इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय
विज्ञान विद्यापीठ

BBCCL-114
ऐमीनो अम्लों और न्यूक्लिओटाइडों का उपापचयन : प्रयोगशाला

प्रयोगों की सूची

प्रयोग 1 सीरम ट्रांसाएमीनेज का आमापन	**5**
प्रयोग 2 सीरम यूरिया का आंकलन	**11**
प्रयोग 3 सीरम यूरिक अम्ल का आकलन	**18**
प्रयोग 4 सीरम क्रिएटिनिन का आंकलन	**24**

ignou
THE PEOPLE'S
UNIVERSITY

कार्यक्रम एवं पाठ्यक्रम अभिकल्प समिति

प्रो. बेचन शर्मा
जैवरसायन विभाग, इलाहाबाद विश्वविद्यालय

प्रो. रीना गुप्ता
जैव प्रौद्योगिकी विभाग; एच.पी. विश्वविद्यालय, शिमला

प्रो. डी.वी. देवराज
जैवरसायन विभाग; बंगलौर विश्वविद्यालय

प्रो. के. वली पाशा
जैवरसायन विभाग; योगी विमाना विश्वविद्यालय, आन्ध्र प्रदेश

डॉ. सुनीता जोशी
जैवरसायन विभाग, दौलत राम कॉलेज, दिल्ली विश्वविद्यालय

प्रो. रंजीत किशोर मिश्रा
जैवरसायन विभाग, लखनऊ विश्वविद्यालय

प्रो. संजीव पुरी
जैवचिकित्सकीय विभाग, यू.आई.ई.टी., पंजाब विश्वविद्यालय

प्रो. सिमी फरहत बशीर
जैवविज्ञान विभाग, जामिया मिलिया इस्लामिया विश्वविद्यालय

संकाय सदस्य

प्रो. विजयश्री
पूर्व निदेशक, विज्ञान विद्यापीठ,
इग्नू, नई दिल्ली–110068

डॉ. प्रवेश बब्बर
उप आचार्य, विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

डॉ. एम.अब्दुल करीम
सहायक आचार्य, विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

डॉ. अरविंद कुमार शाक्या
सहायक आचार्य, विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

डॉ. मनीषा पाण्डेय
सहायक आचार्य, विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

डॉ. सीमा कालड़ा
सहायक आचार्य, विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

पाठ्यक्रम निर्माण दल

डॉ. सुनीता जोशी
संपादक
जैवरसायन विभाग
दौलत राम कॉलेज, दिल्ली विश्वविद्यालय
नई दिल्ली

संकाय सदस्य
डॉ. नीरज श्रीवास्तव
कंसल्टेंट; विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू,
(प्रयोग 1-4)

तथा

डॉ. प्रवेश बब्बर
विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू,
(प्रयोग 1-4, कवर डिजाइन एवं आर्टवर्क)

हिन्दी अनुवाद

: डॉ. के. एन. सिंह
उप आचार्य
बी एन एस महिला महाविद्यालय,
वाराणसी।

डॉ. प्रवेश बब्बर
इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय
नई दिल्ली

पाठ्यक्रम समन्वयक

: डॉ. प्रवेश बब्बर (Email: parvesh@ignou.ac.in)

सामग्री मुद्रण दल

श्री सुनील कुमार
एस.ओ. (पी.), विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

जुलाई, 2021

© इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय, 2021

ISBN: ......

सर्वाधिकार सुरक्षित। इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय की लिखित अनुमति के बिना इस पुस्तक के किसी भी अंश को मिमियोग्राफ अथवा किसी अन्य साधन द्वारा पुनः प्रस्तुत करने की अनुमति नहीं है।

इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय के पाठ्यक्रमों के विषय में अधिक जानकारी विश्वविद्यालय के मैदान गढ़ी, नई दिल्ली स्थित कार्यालय और इग्नू वेब साइट www.ignou.ac.in से प्राप्त की जा सकती है।

इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय की ओर से कुलसचिव सामग्री निर्माण एवं वितरण प्रभाग द्वारा मुद्रित एवं प्रकाशित।

मैसर्स :

BBCCL-114: ऐमीनो अम्लों और न्यूक्लिओटाइडों का उपापचयन

जैवरसायन विज्ञान का यह प्रयोगशाला पाठ्यक्रम जैवरसायन विज्ञान के स्नातक कार्यक्रम के शिक्षार्थियों के लिए है और इसमें उन्हें ऐमीनो अम्लों और न्यूक्लिओटाइडों के उपापचय से अवगत कराया गया है। ये प्रयोगशाला पाठ्यक्रम दो क्रेडिट का है। यह ऐमीनो अम्लों और न्यूक्लिओटाइडों के सैद्धान्तिक पहलुओं का पूरक है, जिसके विषय में शिक्षार्थियों ने पाठ्यक्रम BBCCT-113 में पढ़ा है। इन प्रयोगशाला अभ्यासों की रचना ऐमीनो अम्लों की उपापचयी अभिक्रियाओं को बताने के लिए की गई है।

नाइट्रोजन सभी ऐमीनो अम्लों में अपरिहार्य रूप से पाया जाने वाला एक तत्व है; इसे आहारीय प्रोटीन से प्राप्त किया जाता है और यह प्रोटीनों के संश्लेषण के साथ ही उनके रखरखाव के लिए अनिवार्य है। नाइट्रोजन का उत्सर्जन गुर्दों द्वारा मुख्य रूप से यूरिया और अमोनिया के रूप में होता है। स्थैतिक परिवेश में, गुर्दों से नाइट्रोजन का उत्सर्जन नाइट्रोजन के अंतर्ग्रहण के बराबर होता है।

यूरिया, यूरिया अम्ल, क्रिएटिन और क्रिएटिन चार प्रमुख NPN उत्पाद है और इनका आकलन चिकित्सी क्षेत्र में गुर्दों के कार्य करने की क्षमता की निगरानी के लिए किया जाता है। अस्पतालों में, ये नियमित रूप से किए जाने वाले परीक्षण हैं जिनके द्वारा अनेक प्रकार के गुर्दे के रोगों के होने और उनकी प्रगति का पता किया जाता है। यूरिया रक्त में NPN के लगभग आधे भाग को बनाता है। इसका उत्सर्जन अनेक प्रकार की स्थितियों द्वारा नियंत्रित होता है क्योंकि ये सामान्य स्वास्थय और रोग सहित अम्ल–क्षार समस्थैतिकी में महत्वपूर्ण भूमिका निभाता है।

ऐमीनो अम्ल जैवरासायनिक अभिक्रियाओं जिनकी कोशिकीय कार्यों के रखरखाव के लिए आवश्यकता होती है, 'कैसे' और 'क्यो' होती है, इसका उजागर सीरम ट्रांसएमिनेज के आमापन पर प्रयोगशाला अभ्यासों में बताया गया है। ऐमीनो अम्लों के एल्फा ऐमीनो समूह को ऐमीनो ट्रांसफरेसेस द्वारा निकाल दिया जाता है। दो सबसे महत्वपूर्ण, सरिस ऐमीनो ट्रांसफरेसेस ऐस्पार्टेट ट्रांसएमिनेज (AST) और एलानिक ट्रांसएमिनेज (ALT) हैं। ये समग्र ट्रांसएमिनेशन में महत्वपूर्ण योगदान देते हैं और महत्वपूर्ण पूर्वलक्षण और निदानीय जैवसंकेतक/बायोमार्कर्स हैं।

इन परीक्षणों पर प्रत्येक प्रायोगिक अभ्यास प्रयोग की 'प्रस्तावना' से आरंभ होता है जिसमें उसके सिद्धान्त और प्रासंगिकता की चर्चा की गई है जिससे आप प्रयोग को करने से पहले उसके महत्व के पूरी तरह से समझ सकें। प्रेक्षण कैसे करते हैं और कैसे उनका परिकलन करना है इसको स्पष्ट करते हुए, पूर्वलेख में विस्तृत वर्णन किया गया है। प्रत्येक प्रयोगशाला अभ्यास में प्रयोग को करते समय बरती जाने वाली सावधानियों को भी अनिवार्य रूप से शामिल किया गया है। रसायनों के सावधानी से उपयोग और प्रयोग विधियों में त्रुटिपूर्ण मापनों से बचने का वर्णन भी विभिन्न प्रयोगों में किया गया है।

प्रयोगों का विवरणः

प्रयोग–1ः पहले प्रयोगशाला प्रयोग में ट्रांसएमिनेज की एन्जाइम क्रिया के आमापन पर मौलिक अभ्यास को बताया गया है।

प्रयोग–2ः दूसरे प्रयोग में यूरिया के आंकलन का वर्णन है।

प्रयोग–3ः तीसरे प्रयोग की रचना यूरिक अम्ल के स्तर का निर्धारण करने के लिए की गई है।

प्रयोग–4ः ये प्रयोग सीरम क्रिएटिन के आंकलन का विस्तृत पूर्वलेख प्रदान करता है।

ये बहुत महत्वपूर्ण है कि आप (शिक्षार्थी) के पास एक प्रेक्षण पुस्तिका हो जिसमें आप सभी प्रेक्षणों, परिणामों, संदेहों (यदि कोई है) और कठिनाइयों को लिख सकें, जो प्रयोग को करते समय हुइ हों। एक अच्छा प्रयोगकर्ता प्रयोगशाला में सदैव अपने प्रयोगों के प्रेक्षणों और परिणामों पर व्यापक और विस्तृत नोट्स बनाता है।

प्रेक्षण पुस्तिका के अतिरिक्त, आपसे एक रिकॉर्ड पुस्तिका बनाने की उम्मीद की जाती है, जिसे आपको परीक्षा के समय काउन्सलर के पास जमा कराना होता है। आप को अपने परीक्षण आंकड़ों को रिकॉर्ड करके प्रत्येक प्रयोग पर संक्षिप्त परिचर्चा लिखनी चाहिए। जहां कहीं आवश्यक हो, आपको वैज्ञानिक उदाहरण देने चाहिए। प्रयोगों के मूल्यांकन के अंक मिलेंगे और प्रयोगशाला सत्र के अंत में आपको मौखिक परीक्षा देनी होगी। प्रयोगशाला सत्र के अंत में आपको दिए गए प्रयोगा को करना होगा, जिसके आपको अंक मिलेंगे और अंतिम मूल्यांकन प्रयोगशाला सत्र में आपके सतत् प्रदर्शन और लॉगबुक तथा रिकॉर्ड पुस्तिका के रखरखाव और मौखिक परीक्षा के आधार पर किया जाएगा। अतः अपने काउंसलर से श्रेष्ठ ज्ञान (ज्ञानकारी) प्राप्त करने के लिए उनके साथ निरंतर बातचीत कीजिए और प्रायोगिक अभ्यासों को निष्ठा के साथ कीजिए जिससे आपके प्रयास उपयोगी और अर्थपूर्ण हों।

हम आपको इस प्रयास में शुभकामनाएं देते हैं।

ignou
THE PEOPLE'S
UNIVERSITY

प्रयोग 1

सीरम ट्रांसाएमीनेज का आमापन|

रूपरेखा

1.1 प्रस्तावना

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

1.2 सिद्धांत

1.3 आवश्यक सामग्री

1.4 संलेख

1.5 अवलोकन और परिणाम

1.6 सावधानियां

1.1 प्रस्तावना

इस प्रयोगशाला अभ्यास में आप सीरम ट्रांसएमिनेज–SGOT और SGPT की परख करना सीखेंगे। एंजाइमों का एक समूह, जो अमीनो समूहों के अंतरण (transfer) के माध्यम से अमीनो अम्ल और ऑक्सोएसिड के अंत:रूपांतरण के लिए उत्प्रेरण को क्रियान्वित करता है, ट्रांसएमिनेज (अमिनोट्रांसफरेज) के रूप में सुविचारित है। सभी ट्रांसएमिनेज पाइरिडोक्सल आश्रित एंजाइम होते हैं, जो एल्डिमाइन लिंकेज (शिफ क्षार) के माध्यम से एन्ज़ाइम के लाइसिन अवशेषों से सहसंयोजक बंधे होते हैं। अमीनो समूह के लिये कीटो ग्राही ज्यादातर α–किटोग्लूटारेट होता है जो ग्लूटामेट को एक उत्पाद के रूप में उत्पन्न करता है।

दो सबसे महत्वपूर्ण अमीनोट्रांसफरेज, एस्पारटेट ट्रांसएमिनेज (AST) और एलानिन ट्रांसएमिनेज (ALT) होते हैं। ये समग्र ट्रांसएमिनेशन में महत्वपूर्ण योगदान देते हैं और यह महत्वपूर्ण रोगसूचक और नैदानिक बायोमार्कर है। सामान्य स्वस्थ व्यक्तियों के रक्त में दोनों एंजाइमों का स्तर कम होता है।

एंजाइम बड़े पैमाने पर मानव ऊतकों में पाया जाता है और कुछ हद तक यकृत हृदय कंकाल की मांसपेशी और लाल रक्त कोशिकाओं में होते हैं। उच्च सीरम ALT यकृतशोथ, सिरोसिस संक्रमण जैसे कि हिमोलिटिक स्थितियां, कंकाल रोग और गुर्दे का रोधगलन आदि से यकृत की क्षति को इंगित करता है। AST का उच्च स्तर हृदपेशीय रोधगलन, यकृत विकारों, हिमोलिटिक स्थितियों में पाया जाता है। शराब से हुये यकृतशोथ में AST, ALT से ज्यादा होता है (आमतौर पर अनुपात >2) जबकि दोनों का स्तर वायरल हेपेटाइटिस में 10–100 गुना ज्यादा होता है। इन ट्रांसएमिनेज की सीरम

क्रियाशीलता की परख यकृत विषाक्तता के मूल्यांकन में सबसे उपयोगी उपकरण बन गया है।

प्रयोगशाला अभ्यास में आप 4–डाइनाइट्रोफेनिल हाइड्राजीन द्वारा AST और ALT की क्रिया का सीरम में आमापन करेंगे। यह एक वर्णमापी विधि है। आपको पता होना चाहिये कि वर्णमापी विधियों को युग्मित एन्जाइम आमापन द्वारा हटा दिया गया है जिसमें ट्रांसएमिनेशन द्वारा उत्पादित कीटोअम्ल को NADH द्वारा अपचयित किया जाता है और NADH के गिरते स्तर को 340 nm पर मापा जाता है।

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

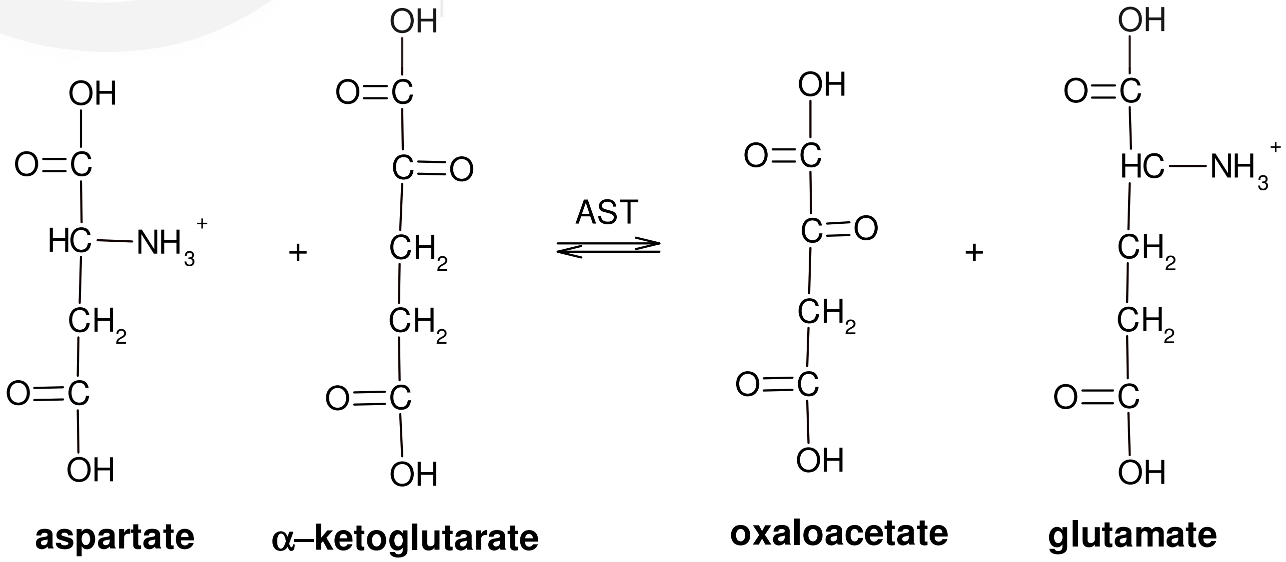
इस प्रयोग का अध्ययन और प्रदर्शन करने के बाद, आपको निम्नलिखित में सक्षम होना चाहिए :

- सीरम ट्रांसएमिनेज– SGOT और SGPT की आमापन पद्धति सीखने में;
- वर्णमापी विधि के रसायन की व्याख्या कर सकने में; और
- सीरम ट्रांसएमिनेज– SGOT और SGPT के सीरम की आमापन की नैदानिक महत्व की व्याख्या करने में।

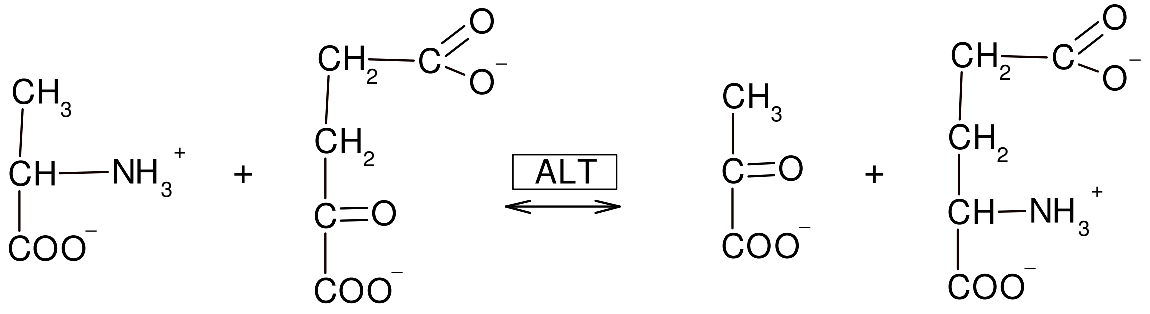
1.2 सिद्धांत

ट्रांसएमिनेज (दो प्रमुख प्रकार GOT और GPT) अमीनो समूहों के अंतरा–अणुक अंतरण द्वारा अमीनो अम्ल और कीटो अम्ल के अंतःरूपांतरण को उत्प्रेरित कर रहे हैं। एंजाइमों और उनके द्वारा उत्प्रेरित अभिक्रियाओं के नाम नीचे वर्णित हैं:

1. ग्लूटामेट ऑक्जेलोएसीटेट ट्रांसएमिनेज (GOT) या एस्पार्टेट ट्रांसएमिनेज (AST) [EC 2.6.1.1]



2. ग्लूटामेट पाइरूवेट ट्रांसएमिनेज (GPT) या एलानिन ट्रांसएमिनेज (ALT) [EC 2.6.1.2]



Alanine Oxoglutarate Pyruvate Glutamate

SGPT उत्प्रेरित अभिक्रिया में गठित पाइरूवेट, क्षारीय स्थितियों के तहत एक रंगीन व्युत्पन्न देने के लिए DNPH के साथ अभिक्रिया करने के लिए बनाया गया है। AST उत्प्रेरित प्रतिक्रिया में गठित ऑक्जेलोएसीटेट, DNPH के साथ एक ही रंग के व्युत्पन्न का उत्पादन करते हुए स्वतः पायरुवेट के लिए डिकार्बोक्सिलेट भी हो जाता है। इस तरह, SGPT और SGOT के परख को क्रियान्वित किया जाता है।

1.3 आवश्यक सामग्री

1. **फॉस्फेट बफर (0.1 M, pH 7.4)**

   द्विक आसुत जल में निर्जलीय डाइसोडियम हाइड्रोजन फॉस्फेट के 11.22 ग्राम और निर्जलीय पोटेशियम डाइहाइड्रोजन फॉस्फेट के 2.52 ग्राम को घोलें और आयतन 700–800 मिलीलीटर करें। pH को 7.4 पर अनुकूलित करें और अंत में आयतन को 1 लीटर करें।

2. **SGOT सब्सट्रेट [L–एस्पार्टिक अम्ल (0.2M), α–किटोग्लुटेरिक अम्ल (0.02M)]**

   1M सोडियम हाइड्रॉक्साइड के 90 मिलीलीटर में L– एस्पार्टिक अम्ल के 13.3 ग्राम को घोलें। α– किटोग्लुटेरिक अम्ल के 0.146 ग्राम डालें और 1M सोडियम हाइड्रॉक्साइड के 10 मिलीलीटर को डालकर घोलें। pH को 7.4 पर अनुकूलित करें और फॉस्फेट बफर के साथ 500 मिलीलीटर तक तनुता करें। डीप फ्रीजर में संग्रहित करें।

3. **SGPT सब्सट्रेट [एलनिन (0.2M), α– कीटो–ग्लुटेरिक अम्ल (0.002M)]**

   1M NaOH के लगभग 6 मिलीलीटर के डालने के साथ 90 मिलीलीटर पानी में 8.9 ग्राम एल –एलानिन घोलें। 0.146 ग्राम α–कीटो–ग्लुटेरिक अम्ल और 4 मिलीलीटर 1M NaOH डालें। pH को 7.4 पर अनुकूलित करें और फॉस्फेट बफर के साथ आयतन को 500 मिलीलीटर तक करें। डीप फ्रीजर में संग्रहित करें।

4. **संग्रह पाइरूवेट मानक (20mM)**

   100 मिलीलीटर फॉस्फेट बफर में 220 मिलीग्राम सोडियम पाइरूवेट घोलें। रेफ्रिजरेटर में संग्रहित करें।

क्रियाशील मानक (4 mM) : संग्रहित पाइरूवेट मानक के 4 ml की 16 ml फॉस्फेट बफर के साथ तनुता करें। यह 4mM का पाइरूवेट विलयन है।

5. 2,4—डाइनाइट्रोफेनिलहाइड्राजीन (DNPH) [0.2 प्रतिशत (w / v)]

10 मिलीलीटर सांद्र HCl में 200 मिलीग्राम DNPH घोलें। द्विक आसुत जल के साथ आयतन को 100 मिलीलीटर तक करें।

6. सोडियम हाइड्रॉक्साइड [0.4 M]

द्विक आसुत जल में एक लीटर बनाने के लिए 16 ग्राम NaOH घोलें (ऑक्जेलिक अम्ल के साथ NaOH को मानकीकृत करें)।

1.4 संलेख

पूरी प्रयोगात्मक प्रक्रिया निम्नलिखित तरीके से की जाती है:

(क) चार स्वच्छ और सूखी परखनली लें।

(ख) इन परखनलीयों को परीक्षण (T), कंट्रोल (C), मानक (S) और रिक्त (B) के रूप में चिह्नित करें।

(ग) सभी परखनलीयों में 0.5 मिलीलीटर सब्सट्रेट डालें।

(घ) 0.1 मिलीलीटर सीरम को परीक्षण (T) और कंट्रोल (C) परखनलीयों में डालें।

(च) ०.1 मिलीलीटर क्रियाशील मानक मानक (S) परखनली में डालें।

(छ) 0.1 मिलीलीटर द्विक आसुत जल को रिक्त (B) परखनली में डालें।

(ज) सभी नलीयों [परीक्षण (T), कंट्रोल (C), मानक (S) और रिक्त (B), को 37^0C पर जल ऊष्मक में 30

मिनट (SGPT)/ 60 मिनट (SGOT) के लिए ऊष्मायित करें ।

(झ) ऊष्मायन अवधि को पूरा होने के बाद, प्रत्येक परखनलीयों में 0.5 मिलीलीटर DNPH अभिकर्मक डालें।

(ट) 20 मिनट के लिए सामान्य तापक्रम पर नलीयों को रखें और फिर सभी नलीयों में 0.4N NaOH के 5 मिलीलीटर डालें। 10 मिनट के बाद, 520 nm पर अवशोषण पढ़ें।

1.5 अवलोकन और परिणाम

अवलोकन निम्नलिखित तरीके से दर्ज किया गया है:

विषय	T (परीक्षण)	C (कंट्रोल)	S (मानक)	B (रिक्त)	अवशोषण (520nm)
सब्सट्रेट	**0.5ml**	**0.5ml**	**0.5ml**	**0.5ml**	
सीरम	**0.1ml**	**0.1ml**	-	-	
मानक (क्रियाशील)	-	-	**0.1ml**	-	
द्विक आसुत जल	-	-	-	**0.1ml**	
DNPH	**0.5ml**	**0.5ml**	**0.5ml**	**0.5ml**	

SGOT / SGPT की क्रियाशीलता प्राप्त करने के लिए निम्नलिखित तरीके से गणना की जाती है:

ALT (**SGPT**) की क्रियाशीलता

$$= \frac{E_{(T)} - E_{(C)}}{E_{(s)} - E_{(B)}} \times 4 \times 1000 \times \frac{1}{30}$$

$$= \frac{E_{(T)} - E_{(C)}}{E_{(C)} - E_{(B)}} \times 133 \text{ units}$$

E = विलोपन मान

SGPT की सामान्य श्रेणी = 10–40 **IU/L**

ALT (**SGOT**) की क्रियाशीलता

$$= \frac{E_{(T)} - E_{(C)}}{E_{(s)} - E_{(B)}} \times 4 \times 1000 \times \frac{1}{60}$$

$$= \frac{E_{(T)} - E_{(C)}}{E_{(C)} - E_{(B)}} \times 67$$

SGOT की सामान्य श्रेणी = **8-20 IU/L**

1.6 सावधानियां

1. रक्त संग्रह के दौरान, हीमोलिसिस के किसी भी कारण से बचें।

2. pH को ध्यान में रख कर नियंत्रित करना चाहिए।

3. ऊष्मायन अवधि में परिवर्तन से बचना चाहिए क्योंकि यह परिणामों को प्रभावित करता है।

4. जल ऊष्मक (water bath) का तापमान बनाए रखना चाहिए।

5. यदि एंजाइम क्रिया 150 IU/L से ज्यादा है तो सीरम का सामान्य सलाइन से तनुकरण करें।

बोध प्रश्न

प्रश्न 1: ट्रांसएमिनेज क्या हैं?

प्रश्न 2: GPT और GOT को क्रमशः SGPT और SGOT क्यों कहा जाता है?

प्रश्न 3: SGPT और SGOT परख का नैदानिक महत्व क्या है?

उत्तर

उत्तर 1: एंजाइमों का एक समूह, जो अमीनो समूहों के अंतरण के माध्यम से अमीनो अम्ल और ऑक्सोएसिड के अंत:रूपांतरण के लिए उत्प्रेरण को क्रियान्वित करता है, ट्रांसएमिनेज (अमिनोट्रांसफरेज) के रूप में सुविचारित है।

उत्तर 2: सीरम में GPT और GOT एंजाइमों की परख के कारण, GOT को SGOT (सीरम ग्लूटामेट ऑक्जेलोएसीटेट ट्रांसएमिनेज) के रूप में भी जाना जाता है और GPT, SGPT (सीरम ग्लूटामेट पाइरूवेट ट्रांसएमिनेज) है।

उत्तर 3: उच्च सीरम ALT यकृतशोथ, सिरोसिस संक्रमण जैसे कि हिमोलिटिक स्थितियां, कंकाल रोग और गुर्दे का रोधगलन आदि से यकृत की क्षति को इंगित करता है। AST का उच्च स्तर हृदपेशीय रोधगलन, यकृत विकारों, यकृतशोथ स्थितियों में पाया जाता है। दोनों ही यकृत क्षति के संवेदनशील संकेतक हैं।

प्रयोग 2

सीरम यूरिया का आंकलन|

रूपरेखा

2.1 प्रस्तावना
अपेक्षित अध्ययन परिणाम
2.2 सिद्धांत
2.3 आवश्यक सामग्री
2.4 संलेख
2.5 अवलोकन और परिणाम
2.6 सावधानियां

2.1 प्रस्तावना

इस प्रयोगशाला अभ्यास में आप सीरम यूरिया का परिमापन करना सीखेंगे। यूरिया मुख्य रूप से प्रोटीन अपचय का उत्पाद है। यूरिया का संश्लेषण अमोनिया (अमीनो अम्ल से मुक्त) के उत्सर्जन से पूर्व विषहरण की प्रक्रिया है। मनुष्यों में इसे यकृत से संश्लेषित किया जाता है, रक्त में छोड़ा जाता है और लगभग पूरी तरह से गुर्दे द्वारा उत्सर्जित किया जाता है। संतुलित आहार पर, यूरिया मूल नाइट्रोजन का 80-90% होता है, जो कम प्रोटीन आहार पर 60% तक गिर सकता है।

सीरम यूरिया के आंकलन का नैदानिक महत्व गुर्दे के कार्य की जाँच करना है। सीरम यूरिया सांद्रता यकृत में यूरिया उत्पादन और मूत्र में वृक्क द्वारा यूरिया निष्कासन के बीच संतुलन का संकेत है। सीरम यूरिया की सामान्य श्रेणी प्रोटीन सेवन और/अंतर्जात प्रोटीन अपचय में भिन्नता के कारण जो यूरिया के संश्लेषण और उत्सर्जन की दरों से जुड़ा होती है, इसलिये बहुत व्यापक है।

यकृत और गुर्दे के शारीरिक कार्यों में असंतुलन के कारण रक्त में यूरिया का स्तर असामान्य हो जाता है। इस संबंध में, सीरम में यूरिया का बढ़ा हुआ स्तर यूरिया के उत्पादन में वृद्धि, यूरिया निष्कासन के स्तर में कमी या दोनों के संयोजन के कारण हो सकता है। कुछ स्थितियाँ जिनके परिणामस्वरूप यूरिया का स्तर बदल जाता है, वे गुर्दे की शिथिलता (गैस्ट्रोएंटेराइटिस, जलन, डायबीटिक कीटोएसिडोसिस, हेमोलिटिक एनीमिया आदि) और गुर्दे की बीमारियों (स्तवकवृक्क शोथ द्विपक्षीय रीनल ट्यूबरकुलोसिस) और यकृत रोगों (यकृत सिरोसिस) के कारण होता हैं।

गुर्दे की शिथिलता और गुर्दे की बीमारियों के मामले में, गुर्दे में एक रक्त प्रवाह में कमी और कोशिकास्तवक निस्पंदन दर (glomerular filtration rate, GFR) में कमी के कारण रक्त यूरिया का प्रतिधारण होता है, जबकि यकृत रोगों में संश्लेषण में कमी के कारण रक्त यूरिया का स्तर नीचे चला जाता है। GFR और गुर्दे की बीमारी को गंभीरता के बीच एक अच्छा संबंध पाया गया है। उच्च प्रोटीन आहार, भुखमरी मांसपेशियों में कसाव, व्यायाम और दवाओं के कारण भी यूरिया का उच्च स्तर हो जाता है।

यूरिया नाइट्रोजन की माप के लिये उपलब्ध विधियां या तो और एन्जाइमेटिक या एंजाइमेटिक हैं। पूर्व श्रेणी में, यूरिया का आसन्न किटोनिक समूहों को रखने वाले यौगिकों के साथ संघनन रंगीन मात्रात्मक उत्पादों के लिये एक उदाहरण है जबकि बाद की विधियां अमोनिया और यूरिया के लिये यूरिऐज द्वारा यूरिया के विशिष्ट अपघटन पर आधारित हैं। उत्पादों को विभिन्न तरीकों से परख लिया जाता है। इस प्रयोगशाला अभ्यास में, आप डायसेटाइलमोनोक्साइम विधि द्वारा सीरम यूरिया का आंकलन करना सीखेंगे।

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

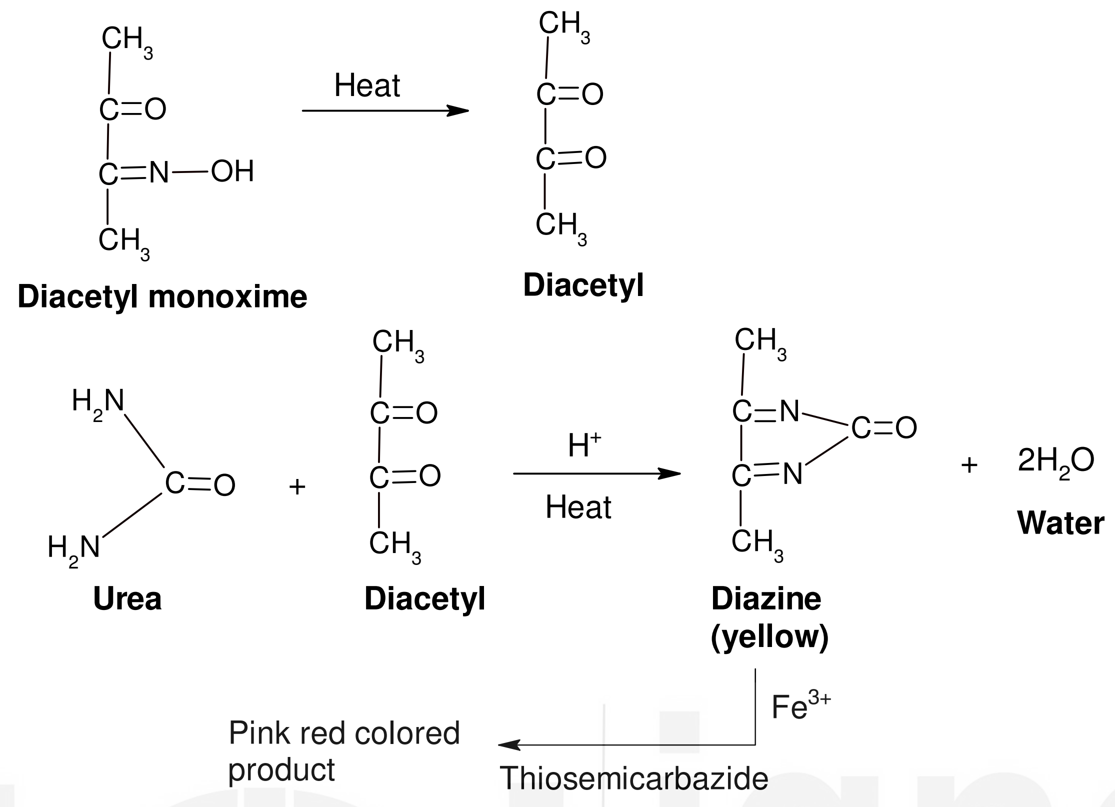
इस प्रयोग का अध्ययन और प्रदर्शन करने के बाद, आपको निम्नलिखित में सक्षम होना चाहिए :

- ❖ रक्त से सीरम को अलग करने में;
- ❖ प्रोटीनमुक्त सीरम तैयार करना और यूरिया का आंकलन करने में;
- ❖ प्रयुक्त वर्णमिति पद्धति के सिद्धांत की व्याख्या कर सकने में;
- ❖ डायसेटाइलमोनोक्साइम विधि की सीमाओं को इंगित कर सकने में; और
- ❖ सीरम यूरिया परिमापन के नैदानिक महत्व की व्याख्या कर सकने में।

2.2 सिद्धांत

डायसेटाइमलमोनोक्साइम विधि यूरिया के उस गुण पर आधारित है जिसमें डायसेटाइमलमोनोक्साइम के रूप में आसन्न किटोनिक समूहों वाले यौगिकों के साथ गर्म होने पर संक्षेपण अभिक्रिया होती है (चित्र 2.1) । गुलाबी/लाल डायजाइन व्युत्पन्न एक अम्लीय माध्यम में निर्मित होता है जिसकी तीव्रता प्रोटीनमुक्त सीरम नमूने में यूरिया की सांद्रता के सीधे आनुपातिक होती है। थियोसेमीकार्बाजाइड और फेरिक आयनों की उपस्थिति में रंग को और बढ़ाया जाता है। 550 nm पर अवशोषण को मापकर क्रोमोजेन की मात्रा निर्धारित की जाती है। आजकल अंधिकाश विधियाँ स्वचालित है और स्व–विश्लेषकों में उपयोग के लिये संशोधित की गई हैं।

अभिक्रिया निम्न प्रकार से वर्णित है**:**



चित्र 2.1 : यूरिया मापने के लिये डाइएसिटिल अथवा फिरोन अभिक्रिया।

2.3 आवश्यक सामग्री

1. ट्राइक्लोरोएसीटिक अम्ल [पानी में 10 प्रतिशत (w / v)]

100 मिलीलीटर द्विक आसुत जल में 10 ग्राम ट्राइक्लोरोएसीटिक अम्ल को घोलें और 4°C पर संग्रहित करें।

2. सल्फ्यूरिक अम्ल [पानी में 20 प्रतिशत (v / v)]

एक बीकर में 80 मिलीलीटर द्विक आसुत जल लें और उसमें 20 मिलीलीटर सल्फ्यूरिक अम्ल मिलाएं।

3. फेरिक क्लोराइड–फॉस्फोरिक अम्ल अभिकर्मक

3.24 ग्राम फेरिक क्लोराइड को ऑर्थो–फास्फोरिक अम्ल (56%) में घोलें। इसका आयतन 100 ml करें। भूरे रंग की बोतल में संग्रहित करें (प्रकाश से बचाएं)।

4. मिश्रित अम्ल अभिकर्मक

फेरिक क्लोराइड फॉस्फोरिक अम्ल अभिकर्मक और 20 प्रतिशत सल्फ्यूरिक अम्ल को 1: 1000 (20 प्रतिशत सल्फ्यूरिक अम्ल के एक लीटर में 1 मिलीलीटर फेरिक क्लोराइड फॉस्फोरिक अम्ल अभिकर्मक) के अनुपात में मिलाएं। उपयोग से पहले नया बनाएं।

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

5. डाइएसिटिल मोनोऑक्सिम अभिकर्मक

100 मिलीलीटर पानी में 0.7 ग्राम डाइएसिटिल मोनोऑक्सिम को घोलें।

6. थायो–सेमीकार्बाजाइड घोल

100 मिलीलीटर पानी में थायो–सेमीकार्बाजाइड की 18 मिलीग्राम मात्रा घोलें। भूरे रंग की बोतल में संग्रहित करें (प्रकाश से बचाएं)।

7. यूरिया (1 mg/ml संग्रहित मानक) घोल

द्विक आसुत जल में शुद्ध यूरिया क्रिस्टल के 100 मिलीग्राम घोलें और आयतन 100 मिलीलीटर करें।

क्रियाशील यूरिया मानक (1 mg/dl)। द्विक आसुत जल के साथ 1 मिलीलीटर **संग्रहित मानक** की 100 मिलीलीटर तक तनुता करें।

8. प्रशीतित अपकेन्द्रण यंत्र (Refrigerated centrifuge) या माइक्रोफ्यूज

9. वर्णमापी या स्पेक्ट्रमवर्णमापी

10. भंवर मिक्सर

11. परखनली

12. एपपेनडॉर्फ नली (Eppendorf tube) और नलिका (pipette)

2.4 संलेख

पूरी प्रयोगात्मक प्रक्रिया निम्नलिखित तरीके से की जाती है :

(क) रक्त से सीरम का पृथक्करण

(i) रक्त को फ्लोराइड की शीशी में एकत्र करें और दो से तीन बार धीरे से हिलायें।

(ii) एकत्रित रक्त को कमरे के तापमान पर 30 मिनट के लिये बिना हिलाए छोड़ दें ताकि रक्त जम जाये।

(iii) एपेंड़ॉर्फ नलियों (2 ml) में जमे हुये रक्त को स्थानांतरित करें और 1000 g (4°C) पर 10 मिनट के लिये अपकेन्द्रित करें।

(iv) अपकेन्द्रित करने के बाद, ऊपरी हल्के पीले रंग के द्रव्य (सीरम) को स्वच्छ परखनली द्वारा 2 ml एपेड़ॉर्फ नली में अलग करें।

(ख) प्रोटीन मुक्त निस्यंद बनाना

(i) एक साफ, सूखे, परखनली में 0.2 मिलीलीटर सीरम लें। (ii) 6.8 मिलीलीटर द्विक आसुत जल डालें और अच्छी तरह से मिलाएं। (iii) 10 प्रतिशत TCA का 3 मिलीलीटर डालें और फिर धीरे से मिलाएं। इसे 10 मिनट के लिए छोड़ दें (iv) व्हाटमैन नं० 1 निस्यंदन पेपर के जरिये एक सूखे, परखनली में निस्यंदन कर लें। प्रोटीन मुक्त निस्यंद का उपयोग दिए गए रक्त के नमूने में यूरिया के निर्धारण के लिए किया जाता है।

(ग) प्रोटीन मुक्त निस्यंद से सीरम यूरिया का परिमापन

(i) तीन स्वच्छ और सुखी परखनली लें।

(ii) इन परखनलीयों को परीक्षण (T) मानक (S) और रिक्त (B) के रूप में चिह्नित करें।

(iiii) 1.0 मिलीलीटर प्रोटीन मुक्त निस्यंद परीक्षण (T) नली में डालें।

(iv) 1.0 मिलीलीटर यूरिया को मानक (S) नली में डालें।

(v) 1.0 मिलीलीटर द्विक आसुत जल को रिक्त (B) नली में डालें।

(vi) सभी नलीयों परीक्षण (T) मानक (S) और रिक्त (B), में 1.० मिलीलीटर डाइएसिटिल मोनोऑक्सिम डालें।

(vii) सभी नलीयों परीक्षण (T) मानक (S) और रिक्त (B), में 1.0 मिलीलीटर थायोसेमीकार्बाजाइड डालें।

(viii) सभी नलीयों [परीक्षण (T) मानक (S) और रिक्त (B)] में 3.0 मिलीलीटर मिश्रित अम्ल अभिकर्मक डालें।

(ix) प्रत्येक नली की सामग्री को अच्छी तरह मिलाएं। प्रत्येक नली के ऊपर एल्यूमीनियम पर्ण के टुकड़े रखें और पर्ण को लपेट करके छोर कैप बना लें।

(x) तीनो नलीयों को उबलते जल ऊष्मक (100 °C) में ठीक 15 मिनट के लिए रखें। ठंडे पानी की एक धारा के नीचे या ठंडे पानी वाले बीकर में तुरंत ठंडा करें।

(xi) 540 nm पर अवशोषण लें। 15 मिनट के अंदर अवशोषण लें क्योंकि उत्पादित रंग बहुत स्थिर नहीं है।

2.5 अवलोकन और परिणाम

अवलोकन निम्नलिखित तरीके से दर्ज किया जायेगा:

क्र०सं०	अभिकर्मक विलयन	परीक्षण (T)	मानक (S)	रिक्त (B)	540 nm पर अवशोषण
1.	प्रोटीन मुक्त निस्यंद	1.0	-	-	
2.	मानक यूरिया विलयन	-	1.0	-	
3.	द्विक आसुत जल	-	-	1.0	
4.	डाइएसिटिल मोनोऑक्सिम	1.0	1.0	1.0	
5.	थायो–सेमीकार्बाजाइड	1.0	1.0	1.0	
6.	मिश्रित अम्ल अभिकर्मक	3.0	3.0	3.0	

गणना निम्नलिखित तरीके से की जाती है:

रक्त में यूरिया की सांद्रता (मिलीग्राम / 100 मिलीलीटर)

$$= \frac{\text{'परीक्षण' (T) का अवशोषण}}{\text{मानक (S) का अवशोषण}} \times \frac{\text{मानक (S) की सांद्रता}}{\text{परीक्षण (T) का आयतन}} \times 100$$

$$= \frac{E_{(T)} - E_{(C)}}{E_{(C)} - E_{(B)}} \times \frac{0.01}{0.02} \times 100$$

$$= \frac{E_{(T)} - E_{(C)}}{E_{(C)} - E_{(B)}} \times 50$$

E = विलोपन मान

सामान्य यूरिया स्तर 10–4० मिलिग्राम / 100 मिलीलीटर। यह स्तर महिलाओं के मुकाबले पुरूषों में अधिक होता है।

यूरिया का कुल दैनिक उत्सर्जन 30–40 ग्राम दिये गए संदर्भ के आधार पर अपने परिणामों की व्याख्या करें।

2.6 सावधानियां

1. रक्त संग्रह के दौरान, हीमोलिसिस के किसी भी कारण से बचें।

2. उबलते जल ऊष्मक पर नलीयों को जरूरत से ज्यादा गर्म करने से बचना चाहिए।

3. सभी अभिकर्मक नया बनाएं जो प्रयोगों के लिए उपयोग किए जाते हैं।

4. सभी अवशोषण (पढ़ना) नमूनों के अभिकर्मक मिश्रण के ठंडा होने के बाद 15 मिनट के भीतर लिया जाना चाहिए।

5. सभी अम्लों को सावधानीपूर्वक बरतें और किसी भी दुर्घटना के प्रबंधन हेतु फर्स्ट एड (first-aid) तैयार रखें।

बोध प्रश्न

प्रश्न 1: सीरम यूरिया सांद्रता द्वारा किस प्रकार के संतुलन को दर्शाया जाता है?

प्रश्न 2: सीरम यूरिया परिमापन का नैदानिक महत्व बताइए?

उत्तर

उत्तर 1: सीरम यूरिया सांद्रता द्वारा यकृत में यूरिया उत्पादन और वृक्क में यूरिया निष्कासन के बीच संतुलन को दर्शाया जाता है।

उत्तर 2: सीरम में यूरिया का उच्चतम स्तर विकसित वृक्क की बीमारी के साथ मूत्र में यूरिया के निष्कासन में कमी और केशिकास्तवक निस्यंदन दर (GFR) में उल्लेखनीय कमी के कारण होता है।

प्रयोग 3

सीरम यूरिक अम्ल का आकलन

रूपरेखा

3.1 प्रस्तावना

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

3.2 सिद्धांत

3.3 आवश्यक सामग्री

3.4 संलेख

3.5 अवलोकन और परिणाम

3.6 सावधानियां

3.1 प्रस्तावना

आपको अमीनो अम्ल और न्यूक्लियोटाइड उपापचय पर मूल पाठ्यक्रम (BBCCT-113) की इकाई 11 (खंड 4) से याद होगा कि यूरिक अम्ल (2, 6, 8 ट्राइहाइड्रॉक्सीप्यूरिन) मनुष्यों और अन्य मनुष्य–सदृश जानवरों के परिवार (primates) में प्यूरिन अपचय का अंतिम उत्पाद है। सीरम में यूरिक अम्ल का स्तर बहिर्जात (आहार) और अंतर्जात प्यूरिन (डी नोवो संश्लेषण और ऊतक न्यूक्लिक अम्ल के पण्यावर्त से व्युत्पन्न), मूत्र उत्सर्जन और आंतों के यूरिकोलिसिस पर निर्भर होता है। मनुष्यों में लगभग सभी आहार प्यूरिन यूरिक अम्ल में परिवर्तित हो जाते हैं। यह एक दुर्बल अम्ल है जो शारीरिक पीएच (pH) पर सोडियम यूरेट के रूप में मौजूद होता है और मूत्र में पाए जाने वाले अम्लीय पीएच (pH 5.75) पर अनायनित यूरिक अम्ल में बदल जाता है; लवण अम्ल से अधिक घुलनशील होता है। दिलचस्प बात यह है कि 37°C पर प्लाज्मा में यूरेट की घुलनशीलता वयस्कों में यूरेट की उच्च सीमा के करीब होती है। यूरिक अम्ल के उत्सर्जन के लिए वृक्क (कुल का ⅔-¾) प्रमुख जगह है और बाकी (⅓-1/4) को आंत के वनस्पतियों (gut flora) द्वारा उत्प्रेरित यूरिकोलिसिस द्वारा प्रवृत किया जाता है। वृक्क द्वारा उत्सर्जन कोशिकास्तवक निस्पंदन (glomerular filtration), समीपस्थ टयूबलर पुनःअवशोषण (tubular reabsorption) स्राव और पश्च स्रावी (post secretory) पुनःअवशोषण के इष्टतम कार्य पर निर्भर होता है।

सीरम में यूरिक अम्ल (हाइपरयूरिसीमिया; >8 mg/dL) का उच्च स्तर गठिया, लेश नाहन सिंड्रोम (LNS), मधुमेह, उच्च कोलेस्ट्रॉल, मोटापा, वृक्क और हृदय रोग आदि से जुड़ा हुआ है। आप गठिया और एलएनएस के विस्तृत विवरण के लिए मूल पाठ्यक्रम (BBCCT-113) की इकाई 12 का भी उल्लेख कर सकते हैं। अधिकांश लोगों में यूरिक अम्ल के वृक्कीय प्रबंधन में दोष होता है जो उम्र से संबंधित हो सकता है या वृक्कीय

बीमारियों, दवाओं (जैसे सैलिसिलेट और मूत्रवर्धक की कम खुराक) और मधुमेह रोगियों और लैक्टिक अम्लरक्तता (lactic acidosis) में उत्पादित कार्बनिक अम्लों के कारण हो सकता है। कैंसर रोगियों या अन्य स्थितियों में रसोचिकित्सा (chemotherapy) के दौरान बढ़ी हुई कोशिका मृत्यु के परिणामस्वरूप भी उच्च यूरिक अम्ल होता है।

जब सीरम यूरेट सान्द्रता <2 mg/dL होती है तो स्थिति को हाइपोयूरिसीमिया कहा जाता है। यह आम तौर पर अलक्षणी है और घातक बीमारियों, यकृत विकारों (सिरोसिस), कुल मूल पोषण और कुछ दवाओं (जैसे सैलिसिलेट्स और एलोप्यूरिनॉल की उच्च खुराक) के परिणामस्वरूप हो सकता है जो गुर्दे के पुनः अवशोषण को कम करते हैं।

आमतौर पर यूरिक अम्ल के स्तर का अनुमान लगाने के लिए जिन तरीकों का इस्तेमाल किया जाता है, वे या तो गैर एंजाइमेटिक या एंजाइमेटिक होते हैं; दो में से पहला अति आंकलन देता है क्योंकि वे अन्य पदार्थों का भी पता लगाते हैं जबकि बाद वाले यूरिक अम्ल के लिए विशिष्ट होते हैं। एंजाइमी विधियाँ ऑक्सीकरण (oxidation) आधारित होती हैं जिसमें पहला चरण यूरेट का यूरिकेज द्वारा एलेन्टॉइन में विशिष्ट ऑक्सीकरण होता है। 293 nm पर यूरेट के अंतर अवशोषण का शोषण करके या परऑक्सीडेज़ और एक वर्णकोत्पादक (chromogen) का उपयोग करके युग्मित परख द्वारा एलेन्टॉइन के गठन का स्पेक्ट्रमी प्रकाशमिति विश्लेषण किया जा सकता है। इस अभ्यास में हम फॉस्फो टंगस्टेट विधि का प्रयोग करेंगे।

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

इस प्रयोग का अध्ययन और प्रदर्शन करने के बाद, आपको निम्नलिखित में सक्षम होना चाहिए :

- ❖ प्रयुक्त वर्णमिति (colorimetric method) पद्धति के सिद्धांत की व्याख्या करने में;
- ❖ परख के लिए अभिकर्मकों को तैयार करने में;
- ❖ यूरिक अम्ल का परिमापन करने में;
- ❖ यूरिक अम्ल की सांद्रता mg/dL करने मे;
- ❖ रोगी की संभावित स्थिति की व्याख्या करने में।

3.2 सिद्धांत

फॉस्फो टंगस्टेट (वेंडेल टी. कैरवे, 1955) विधि यूरिक अम्ल परिमापन का एक लोकप्रिय संतुलनांक परख (end point assay) है। प्रोटीन मुक्त सीरम में मौजूद यूरिक अम्ल क्षारीय माध्यम में फॉस्फोटंगस्टिक अम्ल को एक नीले रंग के रंगीन वर्णकोत्पादक–टंगस्टन में अपचयन कर देता है। नीले रंग की तीव्रता को स्पेक्ट्रमी प्रकाशमिति से 660 एनएम पर मापा जा सकता है और यह नमूने में यूरिक अम्ल की सांद्रता के सीधे आनुपातिक है। अवशोषण 15 mg/dL तक रैखिक है। यह विधि विशिष्ट नहीं है क्योंकि अंतर्जात सीरम घटक जैसे विटामिन सी, ग्लूटाथायोन और सिस्टीन हस्तक्षेप करने वाले पदार्थ हैं।

3.3 आवश्यक सामग्री

1. **संग्रहित** फॉलिन अभिकर्मक को एक पश्चवाही संघनित्र (reflux condenser) के साथ लगे एक लीटर फ्लास्क में 1 ग्राम सोडियम टंगस्टेट, 20 ग्राम फॉस्फोमोलिब्डिक अम्ल और 750 मिलीलीटर पानी स्थानांतरित करके तैयार किया जाता है। 10 घंटे के लिए पश्चवाही करें और फिर कमरे के तापमान पर ठंडा करें। 1 लीटर आयतनमितीय फ्लॉस्क (volumetric flask) में मिलाने के साथ विलयन को स्थानांतरित करें और आयतन को लीटर तक बना लें। अभिकर्मक को एक भूरे रंग की बोतल में संचित करें।

   क्रियाशील फॉलिन अभिकर्मक (Working Folin's Reagent) : 10 ml संग्रहित अभिकर्मक को 100 ml आयतनमितीय फ्लॉस्क में लें और आयतन 100 ml करें। सामग्री को अच्छी तरह मिलाएं।

2. ट्राइक्लोरोएसीटिक अम्ल (20% w/v) : आसुत जल में 20 ग्राम ट्राइक्लोरोएसीटिक अम्ल घोलें और आयतन 100 मिली करें।

3. सोडियम कार्बोनेट विलयन : आसुत जल में सोडियम कार्बोनेट का संतृप्त विलयन बनाइए।

4. मानक यूरिक अम्ल (20 mg/dL) : 20 मिलीग्राम यूरिक अम्ल का वजन करें, इसे आयतनमितीय फ्लॉस्क में स्थानांतरित करें, 50 मिलीलीटर पानी और लिथियम कार्बोनेट (0.3%) या 0.5N NaOH की कुछ बूंदे मिलाएं। मिश्रित करें और यूरिक अम्ल को घुलने दें, यदि आवश्यक हो तो 60°C पर गर्म करें। आयतन को 100 मिलीलीटर तक बनाएं। ताजा तैयार घोल का प्रयोग करें।

   क्रियाशील विलयन (20 mg/L, 2 mg/dL) : संग्रहित विलयन के 1 मिलीलीटर को 0.3% लिथियम कार्बोनेट विलयन (परिरक्षी तनुकारी) (preservative diluent) के साथ 10 मिलीलीटर में तनु (dilute) करें।

5. प्रशीतित अपकेन्द्रण यंत्र (Refrigerated centrifuge) या माइक्रोफ्यूज

6. वर्णमापी (Colorimeter) या स्पेक्ट्रमवर्णमापी (Spectrophotometer)

7. भ्रमिल मिश्रिक (Vortex mixer)

8. परखनली (Test tubes)

9. एपपेनडॉर्फ नली (Eppendorf tube) और नलिका (pipette)

3.4 संलेख

(क) सीरम नमूने का प्रक्रमण (Processing of serum* sample)

सीरम नमूने को 1.5 मिलीलीटर के एक अपकेंद्रित्र नली में डालें। फिर 1.5 मिलीलीटर आसुत जल और 1, 5 मिलीलीटर 20% टीसीए (TCA) विलयन डालें। सामग्री को भ्रमिल से अच्छी तरह मिलाएं। 5 मिनट के लिए नली को बिना किसी रूकावट के छोड़

दें। 10 मिनट के लिए 3000 rpm पर अपकेंद्रित्र करें। आगे के विश्लेषण के लिए टी लेबल वाली नली में अधिप्लवी (supernatant) के मिलीलीटर डालें।

*रक्त से सीरम को अलग करने के लिए प्रयोग 2 का संदर्भ लें।

(ख) यूरिक अम्ल परिमापन (Uric acid estimation)

निम्नलिखित अभिकर्मकों (तालिका 3.1) को खाली (B), परीक्षण (T) और मानक (S) लेबल वाली साफ, सूखी परखनली में नलिका से डालें।

तालिका 3.1 : यूरिक अम्ल के परिमापन के लिए परिवर्धन

अभिकर्मक	खाली (mL)	परीक्षण (mL)	मानक (mL)
परीक्षण अधिप्लवी		3.0	
मानक यूरिक अम्ल			1.0
TCA विलयन	1.0		1.0
आसुत जल	2.0		1.0
संतृप्त सोडियम कार्बोनेट विलयन	1.5	1.5	1.5
तनुकृत फोलिन अभिकर्मक	1.0	1.0	1.0
अच्छी तरह मिलाएं और 37 डिग्री सेल्सियस पर 10 मिनट के लिए ऊष्मायन (incubate) करें।			

3.5 अवलोकन और परिणाम

(क) 540 nm पर परीक्षण नमूने के बाद मानक के अवशोषण को अभिलेखबद्ध करें।

(ख) परिणामों की गणना करें।

सीरम/प्लाज्मा यूरिक अम्ल सांद्रता (mg/dL) की गणना नीचे दिए गए सूत्र का उपयोग करके की जा सकती है :

$$= \frac{\text{टेस्ट का अवशोषण}}{\text{मानक का अवशोषण}} \times \text{मानक की सांद्रता (mg/dL)}$$

$$= \frac{(E(T)-E(B))}{(E(S)-E(B))} \times 2$$

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

E = विलोपन मान (Extinction value)

संदर्भ मान (Reerence Values) :

- पूर्व–यौवन : 3.6 mg/dL
- पुरूष : 3.5-7 mg/dL
- महिला : 2.4-6 mg/dL
- मूत्र : 250-750 mg/dL (उच्च सीमा अभी भी एक प्यूरिन अप्रतिबंधित आहार पर अधिक हो सकती है।)

ध्यान दें कि यूरिक अम्ल का स्तर उम्र आर लिंग से प्रभावित होता है। ये मान मुख्य रूप से उपयोग की जाने वाली विधि के आधार पर प्रयोगशाला से प्रयोगशाला में भिन्न हो सकते हैं।

3.6 सावधानियां

(i) यदि पानी के मुकाबले यूरिक अम्ल अभिकर्मक का अवशोषण 0.2 से अधिक है, तो अभिकर्मक को फेंक दें।

(ii) यदि यूरिक अम्ल की सांद्रता 15 mg/dL से अधिक है, तो नमूने को उचित रूप से तनु करने के बाद परख दोहराएं। अंतिम परिणाम प्राप्त करने के लिए तनुता गुणक (dilution factor) से गुणा करें।

(iii) आविल विलयन (turbid solutions) का निरीक्षण करें और फेंक दें। खाली (Blank) लगभग बेरंग होना चाहिए।

(iv) यूरिक अम्ल का स्तर आहार से बढ़ जाता है जैसे कि रेड मीट का सेवन और उपचार कुछ दवाओं (थियाजाइड और सैलिसिलेट) के साथ किया जाता है।

(v) लिपेमिक और बढ़े हुए बिलीरूबिन के नमूनों से बचना चाहिए।

बोध प्रश्न

प्रश्न 1. प्यूरिन अप्रतिबंधित आहार पर मनुष्यों में यूरेट का उत्सर्जन बढ़ जाता है, क्यों?

प्रश्न 2. यूरिक अम्ल की घुलनशीलता पीएच (pH) पर निर्भर है। व्याख्या कीजिये।

प्रश्न 3. दो स्थितियों का संकेत दें जिनके परिणामस्वरूप क्रमशः हाइपर– और हाइपो–यूरिसीमिया होता है।

उत्तर

उत्तर 1. लगभग सभी आहार प्यूरिन अम्ल में निम्नीकृत हो जाते हैं। उनका उपयाग ऊतक न्यूक्लिक अम्ल के संश्लेषण के लिए नहीं किया जाता है।

उत्तर 2. यूरिक अम्ल की तुलना में यूरेट की घुलनशीलता अधिक होती है। पीएच 7.5 पर इसका अधिकांश भाग मोनोसोडियम यूरेट के रूप में मौजूद है और प्लाज्मा में प्रमुख रूप है। मूत्र का पीएच अम्लीय (पीएच 5.7) होता है जिस पर यह प्रोटोनित होता है।

उत्तर 3. (i) हाइपर–यूरिसीमिया – वात–रोग, वृक्क रोग, मधुमेह

(ii) हाइपो–यूरिसीमिया–यकृत, सिरोसिस, सैलिसिलेट की उच्च खुराक

ignou
THE PEOPLE'S
UNIVERSITY

प्रयोग 4

सीरम क्रिएटिनिन का आंकलन

रूपरेखा

4.1 प्रस्तावना

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

4.2 सिद्धांत

4.3 आवश्यक सामग्री

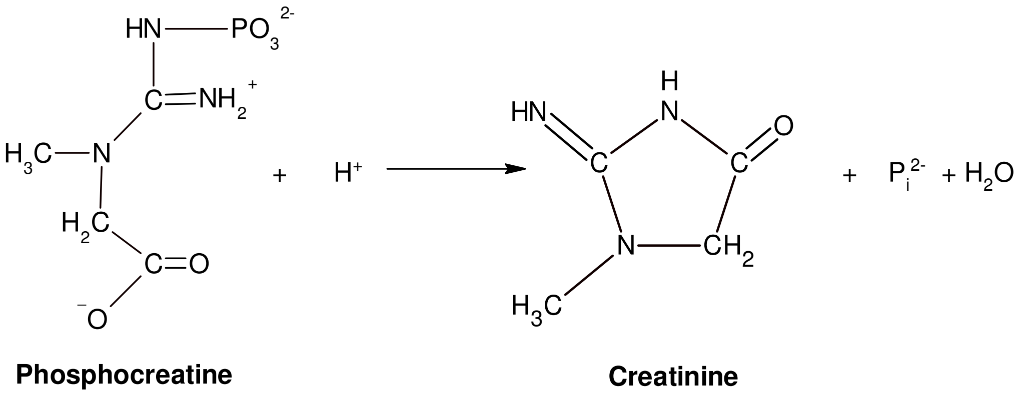
4.4 संलेख

4.5 अवलोकन और परिणाम

4.6 सावधानियां

4.1 प्रस्तावना

आप अमीनो अम्ल और न्यूक्लियोटाइड उपापचय (metabolism) के मुख्य पाठ्यांक (BBCCT-113) के खंड 3 की इकाई 6 से स्मरण कर सकते हैं कि क्रिएटिन मुख्य रूप से तीन अमीनोअम्ल जैसे कि आर्जिनिन, ग्लाइसिन और मेथियोनिन से यकृत में निर्मित होता है। यह मांसपेशियों द्वारा लगभग पूरी तरह से लिया जाता है और ऊर्जा समृद्ध यौगिक क्रिएटिन फॉस्फेट के रूप में संग्रहित किया जाता है। मांसपेशियों के संकुचन की शारीरिक प्रक्रिया के दौरान क्रिएटिन फॉस्फेट क्रिएटिन काइनेज द्वारा उत्प्रेरित अभिक्रिया में ATP के संश्लेषण के लिए फॉस्फोरिल दाता है। प्रत्येक दिन, मांसपेशी क्रिएटिन/क्रिएटिन फॉस्फेट का 1% से 2% गैर–एंजाइमिक अपरिवर्तनीय तरीके से अंदर एनहाइड्राइड क्रिएटिनिन में बदल जाता है और उत्सर्जित हो जाता है (चित्र 4.1)। उत्पादित क्रिएटिनिन की मात्रा कुल मांसपेशी द्रव्यमान से संबंधित होती है जो दिन–प्रतिदिन बहुत कम बदलती है।



चित्र 4.1 : गैर–एंजाइमिक तरीके से क्रिएटिन/क्रिएटिन फॉस्फेट का क्रिएटिनिन में बदलना।

जैसा कि आप जानते हैं कि वृक्क रक्त को निस्पंदन करते हैं और इसलिए क्रिएटिनिन रक्त से हटा कर मूत्र में उत्सर्जित होता है। रक्त में आमतौर पर कम क्रिएटिनिन होता है क्योंकि यह गुर्दे द्वारा तेजी से निकाल दिया जाता है। यह मूत्र प्रवाह दर से पुनः अवशोषित या प्रभावित नहीं होता है। क्रिएटिनिन मूत्र में उत्सर्जित गर प्रोटीन नाइट्रोजन (NPN) पदार्थों में से एक है। क्रिएटिनिन निकासी के मापन का उपयोग कोशिकास्तवक निस्पंदन दर (GFR) के एक संकेतक के रूप में किया जाता है, हालांकि इंसुलिन की निकासी अधिक सटीक होती है।

सीरम क्रिएटिनिन का स्तर वृक्क के कार्य का विश्वसनीय संकेतक होता है। उच्च सीरम क्रिएटिनिन (>2 mg/dL) खराब वृक्क कार्य या वृक्क की बीमारी का संकेत देते हैं। दीर्घकालिक वृक्क पात में रक्त में क्रिएटिनिन का मान 30 mg/dL तक जा सकता है।

क्रिएटिनिन आंकलन के लिए दो व्यापक प्रकार के तरीके उपलब्ध है। ये विधियां या तो जाफ अभिक्रिया और इसके सुधार या विशिष्ट एंजाइम अभिक्रियाओं पर आधारित है। गैर जाफ आमापन का एक उदाहरण स्वचालित सूखी स्लाइड विधि है जिसमें उत्पादित अमोनिया को मापा जाता है, जब यह क्रिएटिनिन इमिनो हाइड्रोलेज द्वारा जल अपघटित होता है। यह एक सरल, सटीक और उच्च गतिविधि है। इस अभ्यास में हम जैफ अभिक्रिया द्वारा सीरम क्रिएटिनिन सांद्रता का अनुमान लगाएंगे।

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

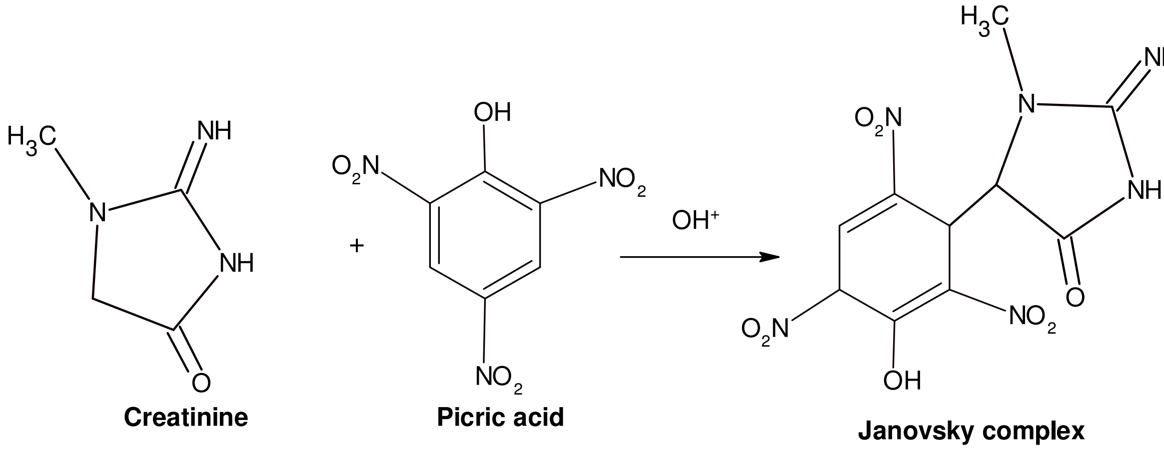
इस प्रयोग का अध्ययन और प्रदर्शन करने के बाद, आपको निम्नलिखित में सक्षम होना चाहिए :

- ❖ क्रिएटिनिन की परख के सिद्धांत का वर्णन कर सकें;
- ❖ इसके परिसीमन और लाभ बता सकें;
- ❖ स्वतंत्र रूप से अभिकर्मकों को तैयार करना सीख सकें;
- ❖ सीरम नमूने में प्रयोग कर पायें तथा मूत्र नमूने के साथ दोहरा पायें;
- ❖ सीरम क्रिएटिनिन का परिमापन कर सकें और
- ❖ रोगी की स्थिति को परख पायें।

4.2 सिद्धांत

विश्लेषण के विकास के बावजूद यह एक बहुत ही लोकप्रिय तरीका है क्योंकि यह एक सरल, कम लागत वाली अभिक्रिया है।

जाफ अभिक्रिया में, 1:1 पीले–नारंगी रंग का जानोवस्की मिश्रण मिथाइलीन समूह या क्रिएटिनिन के एनोलाइज्ड कार्बोनिल समूह का पिक्रेट ऋणायन के मेटापोजिशन के साथ बनता है (चित्र 4.2)। रंग की तीव्रता क्रिएटिनिन की सांद्रता के अनुपात में पाई जाती है, जिसे 540 nm पर मापा जाता है।



चित्र 4.2 : जाफ अभिक्रिया।

क्षारीय पिक्रेट विधि गैर–विशिष्ट है और कई गैर क्रिएटिनिन क्रोमोजेन्स जैसे एसीटोएसेटेट, विटामिन सी, पाइरूवेट, ग्लूकोज, बार्बिचुरेटस, सेफलोस्पोरिन एंटीबायोटिक्स, यूरिक अम्ल, यूरिया और प्रोटीन के हस्तक्षेप के अधीन है। ये पदार्थ या तो स्थितियों के आधार पर रंग के लुप्त होने या वृद्धि का कारण बन सकते हैं। जाफ अभिक्रिया pH और तापमान परिवर्तन के प्रति भी संवेदनशील है और उष्मायन समय से प्रभावित होती है। जाफ अभिक्रिया के लिये कोई मानक संलेख नहीं है। हालांकि गैर विशिष्टता को कम करने के लिये अनुकूलन विकसित किये गए हैं।

4.3 आवष्यक सामग्री

1. सोडियम हाइड्रॉक्साइड [NaOH] (0.75 N)

   द्विक आसुत जल में 30 ग्राम सोडियम हाइड्रॉक्साइड घोलें और आयतन 1 लीटर करें।

2. सोडियम टंगस्टेट [द्विक आसुत जल में 10% (w/v)]

   द्विक आसुत जल में 10 ग्राम सोडियम टंग्स्टेट घोलें और आयतन 100 ml करें।

3. सल्फ्यूरिक अम्ल [H_2SO_4;0.66N]

   18 मिलीलीटर सांद्र सल्फ्यूरिक अम्ल को 200 मिलीलीटर द्विक आसुत जल में मिलायें और फिर द्विक आसुत जल के साथ कुल मात्रा 1 लीटर बनायें।

4. क्रिएटिनिन मानक (संग्रह विलयन) - 1 mg/ml

   0.1 N HCl के 1-3 ml में 50 मिलीग्राम क्रिएटिनिन को घोलें और वॉल्यूमेट्रिक फ्लास्क में द्विक आसुत जल में आयतन 500 ml करें।

   कार्यमानक (0.01 mg/5 ml) : 1 ml संग्रहित विलयन का आसुत जल में 500 ml तनुकरण करें।

5. पिक्रिक अम्ल विलयन [0.04 M]

4.6 ग्राम पिक्रिक अम्ल को 50 ml द्विक आसुत जल में घोलें और आयतन 500 ml करें। पिक्रिक अम्ल आद्रताग्राही (1:2 w/v) है तो दुगुना वजन सावधानीपूर्वक करें।

6. परखनलियाँ

7. ऐव्पेनडार्फ नली

8. वर्णमापक अथवा स्पेक्ट्रमवर्णमापी

4.4 संलेख

(क) प्रोटीन मुक्त सीरम की तैयारी

(i) एक सूखी अपकेंद्रित नली में 1 ml सीरम, 7.0 ml द्विक आसुत जल, 1.0 ml सोडियम टंगस्टेट और 1.0 ml 0.66 N सल्फ्यूरिक अम्ल डालें।

(ii) अच्छी तरह से मिश्रण के बाद 5 मिनट के लिये 3000 RPM पर अपकेंद्रित करें।

(iii) 5 ml का अधिप्लवी एक अलग परखनली में डालें और उसे परीक्षण (T) के नाम से चिन्हित करें जिसमें से क्रिएटिनिन का मापन करें।

(ख) जैफ अभिक्रिया द्वारा सीरम नमूने से क्रिएटिनिन का मापन

(i) तीन प्रकार के परखनलियों को परीक्षण (T) और मानक (S) और रिक्त (B) के रूप में चिन्हित करें। सभी प्रकार के परखनलियों का समरूप बनायें।

(ii) 5.0 मिलीलीटर प्रोटीन मुक्त अधिप्लवी (सीरम) परीक्षण (T) परखनली में डालें। क्रमशः 5.0 मिलीलीटर क्रियाशील मानक (working standard) और 5.0 मिलीलीटर जल मानक रिक्त परखनलियों में स्थानांतरित करें।

(iii) प्रत्येक नली में 2.0 मिलीलीटर पिक्रिक अम्ल विलयन और 2 ml सोडियम हाइड्रॉक्साइड विलयन डालें।

(iv) अच्छी तरह से मिश्रण के बाद परखनलियों को 20 मिनट तक सामान्य तापक्रम पर रखें।

(v) 540 nm पर OD (प्रकाशीय घनत्व) लें।

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

4.5 अवलोकन और परिणाम

प्रयोगात्मक प्रक्रिया का अवलोकन निम्नलिखित तालिका के अनुसार किया जाता है :

परखनली	आसुत जल	मानक क्रिएटिनिन विलयन	प्रोटीन मुक्त निस्पंद (filtrate)	पिक्रिक अम्ल विलयन (0.04M)	सोडियम हाइड्रॉक्साइड [NaOH] (0.75N)	मिश्रण करें और 20 मिनट के लिए सामान्य तापक्रम पर रखें	540 nm पर OD (प्रकाशीय घनत्व) लें
B	5 ml	-	-	2 ml	2 ml		
B	5 ml	-	-	2 ml	2 ml		
S	-	5 ml	-	2 ml	2 ml		
S	-	5 ml	-	2 ml	2 ml		
T	-	-	5 ml	2 ml	2 ml		
T	-	-	5 ml	2 ml	2 ml		

Note : B = रिक्त (Blank), S = मानक (Standard) & T = परीक्षण (Test)

उपरोक्त अवलोकन तालिका के आधार पर, अंतिम परिणाम प्राप्त करने के लिए निम्नलिखित गणना की जाती है :

$$\text{क्रिएटिनिन सांद्रता (mg/dl) है} = \frac{\text{परीक्षण की अवशोषिता}}{\text{मानक की अवशोषिता}} \times \frac{\text{मानक की सांद्रता}}{\text{परीक्षण नमूने का विलयन}}$$

$$= \frac{T-B}{T-B} \times \frac{\text{मानक की सांद्रता}}{\text{परीक्षण नमूने का विलयन}} \times 100$$

$$= \frac{E(T) - E(B)}{E(S) - E(B)} \times \frac{0.01}{0.5} \times 100$$

$$= \frac{E(T) - E(B)}{E(S) - E(B)} \times 2$$

E = विलोपन मान

नोट : 5 ml प्रोटीन मुक्त अधिप्लव में 0.5 ml सीरम होता है।

जैविक संदर्भ श्रेणी

- सीरम क्रिएटिनिन की सामान्य सीमा 0.4 से 1.5 mg/dl , पुरूष : 0.6-1.2; महिलाएं : 0.5-1 mg/dl
- क्रिएटिनिन का सामान्य दैनिक मूत्र उत्सर्जन 1–2 ग्राम श्रेणी होता है।
- सामान्य पुरूष : 14-26 मिलिग्राम / किलोग्राम / दिन , सामान्य मादा : 11-20 मिलीग्राम / किलोग्राम / दिन

4.6 सावधानियां

1. जैफ अभिक्रिया नियंत्रित तापमान और pH के तहत की जानी चाहिये क्योंकि वे रंग विकास को गहराई से प्रभावित करते हैं।
2. 30 मिनट के दौरान ही अवशोषण करें।
3. सल्फ्यूरिक अम्ल कि तनुता (dilution) बहुत सावधानी से करें। सांद्रित सल्फ्यूरिक अम्ल को द्विक आसुत जल में धीरे–धीरे मिलायें।
4. हीड्रोस्कोपिक पदार्थों (NaOH और पिक्रिक अम्ल) को तौलते समय सावधानी बरतें।

बोध प्रश्न

प्रश्न 1 : क्रिएटिन और क्रिएटिनिन में क्या अंतर है?

प्रश्न 2 : मांसपेशियों में क्रिएटिनिन कैसे उत्पन्न होता है?

प्रश्न 3 : सीरम में क्रिएटिनिन परिमापन का नैदानिक महत्व क्या है?

प्रश्न 4 : क्रिएटिनिन का सामान्य दैनिक मूल उत्सर्जन श्रेणी कितनी होती है?

प्रश्न 5 : जाफ विधि के दो लाभ और नुकसान बतायें।

उत्तर

उत्तर 1 : क्रिएटिनिन क्रिएटिन का एनहाइड्राइड रूप है।

उत्तर 2 : मांसपेशियों में, क्रिएटिनिन अपरिवर्तनीय और गैर–एंजाइमेटिक निर्जलीकरण तरीके से क्रिएटिन फॉस्फेट से बनता है।

उत्तर 3 : सीरम क्रिएटिनिन का स्तर वृक्क के कार्य का विश्वसनीय संकेतक माना जाता है। उच्च सीरम क्रिएटिनिन खराब वृक्क या वृक्क के बीमारी का संकेत देते हैं। वृक्क द्वारा अल्प निकासी के कारण क्रिएटिनिन का स्तर रक्त में बढ़ जाता है।

उत्तर 4 : यह श्रेणी 1–2 ग्राम/दिन होती है।

उत्तर 5 : लाभ : सरल और लागत प्रभावी

नुकसान : कठोर नियंत्रित स्थिति की जरूरत होती है और गैर क्रिएटिनिन क्रोमोजेन के साथ सकारात्मक अभिक्रिया देता है।

ignou
THE PEOPLE'S
UNIVERSITY