

**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ ОЛИЙ ВА ЎРТА ТАЪЛИМ
ВАЗИРЛИГИ**

ТОШКЕНТ КИМЁ - ТЕХНОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ

**«ОЗИҚ-ОВҚАТ МАҲСУЛОТЛАРИ ТЕХНОЛОГИЯСИ»
ФАКУЛЬТЕТИ**

«БИОТЕХНОЛОГИЯ» КАФЕДРАСИ

**«БИОТЕХНОЛОГИК ИЗЛАНИШЛАРНИНГ
МЕТОДОЛОГИК АСОСЛАРИ»**

**ФАНИДАН АМАЛИЙ МАШҒУЛОТЛАР УЧУН ЎҚУВ-УСЛУБИЙ
ҚЎЛЛАНМА**

ТОШКЕНТ – 2017

доцентлар Д.Қ.Максумова, Ш.М.Маматов “Асосий биотехнологик тадқиқот методологияси” фанидан амалий машғулотлари учун услубий қўлланма. Тошкент,: ТКТИ, 2016. - 32 бет.

Аннотация: “**Битехнологик изланишларнинг методологик асослари**” фанидан амалий машғулотлар учун услубий қўлланма 5А320501-Биотехнология (озик-овқат, озуқа, кимёвий маҳсулотлар ва қишлоқ хўжалиги учун биопрепаратлар ишлаб чиқариш) мутахассислиги бўйича тахсил олаётган магистрантларга мўлжалланган.

Тақризчилар:

Ж.Э. Сафаров - Тошкент давлат техника университети, «Қишлоқ хўжалик техникаси ва сервиси», кафедраси мудири, т.ф.н.

А.Ж.Чориев - Тошкент кимё-технология институти , «Озиқ-овқат хавфсизлиги», кафедраси мудири, т.ф.н. доцент.

Ушбу маърузалар матни ТКТИ “Озиқ-овқат маҳсулотлари технологияси” факультети, “Биотехнология кафедраси” йиғилишида муҳокама қилинган ва факультет Илмий-услубий Кенгашида кўриб чиқиш учун тавсия этилган. Баённома № ____, “ ____ ” 2017 й.

Кафедра мудири,
доцент

Маматов Ш.М.

Ушбу маърузалар матни «Озиқ-овқат маҳсулотлари технологияси» факультети Илмий-услубий Кенгашида кўриб чиқилган ва чоп этиш учун тавсия этилган. Баённома № ____ “ ____ ” 2017йил

Факультет Илмий-услубий Кенгаш раиси,
доцент

Юнусов О.Қ.

Ушбу маърузалар матни ТКТИ Ўқув-услубий Кенгашида кўриб чиқилган ва чоп этиш учун тавсия этилган. Баённома № ____, “ ____ ” 2017йил

Институт Ўқув-услубий Кенгаш раиси,
доцент

Муталов Ш.А.

1-АМАЛИЙ МАШҒУЛОТ

БИОТЕХНОЛОГИЯДА ИЗЛАНИШЛАРНИНГ МОЛЕКУЛЯР-ГЕНЕТИК УСЛУБЛАРИНИ ҚЎЛЛАШ

Молекуляр-генетик тадқиқот усуллари XX асрнинг иккинчи ярмида биологик фанларнинг ютуғи бўлди. Улар ДНК нинг структурасини ўрганиш, турли организмлар ДНК сининг ўхшашлиги ва фарқини аниқлаш, ДНК структурасидаги зарарланган қисмларини аниқлаш ва хаттоки ДНК ёки РНК асосларининг кетма-кетлигини аниқлаш имкониятини беради.

Молекуляр-генетик тадқиқотлар – бу турли усуллар ва услублардир. Улар учун умумлаштирувчи нарса бу, биринчидан ўрганилаётган организм ДНК сини ажратиб олиш, ва иккинчидан ген-муҳандислиги технологияларини қўллаш. ДНК ни ажратиб олиш учун ядроси мавжуд исталган хужайрани олиш мумкин. Одамларда бу хужайралар – қон лейкоцитлари, оғиз шиллиқ қавати хужайралари (уларни олиш учун юзнинг ички қисмидан шпателни енгил юрғизиб олиш кифоя), ёки эмбрион геноми ўрганилади.

Молекуляр-генетик усулларнинг афзаллиги шундаки, уларни ўтказиш учун жуда кам миқдорда материал керак бўлади. Организм ДНК сини биргина тола соч, жуда кичик қон томчиси, жуда кичик тери ёки суяк бўлаги орқали ўрганиш мумкин.

Молекуляр-генетик таҳлилни ўтказиш учун ҳар доим фақатгина керакли ген тутган ДНК фрагменти қўлланилади. Бундай фрагментларни олиш учун махсус ферментлар – **рестриктазалар** (лотин. рестриксий-чеклаш) қўлланилади. Уларнинг ўзига хос хусусияти шундаки улар ДНК молекуласининг аниқ бир қисмидан кесади. Рестриктазаларнинг турли тўпламлари қўлланилади, ДНК дан жуда кичик фрагментларни кесиб олиш имкониятлари мавжуд.

Кейинги босқич – олинган ДНК фрагменти миқдорини кўпайтириш. Буни ДНК молекуласининг ўз-ўзини кўпайтира олиш қобилияти туфайли амалга ошириш мумкин. ДНК фрагментларини кўпайтириш амплификация (лотин. амплификацио-кучайтириш, кўпайтириш) деб аталади.

Тирик организмда амплификация – табиий ДНК репликация жараёнидир, лаборатория шароитида уни ўрнини махсус усул – **полимераза занжир реакция (ПЗР)** эгаллайди. Олинган ДНК тадқиқот материали ҳисобланади.

Замонавий молекуляр-генетик усуллар юқори аниқликда икки шахснинг қариндошлик алоқасини аниқлаш имконига эга, бундан ташқари агар биологик материаллари (соч, суюқ) мавжуд бўлса, ўлган одамларнинг ҳам қариндошлик алоқаларини аниқлаш мумкин. Усулнинг моҳияти оддий: турли одамлар ДНК сини маълум участкаларини солиштирилади, ушбу участкалардаги нуклеотидлар кетма-кетлигининг ўхшашлик даражаси аниқланади.

Молекуляр-генетик усулларнинг юқори даражада аниқлиги туфайли, бу усулни суд медицина экспертизасида қўлланилади, масалан “**генетик бармоқ излари**” усули. Жиноят жойида топилган минимал миқдордаги биологик материалдан (қон, сўлак, соч) ДНК ажратиб олинади ва фрагментларга парчаланadi. Ушбу фрагментларни махсус ташувчиларда ажратилади, ва чизиқлар жойлашуви расми олинади, буни генетик бармоқ излари дейилади. У ҳар бир инсондаиндивидуал бўлади, фақатгина эгизакларда мос келади. Ҳар бир одам нуклеотидлар кетма-кетлигига кўра, папилляр чизиқларга кўра ажралиб туради. “Генетик бармоқ излари” махсус базага киритилади ва ҳақиқий бармоқ излари каби гумонланувчининг “генетик бармоқ излари” билан солиштирилади. Бу усулни оталикни аниқлаш учун ҳам қўлланилади – ота-оналар ва болаларда излар маълум даражада ўхшаш бўлади.

Молекуляр-генетик усуллар ёрдамида халқ хўжалиги учун фойдали хусусиятларга эга генетик модификацияланган организмлар яратилади. Сўнгги вақтларда вакцинологияда “тескари вакциналогия” деб аталувчи усул кенг тарқалмоқда. Классик вакциналогияда тадқиқот объектлари микроорганизмлар-қўзғатувчилар ҳисобланиб, уларни инактивлаштирилган ёки вирулентлиги йўқотилган, шундан сўнг микроорганизм ёки унинг компоненти вакцинатсия учун қўлланилган.

Тескари вакциналогияда асосий тадқиқот объекти микроорганизмнинг *секвенирланган геноми* ҳисобланади, бунда компютер анализи орқали микроорганизмлар антигенларини кодловчи генларни қидириш (*ин силосо анализ*) амалга оширилади. Бу генлар э.солигеномига ёки бошқа оддий микроорганизмлар геномига клонлаштирилади, улар “клонлаштирилган” оқсиллар ишлаб чиқаришни бошлайди, уларни иммуногенлик хусусиятлари сичқонларни иммунизатсия қилиш орқали амалга оширилади. Енг кучли иммуноген пептидлар ваксина учун мос келади ва клиник синовларнинг кейинги босқичига ўтади. Ваксина яратишнинг ушбу усули, қуйидаги микроорганизмларга қарши классик усул самара бермаганлиги сабаб ишлаб чиқилган: менингококклар, стрептококклар (*Стрептосoccus пнеумониае*), хламидия (*Чламидопҳила пнеумониае*), стафиллакокклар, иерсинлар (*Ерсиниа пестис*), порфирормонадлар (*Поррҳйромонас гингивалис*), безгак плазмоди (*Пласмодиум фалсипарум*).

Молекуляр-генетик таҳлил учун материал. Таҳлил қилинаётган материал тури гумон қилинаётган касалликнинг симптомлари, патогенези, эпидемиологиясига боғлиқ бўлади. Молекуляр-генетик таҳлил учун ҳам, худди бактериологик таҳлилдаги каби материал қўлланилади:

- бемордан клиник биологик материал (қон, сўлак, йиринг, балғам, орқамия суюқлиги, ошқозон шарбати, сийдик, ахлат, тўқима ва органлар биоптатлари);

- ташқи муҳит объектларидан намуналар (озиқ-овқат маҳсулотлари, сув, тупроқ);

- микроорганизмларнинг тоза култураси.

Материал тури ДНК/РНК ажратиш учун қўлланиладиган усулга кўра танланади.

2-АМАЛИЙ МАШҒУЛОТ

ТАҲЛИЛЛАРНИНГ ХРОМАТОГРАФИК УСЛУБЛАРИ

Мақсад: Талабалар томонидан дори воситаларини таҳлил қилишни хроматографик усуллари.

Техника хавфсизлиги бўйича талаблар. Кимёвий лабораторияда хроматография қурилмаси билан ишлашда техника хавфсизлиги қоидаларини талабалар мустақил ўрганадилар. Талабларнинг техника хавфсизлиги қоидаларини билиши ўқитувчи томонидан махсус журналга қайд қилинади.

Талабаларга қўйилган талаб: оқ халат, қалпоқча, оёқ кийим, амалиётни ёзиб олиш учун дафтар.

Умумий назарий асослар:

Хроматография – ҳозирги кунда моддаларни ажратиш ва таҳлил қилишнинг энг истиқболли усулларида биридир. Усулнинг моҳияти таҳлил қилинаётган модданинг элюент оқимида сорбент ичидан турли тезликда ҳаракатланишига асосланади. Моддаларнинг ҳаракатланиш тезлиги ажратиладиган моддаларнинг икки фаза орасида турли тарқалганлиги ва улар билан турли таъсирлашувга эгаллиги билан боғлиқ. Натижада бошланғич аралашма қатламларга ажралади, ва уларни таҳлил қилиш имкони пайдо бўлади.

Газ хроматографияси учувчан ва термик чидамли моддаларни таҳлил қилиш учун қўлланилади; унинг афзалликлари: юқори ажратиш хусусиятига эга, таҳлил учун кам вақт сарфланади, юқори сезувчанликка эга, таҳлил қилинувчи намуна миқдори озлиги ва юқори аниқликка эга.

Газ хроматографияси ўзида бир неча мустақил тизимларни мужассамлаштиради: газ-ташувчи манбаси, газни тайёрлаш блоке, буғлатгич, колонкалар термостати, хроматография колонкалари, детектор, қайд қилиш ва маълумотларни қайта ишлаш тизими.

Ҳар бир бирикма ўзига хос колонкада тарқалиш коэффициентига эга, ва уни қўзғалмас ва қўзғалувчи фазадаги концентратсияси муносабати билан аниқланади.

Бирламчи сақлаш параметрларига қууйидагилар киради: сақлаш вақти, сақлаш ҳажми ва сақлаш масофаси.

Суюқлик хроматографиясида моддалар аралашмасини ажратиш каттик сорбент ичидан суюқлик шаклида ўтказиш орқали амалга оширилади.

Суюқлик хроматографиясининг асосий турлари: қоғозли, колонкали, юпка қатламли (ЙҚХ) ва юқори самарали суюқлик хроматографияси.

Енг истикболли усул бу – юқори самарали суюқлик хроматографияси ҳисобланади (ЙССХ), колонкали суюқлик хроматография тури бўлиб, қўзғалувчи фаза-элюент хроматографик колонкага киришда бериладиган босим туфайли катта тезликда сорбент билан тўлдирилган колонка ичидан ўтади.

ЙССХ учувчан бўлмаган, термолабил моддаларни, ҳам кичик ҳам катта молекуляр массага эга бўлган моддаларни ажратиш ва миқдорий ҳамда сифат таҳлилини ўтказиш учун қулай усул ҳисобланади.

ЙССХ қурилмаси газ хроматография тузилишига ўхшаш бўлиб, фақат газ баллон ўрнига суюқ элюентли резервуар, насос ва элюент оқимини доимий тезлигини таъминловчи насос ўрнатилган.

Масалаларни ечиш.

Масала №1

н-парафинларни сақлаш масофасига асосланиб, сорбирланмайдиган газни сақлаш масофасини аниқлаш:

№ т/р	Углеводород	Сақлаш масофаси л, мм
1	Пентан	18,4
2	Гексан	32,7
3	Гептан	67,5

4	Октан	152,9
---	-------	-------

Ечиш:

Агаручтакетма-кетгомолларнинг сақлаш масофаси аниқ бўлса, сорбирланмайдиган газни сақлаш масофаси нуқуйидаги тенгликдан аниқлаш мумкин:

$$L_0 = \frac{l_1 l_3 - l_2^2}{l_1 + l_3 - 2l_2}$$

Тенгликка C_5-C_7 ва C_6-C_8 н-парафинлар учун сақлаш масофаси қийматини қўйиб, мос равишда 8.4 ва 8.9 қийматларини оламиз.

Худди шундай тажриба орқали аниқланган метаннинг сақлаш масофаси – 8,6.

Расстояние удерживание метана, полученные при проведении того же эксперимента – 8,6.

Масала №2

Чўққилар кенглигининг сақлаш масофасига асосланиб колонка самарадорлигини аниқлаш (мм):

№ т/р	Сорбат	Сақлаш масофаси, л	Чўққи кенглиги, $\mu 0,5$
1	Бензол	82	7
2	Толуол	170	11
3	Нонан	386	16
4	Декан	661	23

Ечиш:

Колонка самарадорлиги назарий тарелкалар сонига асосланади:

$$n = 5.55 \left(\frac{l}{\mu_{0,5}} \right)^2$$

Тенгликка $\mu_{0,5}$ қийматларини қўйиб ҳисоблаб, мос равишда бензол, толуол, нонан ва декан қиймати аниқланади n – 762, 1320, 3530 ва 4590.

Масала №3

Пентан, гексан, гептанваоктанниаралашмаситаркибинианиқлаш (% да), агарушбууглеводородларнингчўққилариюзаси (мм^2), мосравишда – 3120, 6364, 4280 ва 7542 гатенгбўлса. Детектор – катарометр, газ-ташувчи – гелий.

Ечиш:

Чўққилар юзасини ички нормаллаштириш усулини қўллаганда, и-компонент концентратсияси қуйидаги формула орқали аниқланади:

$$c_n = \frac{K_n C_n}{\sum (K_n C_n)} 100$$

бунда

C_n – мос келувчи чўққи юзаси;

K_n – чўққи юзасини детекторни сезувчанлигини ҳисобга олган ҳолда тўғриловчи коэффициент бўлиб, уни тажриба ёрдамида ёки адабиёт малумотларидан аниқланади.

Агар аралашма табиатан бир-бирига яқин моддалардан ташкил топган бўлса, K_n 1 га тенг деб олинади.

Формулага C_n қийматини қўйиб, мос равишда пентан, гекса, гептан ва октан (% да) қиймати олинади – 14.6, 29.9, 20.1, 35.4.

3- АМАЛИЙ МАШҒУЛОТ ЙССХ – (ЮҚОРИ САМАРАЛИ СУЮҚЛИК ХРОМАТОГРАФИЯСИ) УСЛУБИ

Мақсад: Талабаларни юқорисамарали суюқлик хроматографияси билан, хроматографик терминлар, хроматографик таҳлилгатай ёрлаш, қўзғалувчи фаза, таҳлил ўтказиш шартлари билан таништириш.

Юқори самарали суюқлик хроматография тушунчаси (ЙССХ)

Хроматография (грекчадан – хроматос-ранг, бўёқ), аралашмаларни ажратиш ватаҳлил қилишнинг физик-кимёвий сулибўлиб, уларнинг компонентларининг 2 фаза – қўзғалмас ва қўзғалувчан (елюент) фазадатарқалишига асосланади.

Хроматография лабораторияларда васаноатда кенг қўлланилади, миқдорий ва сифат таҳлили, ишлаб чиқаришнинг назорат қилиш, айниқса кўпжараёнларни автоматлаштиришда, шунингдек индивидуал моддаларни препаратива ажратиш (масалан қимматбаҳо металлларни), камёб ватарқоқ моддаларни ажратишда қўлланилади.

Юқорисамарали суюқлик хроматографияси (ЙССХ), куйидаги моддаларни таҳлил қилиш, ажратиш ватазоллаш учун қўлланилади: синтетик полимерлар, доривоситалари, детергенлар, белков, гармонлар ва бошқалар, биологик муҳим бирикмалар. Юқорисезувчан детекторларни қўллаш жуда кам миқдордаги моддалар билан ишлашимконини беради (10^{-11} - 10^{-9} г), бу еса биологик ва экологик тадқиқотларда жуда муҳим саналади.

ЙССХ турли суюқлик хроматографларида амалга оширилади. Замонавий суюқлик хроматографлари мураккаб аралашмаларни алоҳида компонентларга ажратиш, уларни миқдорий ва сифат таҳлилинини ўтказишга мўлжалланган.

Барча суюқлик хроматографлари куйидаги асосий қисмлардан иборат:

- Елюент ва эритувчилар идишларини тайёрлаш бўлими;
- насос;
- намунакиритиш бўлими (инжектор);
- колонкалар термостати;
- хроматографик колонка;
- детектор;
- регистратор (интегратор ёки компьютер);
- элюатни тўқсиҳ ёки фраксиялар коллектори.

Хроматографнинг ишлаш принципи қуйидагича: намуна инжектор ёрдамида хроматографнинг юқори қисмига киритилади. Насос орқали таҳлил қилинаётган аралашма элюент билан хроматографик колонкадан ўтказилади, колонкада аралашманинг алоҳида компонентларга ажралади (компонентлар). Колонкадан чиқувчи элюат ўзида таҳлил қилинаётган аралашмани алоҳида компонентлари мавжуд бўлади, ва детектор томонидан аниқланади, ушбу кўрсаткичлар регистратор орқали қайд қилинади.

Елюент (қўзғалувчи фаза) эритувчи ёки эритувчилар аралашмаси бўлиб, таҳлил қилинаётган аралашмани хроматографик колонкадан ўтказиш учун қўлланилади.

Адсорбент (қўзғалмас фаза) – қаттиқ модда, эриган моддаларни ушлаб қолиш хусусиятига эга ва хроматографик колонкаларни тўлдириш учун қўлланилади.

Намуна– таҳлил қилинаётган аралашманинг хроматографга киритилувчи кичик миқдори.

Сорбат – намуна компоненти, индивидуал бирикма.

Колонкага юклаш – намунадаги модда миқдори. Хроматографка кўп миқдорда ёки консетрланган намуна киритилганда, ортиқча юкланиш ҳосил бўлиши мумкин, бунинг натижасида чўққи шакли ўзгариши ва кенгайиши мумкин. Амалиётда колонкани кам миқдордаги намуна билан юклаш тавсия этилади.

Элюат – хроматографик колонкадан чиқувчи эритма.

Хроматограмма–хроматографик жараёнлар натижасини график тасвири. Хроматограмма – эгри чизиқ бўлиб, элюатдаги таҳлил қилинаётган моддалар концентратсиясини вақтга боғлиқ ҳолда тасвирлайди.

Хроматографик шароитлар ўз ичига қўлланиладиган хроматограф тури ва маркаси, хроматографик колонкалар ўлчами ва унда ишлатиладиган адсорбент тури, элюент таркиби ва сарфи, элюирланиш тури (изократик ёки градиентли) ва градиент шакли, намуна хажми, детектор тури ва детексияланиш шартлари, атроф муҳит ҳарорати ёки колонкалар термостатини ўз ичига олади.

ЙССХ таҳлилида қўлланиладиган сорбентлар турлари

Сорбентларнинг асосий гуруҳлари қуйидагилар:

1. Юзаки – сорбент, эритмани ўтказмайдиган шишадан тайёрланган каттиқ ядро бўлиб, унинг юзасига юпқа қават ғовакли сорбент, одатда силикагел суртилади;
2. Силикагел асосида тайёрланган ғовакли сорбент;
3. Алюминий оксиди асосида тайёрланган ғовакли сорбент;
4. Полимер асосида тайёрланган ғовакли сорбент.

Биринчи гуруҳ сорбентлари тарихан биринчи ҳисобланиб, ЙССХ нинг тез ривожланишига сабаб бўлган. Улар 35-50 мкм ли шиша микрошарчалар бўлиб, уларнинг юзасига турли усулларда 1-2 мкм қалинликда силикагел ёки алюминий оксиди қотирилган. Бу қатлам адсорбсион хроматография усулида моддаларни ажратишга хизмат қилиши мумкин ёки унга қўзғалувчан фаза суртиб уни модификатсиялаш мумкин.

ЙССХ учун қўзғалувчи фаза

Суюқлик хроматографиясида қўзғалувчи фазанинг вазифаси турлича. Фақатгина транспортлик вазифасидан ташқари, айнан ажратиш жараёнида фаол иштирок этади ва моддаларни аниқланишига сезиларли таъсир

кўрсатади. Кўпинча кўзгалувчи фаза таркибига биро з ўзгартириш киритилса, ажратиш жараёнини оптиммаллаштириш, чўкқилар шаклини яхшилаш, алоҳида компонентларни ажратиш ва хатто ажратиш механизмини ҳам ўзгартириш мумкин. Шунинг учун эритувчини танлашда хроматографик тажриба ўтказишга у ёки бу даражада таъсир ўтказувчи барча хусусиятларини ҳисобга олиш лозим.

Эритувчиларга асосий талаблар

ЙССХ да қўлланиладиган эритувчилар қуйидаги талабларга жавоб бериши лозим: тозалик, кимёвий инертлик, детектор билан мослиги, ковушқоқлиги паст, таҳлил қилинаётган моддаларга нисбатан етарли даражада эритиш қобилиятига эга бўлиши, хавфизлик. Баъзи ҳолатларда уларнинг бошқа эритувчилар билан аралаша олиш қобилияти, қайнаш ҳарорати ва моддаларни элюатдан осон ажратиб олиш имконияти ҳам муҳим рол ўйнайди.

У ёки бу эритма билан ишлашда ҳавфсизлик уларнинг ёниши ва захарлилигига қараб белгиланади. ЙССХ да қўлланиладиган эритувчиларнинг деярли барчаси, паст ёниш ҳароратига эга ва захарлилиги аниқ даражада бўлади. Шу сабабли суюқлик хроматографияси ўтказиладиган хонада шамоллатиш тизими бўлиши лозим. Иш жойида ёмон шомолланадиган ва чуқур зоналар бўлмаслиги керак, бу зоналарда эритувчи буғлари тўпланиши мумкин. Кўп эритувчиларнинг портлаш даражаси 1-2 % ни ташкил қилади, шу сабабли чуқур зоналарда портловчи аралашма тўпланиши мумкин.

Барча ҳолатларда ёниш даражаси ва захарлилиги паст бўлган эритувчилардан фойдаланиш лозим, бунда мавжуд адабиётларда кўрсатилган маълумотлардан фойдаланиш мумкин. Шу тариқа, диетил эфирини диизопропил эфирга, бензолни толуолга алмаштириш мумкин, бунда ажратиш жараёнига зарар етмайди.

Хавфсизлик нуқтаи назаридан захарлилик ёнишдан кўра хавфлироқ ҳисобланади. Иш жойини барча хавфсизлик қоидаларига риоя қилган ҳолда ташкил қилинса, ёнғин хавфсизлигини бартараф қилиш мумкин, бироқ эритувчи билан ишлашда бевосита алоқада бўлишни буткул йўқ қилиб бўлмайди. Кўп ароматис ва хлор тутувчи эритувчилар одам танасида тўпланиш хусусиятига эга. Сўнгги маълумотларга кўра илгари кам захарли ҳисобланган эритувчилар консероген ҳисобланади, шунинг учун бу эритувчилар билан ишлашда эҳтиёткорлик талаб этилади.

4- АМАЛИЙ МАШҒУЛОТ

ЮПҚА ҚАТЛАМЛИ ХРОМАТОГРАФИЯ УСЛУБИ

Усулнинг умумий хусусиятлари

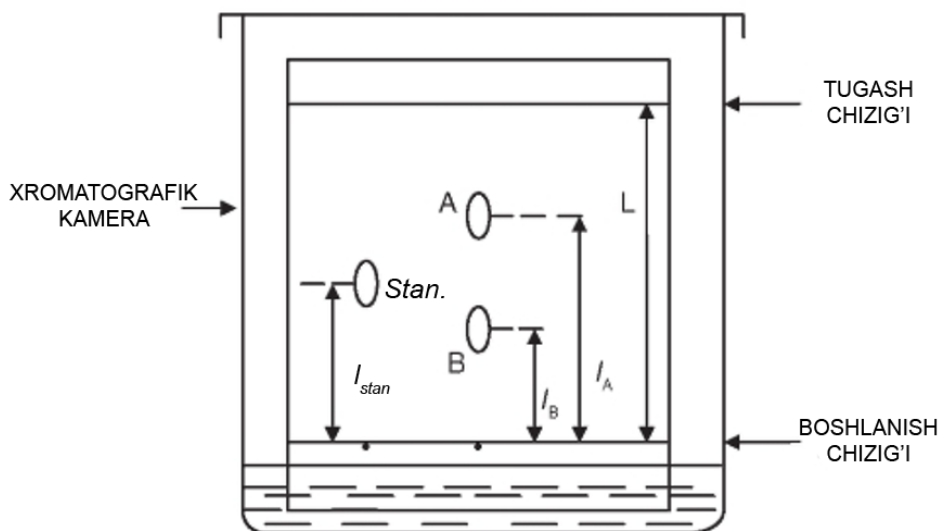
Адсорбцион хроматография усулининг энг кенг тарқалган турларидан бири бу юпқа қатламли хроматография (ЙҚХ) бўлиб – юзаки хроматографиянинг бир туридир. Бунда адсорбент пластинкада юпқа қатлам шаклида ишлатилади.

Ишлаш принципи ва асосий тушунчалар

Тоза текис юзага (шиша, металл, пластмасса пластинка) у ёки бу усулда сорбент юпқа қавати суртилади, у кўпинча пластинка юзасига қотирилади. Пластинкалар ўлчами турлича бўлиши мумкин (5-50 см). Пластинка юзаси сорбент қаватига зарар етказмаслик учун эҳтиёткорлик билан эритувчининг бошланиш (пластинканинг пастки томонидан 2-3 см ораликда) ва тугаш чизиғи (қалам билан) чизилади (1-расм).

Пластинканинг бошланиш чизиғига (микрошприц, капилляр) намуна– ажратиладиган моддалари мавжуд аралашма оз миқдорда суюқ ҳолатдасуртилади, масалан икки модда А ва Б мос келувчи эритмада эритилган (1-расм). Эритувчини учиб кетишига имкон берилади, шундан сўнг пластинкани хроматографик камерага суюқ фазага киритилади, суюқ фазада махсус танланган эритувчи ёки эритувчилар тўплами бўлади. Капилляр кучлар таъсирида кўзгалувчи фаза кўзгалмас фаза бўйлаб эритувчининг бошланиш чизиғидан тугаш чизиғига томон ҳаракат қила бошлайди, бунда эритувчи ўзи билан турли тезликда ҳаракатланувчи намунанинг А ва Б компонентларини тортиб ўтади. Ушбу ҳолатда А компонентнинг кўзгалмас фазага яқинлиги, Б компонентнинг кўзгалмас фазага яқинлигига нисбатан камроқ, шу сабабли А компонент Б компонентдан тезроқ ҳаракатланади. Кўзгалувчи фаза *m* вақт оралиғида тугаш чизиғини босиб ўтганидан сўнг хроматография тўхтатилади,

пластинкани хроматографик камерадан олинади, ҳавода қуритилади сўнг А ва Б моддаларнинг пластинка юзасида қолдирган доғлари жойлашуви аниқланади. Доғлар (зоналар) одатда овалсимон ёки доира шаклида бўлади. Ўрганилаётган ҳолатда А компонент доғи старт чизиғидан l_A масофага, Б компонент доғи l_B масофага, эритувчи эса L масофани босиб ўтади.



1-расм. Аралашмани А ва Б компонентга ажратишнинг юпқа қатламли хроматография усули

Тизимдаги ажратилувчи компонентларни хусусиятлари учун ҳаракатланиш коэффициенти киритилади R_f (ёки R_f -фактор):

$$R_f = \frac{V_i}{V_E} = \frac{l_i/t}{L/t} = \frac{l_i}{L}$$

Буерда $V_u = l_u/m$ и $V_E = L/m$ – мос равишда и –компонент ва эритувчининг ҳаракатланиш тезлиги; l_u и L – и –компонент ва эритувчи босиб ўтган йўли; m – эритувчининг бошланиш чизиғидан тугаш чизиғига ҳаракатланишига кетган вақт.

l_u масофани бошланиш чизиғидан ушбу компонентнинг қолдирган доғ марказигача бўлган оралиқни ҳисобланади.

Одатда ҳаракатланиш коэффициенти $R_f = 0-1$ оралиғида ётади. Оптимал кўрсаткич 0.3-0.7 ни ташкил қилади. Хроматография шартларини танлашда, R_f катталиги 0 ва 1 дан фарқли бўлиши керак.

Ҳаракатланиш коэффициенти сорбент-сорбат тизимининг муҳим хусусияти ҳисобланади. Доимий хроматограия шартлари учун $P_f = \text{конст.}$

Ҳаракатланиш коэффициенти P_f бир неча факторларга боғлиқ: эритувчи табиати ва сифати, унинг тозалиги; сорбентнинг табиати ва сифати, биртекислиги, қатлам қалинлиги; сорбентнинг фаоллиги (ундаги намлик мавжудлиги); тажриба техникаси; тажриба ўтказувчининг малакаси ва бошқалар. Амалиётда ушбу шароитларга риоя қилиш қийин ҳисобланади. Шароит таъсирини меъёрлаш учун жараёнга *нисбий ҳаракатланиш коэффициенти* P_c киритилади:

$$R_s = \frac{l}{l_{стан}} = \frac{R_f}{R_f(стан)}$$

Бу ерда $P_f = l/L$; $P_f(стан) = l_{стан}/L$; $l_{стан}$ – бошланиш чизиғидан стандарт намуна қолдирган доғ марказигача бўлган масофа (1-расм).

Ҳаракатланиш коэффициентиг P_f га қараганда, нисбий ҳаракатланиш коэффициенти P_c – модданинг кўпроқ обектив ҳаракатланиш коэффициенти ҳисобланади.

Стандарт сифатида кўпинча ушбу шароит учун $P_f \approx 0,5$ бўлган модда олинади. Кимёвий табиатига кўра стандартни ажратилаётган моддаларга яқин моддалар танланади. Стандартни қўлланганда одатда P_c кўрсаткичи 0.1-10 оралиғида ётади, оптимал чегараси 0.5-2.

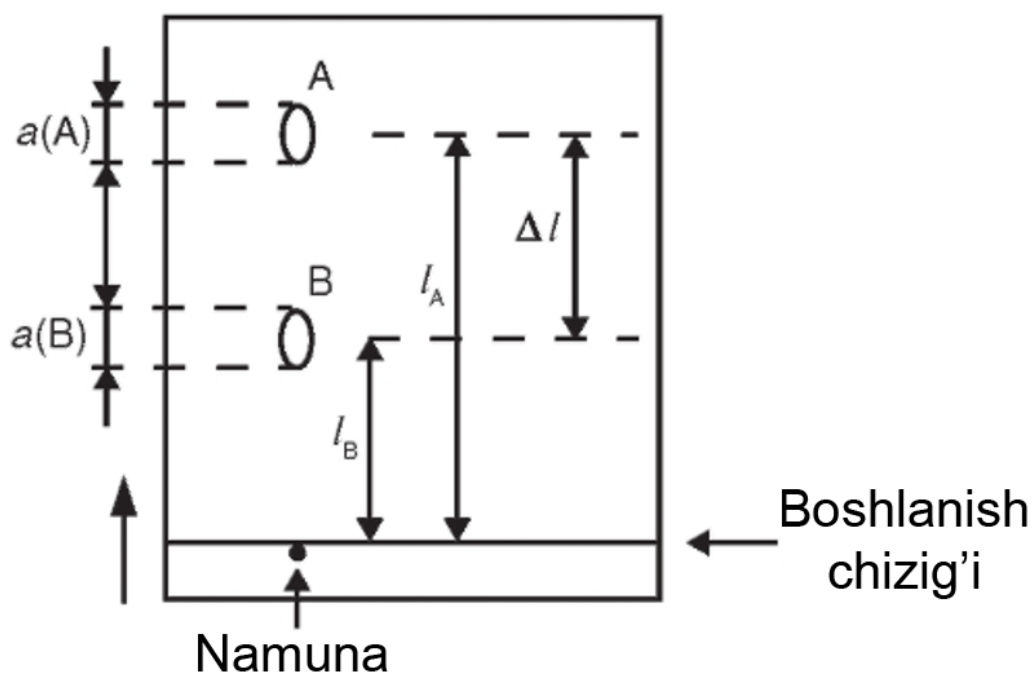
Ажратилувчи компонентларни янада ишончли аниқлаш учун “гувоҳлар” – эталон моддалар қўлланилади, улар ўрганилаётган модда таркибида бўлади. Агар компонент ва “гувоҳ” модданинг ҳаракатланиш коэффициенти тенг $P_f = P_f(\text{гувоҳ})$ бўлса, бу хроматография қилинаётган аралашма таркибида “гувоҳ” моддалар борлиги эҳтимоли мавжуд бўлади.

А ва Б компонентларни ажратилиш хусусиятлари учун ушбу шароитда ажратиш даражаси (критерияси) $P(A/B)$ киритилади:

$$R\left(\frac{A}{B}\right) = \frac{\Delta l}{\frac{a(A)}{2} + \frac{a(B)}{2}} = \frac{2\Delta l}{a(A) + a(B)}$$

Бу ерда Δl - А ва Б компонентлари қолдирган доғлар маркази орасидаги масофа; $a(A)$ ва $a(B)$ - хроматограммадаги А ва Б компонентлар доғлари диаметри (2-расм).

$R(A/B)$ катталиги қанчалик катта бўлса, хроматограммадаги А ва Б компонентлар доғлари шунча тиниқ ажралиб туради.



2-расм. А ва Б компонентларни ажралиш даражасини $R(A/B)$ аниқлаш

Яна бир муҳим кўрсаткич моддани ушлаб туриш – сиғим коэффициенти:

$$k = \frac{1-R_f}{R_f}$$

Амалиётда k катталигининг оптимал қиймати 1дан 5 гача ҳисобланади (R_f – 0.5дан ~0.17 гача). k нинг бундан кичик қийматида хроматография қилинаётган аралашма ёмон ажралади; катта қийматларда эса хроматографиялаш вақти узаяди.

А ва Б компонентларнинг ажратилиши селективлигини баҳолаш учун α ажратилиш коэффициенти қўлланилади:

$$\alpha = \frac{l_B}{l_A}$$

Агар $\alpha = 1$ бўлса, А ва Б компонентлар ажралмайди.

5- АМАЛИЙ МАШҒУЛОТ

ГАЗ ХРОМАТОГРАФИЯСИДА СИФАТ ВА МИҚДОРИЙ ТАҲЛИЛ УСЛУБЛАРИ

1. Сифат таҳлили

Моддаларни аниқлашнинг асосий усуллари:

1.1. Белги усули

Биринчи вариант, эталон (белги) моддалар ва таҳлил қилинаётган моддаларни бир хил шароитда тажрибавий аниқланади ва солиштирилади (агар газ-ташувчи сарфи кўп бўлса, қуйида келтирилган ушлаб туриш параметрлари қўлланилади). Ушлаб туриш параметрларининг тенглиги моддаларни аниқлаш имкониятини беради.

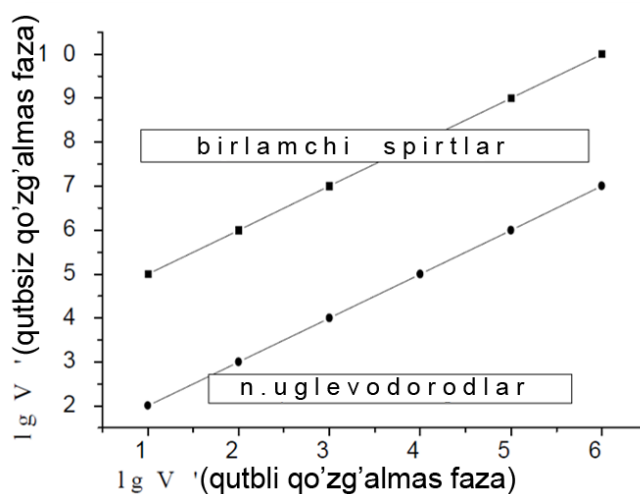
Иккинчи вариант, белги усулининг ушбу вариантида, таҳлил қилинаётган аралашмага таркибида тахминан мавжуд бўлган, эталон компонент (белги) қўшилади. Бунда мос келувчи чўққининг эталон модда қўшилмагунига қадар бўлганидан катталашса, аралашмада ушбу бирикманинг мавжудлигини билдиради.

1.2. Адабиётлардаги ушлаб туриш параметрларидан фойдаланиш.

1.3. График боғлиқликларни қўллаш.

а) Гомологик қатор аъзоларини аниқлаш учун ушлаб туриш параметрлари логорифмларининг, модданинг физик-кимёвий хусусиятларига боғлиқлик графиги тузилади (углерод атомлари сони, гомологларнинг қайнаш ҳарорати, молекуляр масса ва бошқалар).

б) Турли гомологик қаторларга тегишли бирикмаларни аниқлашда, бир графикда қутблари фарқланувчи қўзғалмас фазаларда ушлаб туриш параметрлари мос равишда туширилади (1-расм).



1-расм. $\lg V'$ (қутбсизфазадаги)нинг $\lg V'$

(қутблифазадаги)га боғлиқлиги, икки гомологик қаторлар учун

1.4. Ковач индексини қўллаш. Ковач индекси 100 га кўпайтирилган молекуладаги углерод атом сонини ўзида акс эттиради. Улар хроматографик ажратиш жараёни шартларига боғли бўлмайди ва гомологик қатор азолари учун доимий кўрсаткичга эга бўлади. Метан ушлаб туриши индекси катталиги 100 га, этанни – 200, пропан – 300 ва ҳ.к.

2. Миқдорий таҳлил

Миқдорий таҳлил асосида чўққи юзасининг модда миқдорига боғлиқлиги ётади (баъзи ҳолларда чўққи баландлиги қўлланилади).

Чўққилар юзасини аниқлашнинг турли усуллари мавжуд:

- планиметр ёрдамида;
- кесилган чўққиларни ўлчаш (хроматограммадаги чўққиларни бир жинсли қоғозга кўчирилади, қирқилади ва тарозида тортилади);
- элестронинтегратор ёрдамида;
- эХМ ёрдамида.

Миқдорий хроматографик таҳлилниги аниқлиги сезиларли даражада моддалар концентратсиясини ратсионал ҳисоблаш усулини танлаш орқали белгиланади. Асосий усуллар қуйидагилар:

- абсолют колибровка қилиш усули,
- ички нормаллаштириш усули,
- ички стандарт усули.

2.1. Абсолют колибровка қилиш усули

Усулниги мазмуни шундаки, хроматографик колонкага аниқ миқдорда стандарт модда киритилади ва чўққилар юзалари ўлчанади. Олинган натижалар бўйича колибровка қилиш графиги тузилади. Сўнг таҳлил қилинадиган аралашма хроматография қилинади ва график бўйича берилган компонент миқдори аниқланади.

2.3. Ички нормаллаштириш усули

Усул мазмуни шундаки, аралашмадаги барча компонентлар чўққилари юзаларини умумий қийматини 100 % деб қабул қилинади.

Ушбу усулниги зарур шарти барча компонентларни қайд қилиш ҳисобланади (хроматограммада аралашманиги барча ажратилган компонентлариниги чўққилари мавжуд бўлади).

2.4. Ички стандарт усули

Ушбу усул мазмуни, таҳлил қилинаётган аралашмага маълум миқдорда стандарт модда қўшилади (солиштириш моддаси).

Ички стандарт таҳлил қилинаётган аралашма компонентлари структураси ва физик-кимёвий хусусиятларига яқин бирикмалар орасидан танланади. Аралашма компонентлариниги нисбий тузатиш коэффициентлари ички стандартга муносабат билан аниқланади.

6- АМАЛИЙ МАШҒУЛОТ

МОДДАЛАР АРАЛАШМАСИНИНГ СИФАТ ТАҲЛИЛИ

Ишдан мақсад – таҳлил қилинаётган аралашма компонентларини белги усули ёрдамида аниқлаш.

Ишнинг асосий босқичлари:

1. Таҳлил қилинаётган аралашмани хроматографиясини ўтказиш, чўққилармик дорини аниқлаш, жадвалга ушлаб туриш вақтини ва чўққилар юзаларини қайд қилиш:

Чўққининг аралашма хроматограммасидаги тартиб рақами ёки стандарт модда номланиши	t _R , с	S

Сўнг ишни давом эттиришнинг қуйидаги вариантлари мавжуд:

Вариант 1.

2. Ўқитувчи томонидан таклиф қилинган стандарт моддаларни хроматография қилиш, ушлаб туриш вақтини белгилаш, натижаларни жадвалга ёзиш.

3. Стандарт моддалар чўққилари ва таҳлил қилинаётган аралашма чўққилари параметрларини солиштириш (ушлаб туриш вақти), бунинг асосида компонентларни аниқлаш.

Вариант 2.

2. Таҳлил қилинаётган аралашмага стандарт моддалардан бири қўшилади, ҳосил бўлган аралашма хроматография қилинади, чўққилар миқдори аниқланади, ушлаб туриш вақти ва чўққилар юзаси ёзиб олинади.

3. Агар чўққилар миқдори таҳлил қилинаётган аралашмага нисбатан ўзгармаган бўлса, чўққилардан бири тўсатдан катталашган бўлса, аралашма таркибида қўшилган стандарт модда мавжуд эканлиги тўғрисида хулоса қилиш мумкин.

Ички нормаллаштириш усули билан аралашмадаги моддаларни микдорий таҳлили

Ишдан мақсад – аралшмани микдорий таҳлил қилиш.

Ишнинг асосий босқичлари:

1. Лаборантлардан маълум микдорий

таркибли стандарт моддалар аралашмасини олиш ва ўқитувчи дан аралашма таркибидаги ҳар бир модданинг микдорини ва колонкадан қандай кетма-кетликда чиқишини билиш. Маълумотларни жадвалга киритиш:

Чўққи №	Модда	ω, мас. %

2. Стандарт аралашма муносиликларини 3 марта хроматография қилиш, жадвалга ушлаб туриш ва қилар юзаларини ёзиб бориш:

Модда	Хроматограмма № 1		Хроматограмма № 2		Хроматограмма № 3	
	тР, с	С	тР, с	С	тР, с	С

3. Стандарт танлаш – исталган компонент, яхши ажралган ва хроматограммани ўрта қисмида жойлашган чўққини танлаш. Унга $k=1$ қабул қилиш. Сўнг бошқа компонентларни нисбий тузатиш коэффициентлари аниқланади ва жадвалга киритилади. Аралашманинг ҳар бир компонентлари учун коэффициент катталиги ўртачаси олинади:

Модда	Хроматограмма бўйича аниқланган тузатиш коэффициентлари			Ўрта
	к:			
	№ 1	№ 2	№ 3	

4. Лаборантлардан таҳлил қилинадиган аралашмани олиш, уни камида 3 марта хроматография қилиш, чўққилар миқдорини аниқлаш, ушлаб туриш вақти ва чўққилар юзасини жадвалга ёзиб борилади.

5. Таҳлил қилинаётган аралашма компонентларини нисбий тузтишларни ҳисобга олган ҳолда ҳисоблаш. Натижаларни жадвалга ёзиш. Ҳар бир компонент учун олинган ω катталигини ўртачасини аниқлаш:

Вещество	Хроматограммлар бўйича аниқланган			Ўрта
	тўғриловчи коэффициентлар ω , %			
	№ 1	№ 2	№ 3	

ФОЙДАЛАНИЛГАН АДАБИЁТЛАР

Асосий адабиётлар

1. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ИСБН 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС ИПРбоокс.
2. Основы аналитической химии: в 2 т. Т. 1 / ред. Ю. А. Золотов. – 4-е изд., доп. и перераб. – М. : Академия, 2010. – 384 с. ИСБН 978-5-7695-5821-4

Қўшимча адабиётлар

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы /ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 1. – М: МИР, 2004. – 608 с. – ИСБН 5-03-003560-5, ИСБН 3-527-28881-3
2. Аналитическая химия. Проблемы и подходы / ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 2. – М: МИР, 2004, 625 С. – ИСБН 5-03-003599-1, ИСБН 3-527-28881-3
3. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002.

