	7,5	--,,--
9,10	8,95	25	5,0	--,,--

**Аминокислоталарнинг юпқа қаватли ва қоғоз
хроматографияси ёрдамида ажратиш коэффиценти**

Аминокислоталар	Турли хил эритмалардаги қиймати			
	1	2	3	4
Глицин	0,40	0,26	0,17	0,08
Аланин	0,59	0,38	0,24	0,13
Серин	0,31	0,27	0,16	0,08
Цестеин	-	0,07	0,08	0,02
Цестин	0,22	0,08	0,05	-
Метеонин	0,79	0,55	0,44	0,25
Треонин	0,49	0,35	0,17	0,13
Валин	0,79	0,60	0,45	0,24
Лейцин	0,82	0,73	0,61	0,41
Изолейцин	0,83	0,72	0,59	0,37
Аргинин	0,54	0,20	0,10	0,05
Лизин	0,46	0,14	0,08	0,03
Глутамат кислота	0,29	0,30	0,17	0,03
Аспартат кислота	0,13	0,24	0,16	0,02
Фенилаланин	0,84	0,68	0,53	0,34
Тирозин	0,58	0,45	0,24	0,24
Гистидин	0,66	0,20	0,10	0,13
Триптофан	0,75	0,50	0,43	0,17
Пролин	0,88	0,43	0,30	0,13

1 - Фенол сув (4 г:1)

2 - Н. Бутанол - ацетон кислота - сув (4:1:1).

3 - Н. Бутанол - ацетат кислота - сув (4:5:5).

4 - Н. Бутанол - этанол - сув (4:1:4).

Паст ҳарорат ҳосил қилувчи аралашмалар

Тузлар	Тузларнинг миқдори, г.	Қор ёки муз миқдори, г.	Максимал паст ҳарорат
MgSO ₄	23,4	100	- 3,9
NH ₄ Cl	30,0	100	- 15,8
NH ₄ NO ₃	45,0	100	-17,3
Na C	30,4	100	- 21,2
Na Cl	27,5	100	- 33,6
Ca Cl ₂	42,6	100	- 55,0
Na Cl	41,6		
MH ₄ NO ₃	41,6		
Na Cl	41,40,0	100	- 30
NH ₄ NO ₃	20,0		

Айрим элементларнинг атом оғирликлари

Элемент номи	Атом оғирлиги	Элемент номи	Атом оғирлиги
Азот	14,008	Мис	63,57
Алюминий	16,97	Молибден	95,95
Барий	137,36	Натрий	22,997
Бор	10,82	Олтингугурт	32,06
Бром	79,916	Платина	195,23
		Симоб	200,61
Висмут	209,0	Стронций	87,63
Водород	1,008	Темир	197,2
Вольфрам	183,92	Углерод	12,01
Йод	126,92	Фосфор	30,98
Кадмий	112,41	Хлор	35,457
		Хром	52,01
Калий	39,096	Цинк	65,38
Кальций	40,08	Кўрғошин	207,21
Кислород	16,00		
Кремний	28,06		
Кумуш	107,88		
Магний	24,32		
Марганец	54,93		

**1 л хал хил нормалликка эга буйлан титрланган эритмаларни тайрлаш учун сарфланадиган
моддаларнинг микдори**

Асосий бирикма	Мол массаси	Эквивалент массаси	1Н	0,5 Н	0,2 Н	0,1 Н	0,05 Н	0,02 Н	0,01 Н
H_2SO_4 (зичлиги 1,84)	98,08	49,04	28 мл	14мл	5,6 мл	2,8мл	1,4мл	0,56мл	0,28мл
HCl (зичлиги 1,19)	36,48	35,48	82 мл	41мл	16,4мл	8,2мл	4,1мл	1,64мл	0,82мл
HNO_3 (зичлиги 1,40)	63,02	63,02	67 мл	33,5мл	13,4мл	6,7мл	3,4мл	1,34мл	0,67мл
$H_2CO_3 \cdot 2H_2O$	126,07	63,04	-	-	-	6,3г	3,15г	1,26г	0,63г
$NaOH$	40,00	40,00	40,02	20,0г	8,0г	4,0г	2,0г	0,80г	0,40г
KOH	56,11	56,11	56,11	28,06г	11,2г	5,6г	2,8г	1,12г	0,56г
$Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$	3145	157,75г	78,88г	31,54	15,77г	7,88г	3,15г	1,58г	

Адабиётлар

1. Методы биохимических исследований. Под ред. Проф. М.И. Прохоровой. Л, ЛДУ нашриёти, 1982 й.
2. Шапиро Д.К. Практикум по биологической химии. "Высшая школа", 1976 г.
3. Мирҳамидова П. ва бошқалар. Ҳайвонлар биохимияси. Тошкент. "Меҳнат", 1990 й.
4. Филиппович. Ю. Б. Практикум по общей биохимии, М., "Просвещение" нашриёти, 1982.
5. Плешков Б. П. Практикум по биохимии растений, М., "Колос" нашриёти, 1985.
7. Зиқиряев А. Ўсимликлар биохимияси. Т. "Меҳнат", 1987.
8. Практикум по биохимии. Под ред. С.В.Северина; М: Изд. МГУ, 1989.
9. Новый методы практической биохимии. Под ред. Б.Л.Кретович. - М. "Наука" 1989.
10. Султанов Р. ва бошқалар. Биохимиядан амалий машғулот. Т. "Абу Али ибн Сино", 1995.
13. А. Зиқиряев, П.Мирҳамидова. Ўсимликлар биохимиясидан амалий машғулотлар. Тошкент, "Меҳнат", 2001 й.

МУНДАРИЖА

КИРИШ	3
I боб. Водород кўрсаткичи. Буфер эритмалар. Водород ионларининг концентрациясини аниқлаш методлари	4
Индикаторлар ёрдамида водород ионларининг концентрациясини аниқлаш	6
Универсал индикатор ёрдамида рН ини аниқлаш	7
Потенциометрик усул билан рН ини аниқлаш	8
II боб. Оксиллар	9
Оксил ва аминокислоталарга хос рангли реакциялар	9
Оксилларнинг физик-химиявий хусусиятлари	15
Оксилларни чўктириш реакциялари	15
Оксилларни юқори ҳаракат таъсирида чўкмага тушириш	20
Оксилларни диализ қилиш	21
Оксилларнинг изоэлектрик нуқтасини аниқлаш	21
Аминокислоталарни қоғоз хроматографияси ёрдамида ажратиш ...	23
III боб. Мураккаб оксиллар	25
Нуклеопроteinлар	25
Дезоксирибонуклеопроteinларни жигар ва талокдан ажратиб олиш	26
Нуклеопроteinларни ачитқидан ажратиб олиш ва уларни гидролизлаш	26
Хромопроteinлар	27
Оксигемоглобин кристалларини ажратиб олиш	29
Геминни олиш реакцияси	29
Геминни амидоприн билан аниқлаш	29
Гликопроteinлар	30
Сўлакдан муцинни ажратиб олиш	30
Фосфопротейнлар	31
Казеин таркибидаги фосфатни аниқлаш	32
Биологик объектлардан оксилларни ажратиб олиш	32
Ўсимликлардан умумий оксилларни ажратиб олиш	33
Оксилларни айрим фракцияларга ажратиш	34
Биологик объектларда оксил миқдорини аниқлаш методлари ва оксиллар алмашинуви	36
Оксил миқдорини азот бўйича аниқлаш	36
Қондаги қолдиқ азот миқдорини аниқлаш	38
Тўқималардаги оксиллар таркибига кирмаган азотни аниқлаш	39
Аминогуруҳлардаги азотни формальдегид билан титрлаб аниқлаш	40
Оксил миқдорини биурет методи бўйича аниқлаш	41
Оксил миқдорини микробиурет методи билан аниқлаш	42

Оқсил микдорини Лоури усули билан аниқлаш	43
Оқсилларни гидролизлаш ва уларнинг аминокислотали таркибини аниқлаш	45
Аминокислоталарни юпка қаватли хроматография усулида аниқлаш	45
Оқсиллар фракцияларини полиакриламид гелида электрофорез усули билан аниқлаш	47
IV боб. Липидлар	53
Ёғларнинг эриши ва эмульсия ҳосил қилиш	53
Ёғларни аниқлашда қўлланиладиган сифат реакциялари	54
Ёғ таркибидаги глицеринни аниқлаш (акролеин реакцияси)	54
Биологик объектлардан умумий липидларни ажратиш ва микдорини аниқлаш	58
Мой микдорини Сокслет усулида аниқлаш	59
Биологик объектларда липидларнинг фракция таркибини аниқлаш	59
Ўт кислоталарининг сифат реакцияси	60
Орган ва тўқималарда холестерин микдорини аниқлаш	61
Товуқ тухуми сариғидан лецитинни ажратиб олиш	63
Сийдикда ацетонли таначаларни аниқлаш	64
Сийдикда сирка ацетат кислотасини аниқлаш	65
Ёғларнинг пероксидли сонини аниқлаш	65
V боб. Углеводлар	67
Моносахаридлар	68
Моносахаридларнинг қайтарувчанлик хоссалари	68
Моносахаридларни аниқлашда қўлланиладиган реакциялар	69
Дисахаридлар	71
Дисахаридларнинг қайтарувчанлик хусусиятини текшириш	72
Полисахаридлар	73
Крахмалнинг йод билан реакцияси	73
Крахмални қайтарувчанлик хоссаларини аниқлаш	74
Қайтарувчанлик хусусиятига эга бўлган шакарларни Бертран усулида аниқлаш	74
Биологик суяқликларда глюкоза микдорини Хагедорн-Иенсен методи билан аниқлаш	77
Қайтарувчан шакарларни Бьерр усулида аниқлаш	79
Фруктозани аниқлаш	81
Сахароза микдорини аниқлаш	82
Крахмални аниқлаш	83
Крахмал микдорини Починка усулида аниқлаш	83
Клетчатка микдорини аниқлаш	85
Гликоген микдорини аниқлаш	85
Пироузум кислота микдорини аниқлаш	86
Гликолиз жараёнини аниқлаш	88

Тўқималардаги АТФ микдорини аниқлаш	91
VI боб. Нуклеин кислоталари	94
ДНКнинг сифат реакцияси	95
Хайвон тўқимасидаги нуклеин кислоталарининг умумий микдори- ни аниқлаш	96
VII боб. Ферментлар	97
Амилазанинг крахмалга таъсири	98
Сахараза ферментининг активлигини аниқлаш	99
Ферментларнинг термолабиллиги	99
Ферментларнинг активлигига муҳит рН нинг таъсири	101
Ферментларнинг ўзига хослиги	101
Ферментларнинг активлигига таъсир қилувчи моддалар (ингибитор- лар ва активаторлар)	102
Пероксидаза активлигини аниқлаш	103
Глутаматдегидрогеназа ферментининг активлигини аниқлаш	105
Липаза активлигига сафрони таъсири	106
Липаза ферментининг активлигини аниқлаш	107
Уреазани активлигини аниқлаш	107
Пепсин ферменти таъсирида оксилларнинг парчаланиши	108
Тирозиназа ферменти активлигини аниқлаш	109
Фосфотаза ферментининг активлигини аниқлаш	109
VIII боб. Витаминлар	111
А гуруҳ витаминлари	111
Умумий каротиноидларни аниқлаш	112
D гуруҳ витаминлари	113
D гуруҳ витаминларининг рангли реакциялари	113
E витамини (Токоферол)	114
E витаминининг рангли реакциялари	114
K витамини	116
K витаминининг сифат реакциялари	116
Сувда эрийдиган витаминлар	117
B ₁ витамини	117
B ₂ витамини	118
Рибофлавиннинг сифат реакциялари	119
B ₃ витамини	120
B ₃ витаминининг сифат реакциялари	120
C витамини	121
C витаминининг сифат реакциялари	122
Озиқ маҳсулотларида C витаминининг микдорини аниқлаш	124
Цитрини (P витамин) аниқлаш	126
IX боб. Органик кислоталар	127
Ўсимликларнинг умумий кислоталилигини аниқлаш	127
Цитрат кислотани аниқлаш	128
Цитрат кислота микдорини аниқлаш	129

Сукцинат кислотани аниқлаш	129
X боб. Гормонлар	131
Қалқонсимон без гормонида йодни очиш реакцияси	131
Буйрак усти безининг мия қавати гормонлари	132
Адреналиннинг сифат реакцияси	133
Буйрак усти безлари пўстлоқ қаватининг гормонлари	134
Кортизоннинг сифат реакциялари	135
Ошқозон ости беzi гормони-инсулин	135
XI боб. Қон	137
Қон зардобининг оксил фракцияларини аниқлаш	137
Қонда, сийдикда глюкоза миқдорининг ортотолуидин реактиви билан аниқлаш	139
Қон зардобидаги кальций миқдорини аниқлаш	140
Қон зардобидаги фосфор миқдорини аниқлаш	142
Қон зардобидаги умумий фосфорнинг миқдorigа қараб умумий фосфолипидларни аниқлаш	144
Холинэстераза ферментининг активлигини аниқлаш	145
XII боб. Сут	147
Сутнинг сифатий реакциялари	148
Сут шакарининг сифат реакциялари	149
Сутдаги С витамини миқдорини аниқлаш	150
Сутнинг ферментлари	151
Сут таркибидаги кальций миқдорини аниқлаш	152
Сутнинг кислоталигини аниқлаш	153
XIII боб. Мускул тўқимаси	154
Миозинни ажратиш	155
Мускул тўқимасидаги креатин ва креатинфосфатни аниқлаш	155
Креатинфосфатни креатинга қараб аниқлаш	157
Мускул тўқимасида аденозинтрифосфатазанинг активлигини аниқлаш	157
XIV боб. Биологик объектларда фосфорни аниқлаш	160
Фосфор миқдорини эйконоген ёрдамида аниқлаш	160
Фосфор миқдорини аскорбат кислота ёрдамида аниқлаш	161
Фосфорли бирикмаларнинг айрим фракцияларини аниқлаш	162
Кислотада эрийдиган фосфорни ажратиш	162
Кислотада эрувчи умумий фосфорни аниқлаш	163
Кислотада эрувчи аорганик фосфорни аниқлаш	163
Осонлик билан гидролизланувчи кислотада эрувчи фосфорни аниқлаш	164
Фосфолипид фракциясини ажратиш	165
Нуклеин кислота таркибидаги фосфорни аниқлаш	165
Нуклеин кислоталарни экстракция қилиш	165
Илова	167
Адабиётлар	172