इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय
विज्ञान विद्यापीठ

BBCCL-120
हार्मोनः जैव रसायन और कार्य (प्रयोगशाला)

प्रयोगों की सूची

प्रयोग 1 मूत्र में ग्लूकोज की मात्रा (ग्लाइकोसुरिया) का निर्धारण	5
प्रयोग 2 सीरम Ca^{2+} का आकलन	10
प्रयोग 3 सीरम T_4 का आकलन	14
प्रयोग 4 एचसीजी आधारित गर्भावस्था परीक्षण	19
प्रयोग 5 सीरम में विद्युत अपघट्यों का आकलन	24

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

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 विश्वविद्याालय

संकाय सदस्य

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

डॉ. परवेश बब्बर
सहायक 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

प्रो. उमेश राय
संपादक
प्रोफेसर एवं विभागाध्यक्ष
जीव विज्ञान विभाग
दिल्ली विश्वविद्यालय
नई दिल्ली

प्रो. अभिलाषा शौरी

लेखक
जैव प्राद्यौगिकी विभाग
मानव रचना इंटरनैश्नल इंस्टिटयूट ऑफ रिसर्च एंड स्टडीज,
फरीदाबाद

हिन्दी अनुवाद :

डॉ. समीर व्यास
वैज्ञानिक, केन्द्रीय मृदा
एवं सामग्री अनुसंधानशाला ,
नई दिल्ली

डॉ. सीमा कालड़ा
इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त
विश्वविद्यालय
नई दिल्ली

पाठ्यक्रम समन्वयक : डॉ. सीमा कालड़ा (Email: seemakalra@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 :

बीबीसीसीएल 120: हार्मोनः जैव रसायन और कार्य

प्रिय शिक्षार्थियों का ''हार्मोनः जैव रसायन और कार्य" के प्रयोगशाला सत्रों में स्वागत है। इस पुस्तिका/मैनुअल में दिए गए प्रयोगशाला अभ्यास और प्रयोग उस पाठ्यक्रम पर आधारित हैं जिसका आपने बीबीसीसीटी–119 में अध्ययन किया है। पूरे सैद्धांतिक कोर्स के दौरान आपको विभिन्न हार्मोनों के पैथोफिज़ियोलॉजी के बारे में सिखाया गया और बताया गया कि ये किस तरह से शरीर के महत्वपूर्ण कार्यों को प्रभावित करते हैं । इन प्रयोगों में, आप कुछ पोषक तत्वों और हार्मोन के आकलन के तरीकों के बारे में जानेंगे क्योंकि उनकी मात्रा में सामान्य से विचलन उनके नियमन में गड़बड़ी का संकेत है।

यह प्रयोगशाला पाठ्यक्रम 2 क्रेडिट का है और इसमें पाँच प्रयोग शामिल हैं। प्रयोगों को इस तरह से अभिकल्पित डिज़ाइन किया गया है कि आप अब तक बताई गई सैद्धांतिक अवधारणाओं का अनुभव और जुड़ाव महसूस कर सकें। यहां उन मूलभूत अवधारणाओं पर भी चर्चा की गई है जिन पर प्रयोगात्मक प्रक्रियाएं आधारित हैं।

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

इस प्रयोगशाला पाठ्यक्रम का व्यापक उद्देश्य आपको निम्न में सक्षम बनाना हैः

- मूत्र में ग्लूकोज़ के स्तर का अनुमान लगाएं ;
- सीरम में कैल्शियम और इलेक्ट्रोलाइट जैसे सोडियम और क्लोराइड के स्तर का अनुमान लगाएं;
- थायराइड हार्मोन T4 के आकलन के आधार की व्याख्या करें; और
- हार्मोन आधारित गर्भावस्था किट का सिद्धांत और अनुप्रयोग लिखिए।

अध्ययन नियमावली

हम आपको सलाह देते हैं कि आप प्रयोगशाला सत्र में भाग लेने के लिए आने से पहले बीबीसीसीटी–119 के संबंधित इकाइयों को दोहरा लें। इससे आप प्रयोग करने के उद्देश्य और उनके अनुप्रयोगों को आसानी से समझ सकेंगे। प्रयोग शुरू करने से पहले आपको इस पाठ्यक्रम के प्रत्येक प्रयोग के सिद्धांत तथा क्रियाविधि को पढ़ना चाहिए। सभी अभिकर्मकों को नए सिरे से तैयार करना चाहिए और उन्हें पूर्व–व्यवस्थित भंडारण स्थितियों के तहत रखना हमेशा अच्छा होता है। सभी सुरक्षा उपायों का पालन करें और अभिकर्मकों को संभालते समय सुरक्षा निर्देशों का ध्यान रखें। अच्छी प्रयोगशाला पद्धतियों में से एक है अपनी लॉग बुक को अप–टू–डेट रखना अर्थात प्रयोग करते समय किए गए प्रेक्षणों को दर्ज करना। प्रयोगशाला सत्रों के दौरान इस प्रयोगशाला पुस्तिका और अपनी लॉग बुक को साथ रखें।

अन्य सभी इग्नू प्रयोगशाला पाठ्यक्रमों की तरह यह एक गहन आवासीय अभ्यास है जिसमें 2 क्रेडिट पूरा करने के लिए एक सप्ताह की आवश्यकता होती है। प्रतिदिन चार–चार घंटे के दो प्रयोगशाला सत्र होंगे। इस तरह कुल 14 सत्र होंगे। पहला सत्र परिचयात्मक होगा और शेष दूसरे से 12 वाँ सत्र पाठ्यक्रम में दिए गए अभ्यासों पर आधारित होगा। पहले सत्र में आपको प्रयोगशाला अभ्यासों का एक ब्यौरा दिया जाएगा। सत्र 1 से 12 में अकादमिक परामर्शदाता की देखरेख में निर्देशित अभ्यास होंगे। अंतिम दो सत्र यानी 13 वीं – 14 वीं बिना मार्गदर्शन/गाइड वाले सत्र होंगे और यह सत्रांत परीक्षा होगी। प्रत्येक सत्र में आपको 3 घंटे के लिए अभ्यास करना होगा और शेष एक घंटे में आपको अपनी प्रायोगिक नोटबुक को पूरा करने की सलाह दी जाती है। सुधार और ग्रेडिंग के लिए प्रयोगशाला नोटबुक परामर्शदाता को प्रस्तुत की जानी चाहिए। प्रयोगों को करने और इसे ठीक से रिकॉर्ड करने के

लिए 70% अंक आवंटित किए गए हैं। आप जानते हैं कि समय की कमी है क्योंकि आपके पास प्रयोगशाला कार्य के लिए सीमित पहुंच होगी; इसलिए, आपको किसी भी प्रयोगशाला सत्र को नहीं छोड़ने की आवश्यकता है।

प्रयोगों के मूल्यांकन का आकलन किया जाएगा और आपको प्रयोगात्मक सत्र के अंत में मौखिक परीक्षा के लिए उपस्थित होना होगा। प्रयोगशाला के अंतिम सत्र में आपको नियत प्रयोग करना होगा, जिसका मुल्यांकन किया जाएगा और साथ ही प्रयोगशाला सत्रों के दौरान निरंतर प्रदर्शन, लॉग बुक और रिकॉर्ड के रखरखाव के आधार पर अंतिम मूल्यांकन होगा, जिसके बाद मौखिक परीक्षा होगी। निर्दिष्ट प्रयोगों के लिए 30% अंक आरक्षित हैं।

प्रयोगशाला उपकरण का उपयोग कैसे करें, इसकी बेहतर समझ के लिए उपलब्धता के अनुसार कुछ वीडियो लिंक प्रदान किए जाएंगे। इस स्व–निर्देशात्मक सामग्री में दी गई प्रक्रिया की तुलना में वीडियो में बताए जा रहे चरणों या प्रक्रिया में थोड़ा अंतर हो सकता है। हालांकि, सिद्धांत और अभिकर्मक समान रहते हैं। इसलिए, प्रक्रिया में अपनाए गए मामूली संशोधनों के बारे में चिंता करने की कोई आवश्यकता नहीं है।

महत्त्वपूर्ण सूचना

- आमतौर पर अध्ययन केंद्र में आयोजित प्रयोगशाला पाठ्यक्रम कार्य में उपस्थिति अनिवार्य है।
- 7 दिनों की अवधि में पूरा करने के लिए प्रयोगशाला पाठ्यक्रम 2 क्रेडिट का है।
- निर्देशित प्रयोगशाला कार्य के 6 दिन।
- बिना निर्देशित प्रयोगशाला कार्य के लिए 1 दिन।
- प्रयोगशाला पाठ्यक्रम को सफलतापूर्वक पूरा करने के लिए आपको निर्देशित एवं बिना निर्देशित घटकों में (कम से कम 35% अंक) अलग–अलग प्राप्त करना होगा।

हम आपको इस प्रयास में शुभकामनाएं देते हैं।

प्रयोग 1

मूत्र में ग्लूकोज की मात्रा (ग्लाइकोसुरिया) का निर्धारण

प्रयोग की रूपरेखा

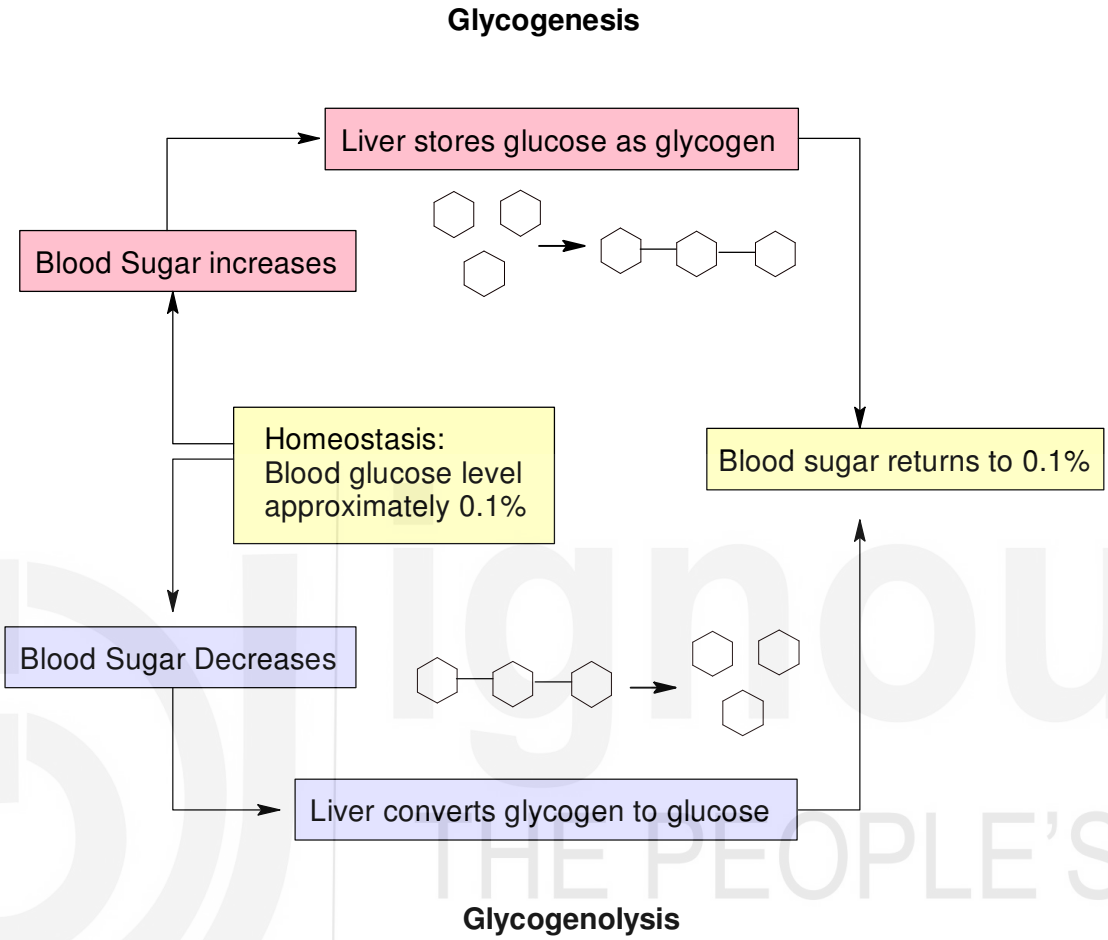
1.1 प्रस्तावना
अपेक्षित अध्ययन परिणाम
1.2 सिद्धांत
1.3 आवश्यक सामग्री
1.4 विधि
1.5 प्रेक्षण और परिणाम
1.6 सावधानियाँ

1.1 प्रस्तावना

ग्लूकोज क्रियाधार ($C_6H_{12}O_6$) मानव शरीर के लिए एक आवश्यक मोनोसैकेराइड है क्योंकि यह प्राथमिक श्वसन क्रियाधार (सब्सट्रेट) है और इस प्रकार सभी कोशिकाओं और ऊतकों के लिए ऊर्जा का महत्त्वपूर्ण स्रोत है। ग्लूकोज आहार से प्राप्त वसा, प्रोटीन और कार्बोहाइड्रेट को अपघटित कर प्राप्त किया जाता है। यह गैर–कार्बोहाइड्रेट सब्सट्रेट जैसे लैक्टिक एसिड, ग्लिसरॉल और ग्लूकोजनिक अमीनो अम्लों से ग्लूकोज नवजनन (ग्लूकोनीओजेनेसिस) के माध्यम से यकृत में जैवसंश्लेषित होता है। ग्लूकोज पूरी तरह से कोशिकीय श्वसन के दौरान ऊर्जा और उपापचयी मध्यवर्ती, जो अन्य उपापचय प्रक्रियाओं में आगे उपयोग किया जाता है, को उत्पन्न करने के लिए ऑक्सीकृत हो जाता है। इस प्रकार, ग्लूकोज उपापचय कोशिका के संपूर्ण शरीर क्रिया विज्ञान में एक आधारी भूमिका निभाता है और सामान्य शरीर उपापचय के लिए केंद्रीय (भूमिका) में है। अतिरिक्त ग्लूकोज, ग्लाइकोजन (जो कि डी–ग्लूकोज का शाखित बहुलक है) के रूप में मुख्य रूप से यकृत में और मांसपेशियों और वसा कोशिकाओं में जमा होता है। यह रक्त के ग्लूकोज स्तर और यकृत बाह्य कोशिकाओं में स्तर के आधार पर आवश्यकता पड़ने पर हेपेटोसाइट से शीघ्रता से गतिशील हो जाता है।

ग्लूकोज समस्थैतिकी (होमियोस्टेसिस) (चित्र 1.1) को अग्नाशयी हार्मोन इंसुलिन और ग्लूकागोन की मदद से दृढ़ता से नियंत्रित किया जाता है, जो रक्त में ग्लूकोज के उचित स्तर को बनाए रखते हैं। उपापचय संबंधी विकार, अंतःस्रावी सिंड्रोम और कुछ अन्य बीमारियों के मामले में ग्लूकोज उपापचय में व्यवधान होता है। ग्लूकोज होमियोस्टेसिस में यह व्यवधान असामान्य रूप से निम्न या उच्च ग्लूकोज स्तर को

प्रदर्शित करने वाली स्थितियों के रूप में प्रकट होता है, जिसे क्रमशः अवग्लूकोजरक्तता (hypoglycermia; हाइपोग्लाइसीमिया) या अतिग्लूकोजरक्तता (hyperglycemia; हाइपरग्लाइसीमिया) कहा जाता है। रक्त में ग्लूकोज के स्तर को निर्धारित करके इन दोनों स्थितियों का आकलन किया जा सकता है।



चित्र 1.1 : नकारात्मक पुनःभरण के माध्यम से रक्त शर्करा का विनियमन।

गुर्दे, तीन प्रक्रियाओं के माध्यम से ग्लूकोज होमियोस्टेसिस को बनाए रखने में महत्त्वपूर्ण भूमिका निभाते हैं : वृक्क वल्कुट (renal cortex, रीनल कोर्टेक्स) में ग्लूकोनवजनन, निस्यंदन (filtration) के दौरान रक्त से ग्लूकोज लेकर, और समीपस्थ वृक्क नलिकाओं में केशिकागुच्छीय निस्यंद (ग्लोमेरूलर फिल्ट्रेट) से ग्लूकोज का पुनः अवशोषण। यदि रक्त शर्करा का स्तर 180 mg/dL तक बना रहता है, तो मूत्र में कोई ग्लूकोज नहीं निकलता है। इस प्रकार, मूत्र में ग्लूकोज की उपस्थिति, जिसे शर्करामेह (ग्लाइकोसुरिया) भी कहा जाता है, सामान्य नहीं है और यह मधुमेह जैसी स्थितियों का संकेत है। ग्लाइकोसुरिया के दौरान, रक्त शर्करा का स्तर भी अधिक होता है, आमतौर पर 180 mg/dL से अधिक। गुर्दे की खराबी या इसका ठीक से कार्य नहीं करना गुर्दे के ग्लाइकोसुरिया का कारण बना सकती है जिसमें मूत्र में ग्लूकोज उत्सर्जित होता है, हालांकि रक्त में ग्लूकोज का स्तर सामान्य होता है।

मूत्र में ग्लूकोज का जैव रासायनिक माप ग्लाइकोसुरिया का निर्धारण करने का एक प्रभावी तरीका है, जो कई उपापचय विकारों और रोगों के पूर्वानुमान में सहायक होता है।

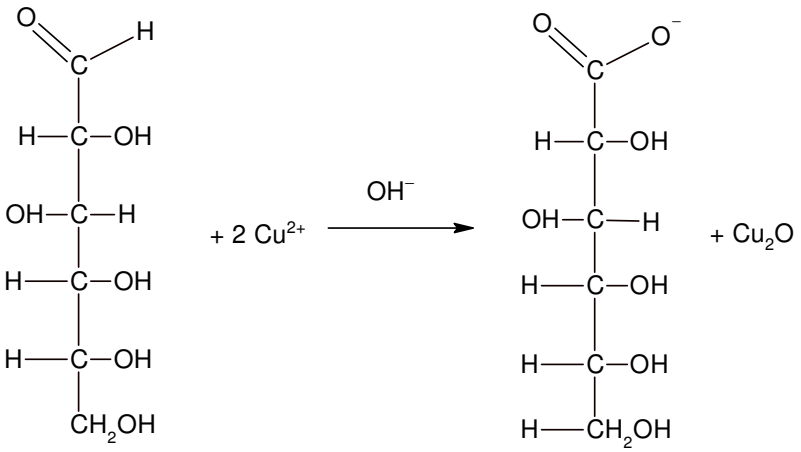
अपेक्षित अध्ययन परिणाम

इस प्रयोग को पढ़ने के बाद आप सक्षम होंगे कि :

- ❖ मूत्र के नमूनों में ग्लूकोज की मात्रा का पता लगाना और उसकी मात्रा निर्धारित करना;
- ❖ अतिग्लूकोजरक्तता स्थिति होने का आकलन करें;
- ❖ अपचायी शर्करा के रूप में ग्लूकोज की जैव रासायनिक प्रकृति को समझें; और
- ❖ उपापचय में अपचयोपचय (redox; रेडाक्स) अभिक्रियाओं में इसकी भूमिका की व्याख्या करें।

1.2 सिद्धांत

ग्लूकोज एक मोनोसेकेराइड और अपचायी शर्करा है, जिसमें एक एल्डिहाइड समूह होता है जो आसानी से एक अपचयोपचय अभिक्रिया से गुजर सकता है। मूत्र के नमूने में ग्लूकोज Cu (II) को Cu (I) में अपचयित कर सकता है, और इस अभिक्रिया का उपयोग मात्रात्मक बेनेडिक्ट अभिकर्मक विधि के माध्यम से ग्लूकोज के प्रमात्रीकरण के लिए किया जाता है। यह विधि गुणात्मक बेनेडिक्ट परीक्षण का थोड़ा संशोधित संस्करण है। मात्रात्मक बेनेडिक्ट अभिकर्मक से सोडियम कार्बोनेट के साथ–साथ कॉपर सल्फेट, पोटेशियम थायोसाइनेट, पोटेशियम फेरिसायनाइड और सोडियम सिट्रेट होते हैं। कॉपर सल्फेट विलयन में Cu (II) आयन देता है, जो कि नमूने में मौजूद ग्लूकोज द्वारा अपचयित किया जाता है, सोडियम कार्बोनेट की थोड़ी सी मात्रा के द्वारा बनाई गई क्षारीय अवस्था में यह क्रिया होती है। सिट्रेट Cu (II) आयनों के साथ कीलेट वलय बनाकर कॉपर कार्बोनेट के अवक्षेप को बनने से रोकता है। पोटैशियम थायोसायनेट, क्यूप्रिक ऑक्साइड के लाल अवक्षेप के स्थान पर क्यूप्रयथायोसाइनेट (CuSCN) का सफेद अवक्षेप बनाता है, जबकि पोटैशियम फेरिसायनाइड कॉपर के पूर्व–ऑक्सीकरण को रोकता है। Cu (II) आयनों के नीले रंग का Cu (I) थायोसाइनेट के सफेद अवक्षेप में परिवर्तन अनुमापन के अंत्य बिंदु को चिह्नित करता है। यह नमूने में ग्लूकोज के मात्रात्मक निर्धारण को सक्षम बनाता है।



चित्र 1.2 : बेनेडिक्ट विलयन के साथ ग्लूकोज की अभिक्रिया।

1.3 आवश्यक सामग्री

रसायन

1.	सोडियम सिट्रेट	100 g
2.	पोटेशियम थायोसाइनेट	162.5 g
3.	कॉपर सल्फेट (18%)	9 g
4.	पोटेशियम फेरिसायनाइड (5%)	0.5 g
5.	सोडियम कार्बोनेट (निर्जल)	2 g
6.	मानक ग्लूकोज विलयन	2 mg/ml

काँचपात्र और अन्य उपकरण

1.4 विधि

मात्रात्मक बेनेडिक्ट अभिकर्मक को बनाने की विधि :

1. 100 मिलीग्राम सोडियम सिट्रेट और 62.5 ग्राम पोटेशियम थायोसाइनेट को 300 मिलीलीटर आसुत जल में घोलें। घोल को पूरी तरह से घुलने के लिए लगातार हिलाते हुए गर्म प्लेट पर धीरे से गर्म किया जा सकता है। ठंडा होने के बाद घोल को छान लें और उस पर 'ए' का निशान लगा दें।

2. 50 मिली आसुत जल में 9 ग्राम कॉपर सल्फेट को घोलें और इसे 'बी' के रूप में चिह्नित करें।

3. 10 मिली आसुत जल में 0.5 ग्रम पोटेशियम फेरिसायनाइड घोलें और इसे 'सी' के रूप में चिह्नित करें।

4. 'ए' के 300 मिली में 'बी' का 50 मिली और 'सी' का 2.5 मिली मिलाएं और आसुत जल मिलाकर कुल मात्रा 500 मिली करें। यह विलयन मात्रात्मक बेनेडिक्ट का अभिकर्मक है।

मूत्र के नमूने में ग्लूकोज का मात्रात्मक आकलन :

मानक अनुमापन (titration) :

1. एक फ्लास्क में मात्रात्मक बेनेडिक्ट अभिकर्मक का 5 मिलीलीटर लें और 2 ग्राम निर्जल सोडियम कार्बोनेट मिलाएं। अच्छी तरह मिलाएं और मिश्रण को लगातार गर्म होने के लिए हॉट प्लेट पर रखें।

2. जब तक नीला रंग गायब न हो जाए तक तक लगातार हिलाते हुए अंशांकित पिपेट का उपयोग करके 0.5% ग्लूकोज वियलन डालें। उपयोग किए गए ग्लूकोज की मात्रा को नोट करें।

नमूने का अनुमापन (titration) :

3. दोबारा, मात्रात्मक बेनेडिक्ट अभिकर्मक के 5 मिलीलीटर को दूसरे फ्लास्क में लें और 2 ग्राम निर्जल सोडियम कार्बेनेट डालें। अच्छी तरह मिलाएं और मिश्रण को लगातार गर्म होने के लिए हॉट प्लेट पर रखें।

4. लगातार हिलाते हुए अंशांकित पिपेट का उपयोग करके मूत्र डालें, जब तक नीला रंग गायब न हो जाए उपयोग किए गए मूत्र की मात्रा को नोट करें।

1.5 प्रेक्षण और परिणाम

प्रेक्षण तालिका

नमूना	उपयोग की गई मात्रा (मिलीलीटर)	सांद्रता (मिलीग्राम/मिलीलीटर
ग्लूकोज		
मूत्र		

गणना :

मूत्र में ग्लूकोज की मात्रा की गणना निम्न सूत्र द्वारा की जा सकती है :

$C1 = C2V2/V1$

जहाँ

C1 = मूत्र में ग्लूकोज की सांद्रता

V1 = अभिक्रिया में प्रयुक्त मूत्र का आयतन

C2 = ग्लूकोज के मानक विलयन की सांद्रता

V2 = अभिक्रिया में उपयोग किए गए ग्लूकोज विलयन का आयतन

परिणाम

मूत्र के दिए गए नमूने में ग्लूकोज की सांद्रता ..... मिलीग्राम/मिलीलीटर (mg/ml) है, जैसा कि मात्रात्मक बेनेडिक्ट अभिक्रिया के माध्यम से अनुमान लगाया गया है।

1.6 सावधानियाँ

1. अभिकर्मकों के ताजा बने हुए विलयन का उपयोग किया जाना चाहिए।

2. अंत्य बिंदु (समापन बिंदु) पर पहुंचते समय अनुमापन सावधानी से किया जाना चाहिए।

प्रयोग 2

सीरम Ca^{2+} का आकलन

प्रयोग की रूपरेखा

2.1 प्रस्तावना

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

2.2 सिद्धांत

2.3 आवश्यक सामग्री

2.4 विधि

2.5 प्रेक्षण और परिणाम

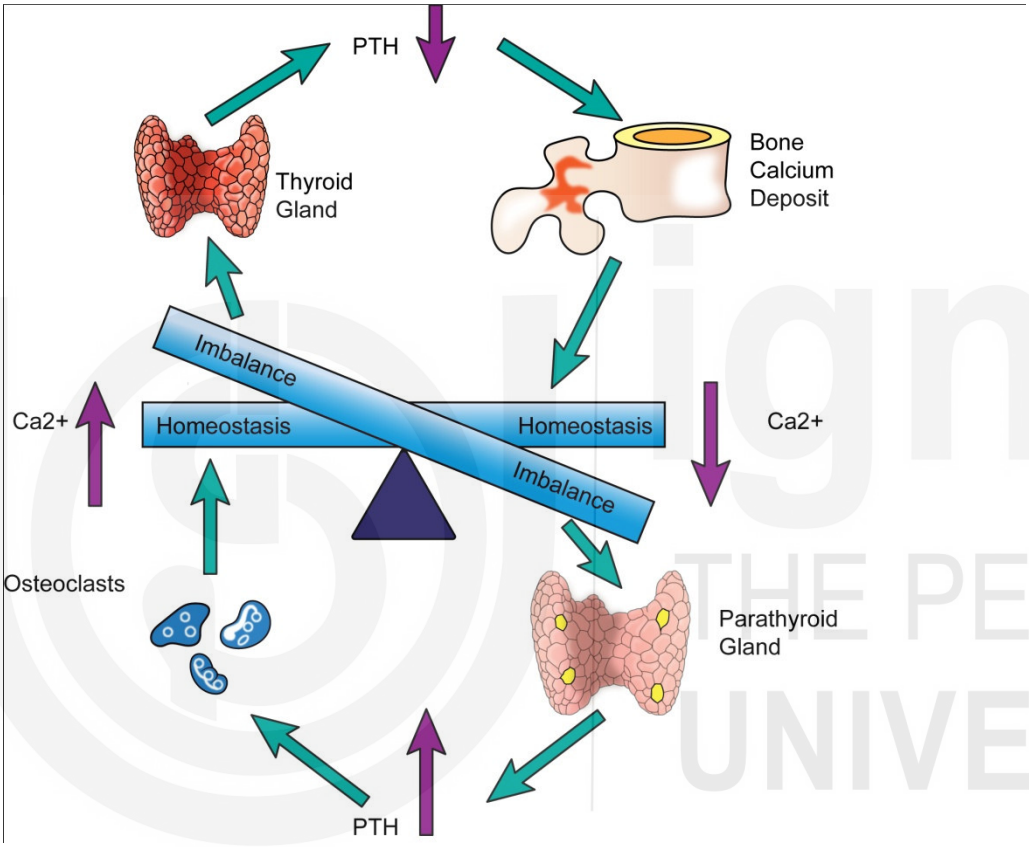
2.6 सावधानियाँ

2.1 प्रस्तावना

कैल्शियम (Ca) मानव शरीर में सबसे प्रचुर मात्रा में पाया जाने वाला खनिज तत्त्व है। यह शरीर के कई शारीरिक कार्यों के लिए आवश्यक है, जैसे मांसपेशियों में संकुचन, तंत्रिका आवेग चालन, संवहनी फैलाव और संकुचन रक्त का थक्का, हार्मोन स्राव, कोशिका संकेतन और कोशिका झिल्ली स्थायित्व।

90% से अधिक कैल्शियम हड्डियाँ और दांतों में हाइड्रोक्सीएपेटाइट खनिज के रूप में मौजूद होता है। यह कैल्शियम, फॉस्फोरस और हाइड्रॉक्साइड से बने षटकोणीय (हेक्सागोनल) क्रिस्टल के रूप में होता है। जिसका रासायनिक सूत्र $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$। हाइड्रोक्सीएपेटाइट की क्रिस्टल जाली संरचना इसकी कठोरता में योगदान करती है और कंकाल प्रणाली की संरचनात्मक अखंडता को बनाए रखती है। शरीर का शेष 1% Ca कोशिकाओं, ऊतकों और रक्त सहित बाह्य और अंतःकोशिकीय शरीर के तरल पदार्थों में पाया जाता है। Ca का यह भाग तीन रूपों में मौजूद होता है धनायन (Ca^{2+}) के रूप में, ऋणआयनों के साथ संकुलित (chelated; कीलेटेड) और प्रोटीन–बद्ध रूप में। शरीर के तरल पदार्थों में लगभग 50% Ca एक धनायनित रूप में होता है, जो मुक्त कैल्शियम होता है और अधिकांश शारीरिक कार्यों में आवश्यक भूमिका निभाता है। लगभग 10% कैल्शियम फॉस्फेट, बाइकार्बोनेट और सिट्रेट जैसे आयनों के साथ संकुलित रूप में होता है जो कि कोशिकाओं और ऊतकों द्वारा अवशोषित होने के लिए आसानी से उपलब्ध है। कैल्शियम का केवल 10% ही प्रोटीन से बंधा होता है और कोशिकाओं और ऊतकों के लिए स्वतंत्र रूप से उपलब्ध नहीं होता है। मुख्य रूप से यह अंश एल्ब्यूमिन और ग्लोब्युलिन से बंधा होता है।

सरीम में कैल्शियम के ये तीनों रूप- आयनिक, कीलेटेड और प्रोटीन बद्ध मौजूद होते हैं। शरीर में सामान्य सीरम कैल्शियम सांद्रता को बहुत ही संकीर्ण सीमा में बनाए रखा जाता है, यानी 8.5 से 10.4 मिलीग्राम/डीएल तक, जिसे पैराथाइरॉइड हार्मोन (पीटीएच), विटामिन डी 3 और कैल्सीटोनिन की मदद से Ca समस्थिरता (होमियोस्टेसिस) के माध्यम से नियंत्रित और स्थिर रखा जाता है। अनेक पैथेफिजियोलॉजिकी स्थितियां कैल्शियम के स्तर में अवयवस्था पैदा कर सकती हैं, जिसे चिकित्सकीय रूप से अवकैल्सीयमरक्तता (hypocalcemia; हाइपोकैल्सीमिया) या अतिकैल्सीयमरक्तता (hypercalcemia; हाइपरकैल्सीमिया) के रूप में प्रकट किया जाता है। प्रयोगशाला में सीरम कैल्शियम की माप के माध्यम से इन स्थितियों का निदान किया जाता सकता है (चित्र 2.1)।



चित्र 2.1 : पैराथाइरॉइड हार्मोन द्वारा कैल्शियम होमियोस्टेसिस।

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

इस प्रयोग को पढ़ने के बाद आप सक्षम होंगे कि :

- ❖ सीरम नमूने में कैल्शियम के स्तर को मात्रात्मक रूप से निर्धारित करें;
- ❖ हाइपोकैल्सीमिया या हाइपरकैलसीमिया के होने के कारणों का पता लगाने में; और
- ❖ हाइपोकैल्सीमिया या हाइपरकैलसीमिया से जुड़ी पैथेफिजियोलॉजिकी स्थिति का आकलन करें।

2.2 सिद्धांत

सीरम कैल्शियम का प्रयोग आकलन o-क्रीसोल थेलीन काम्लेक्सोन विधि (oCPC) के माध्यम से किया जा सकता है। सीरम के नमूनों में कैल्शियम आयन (Ca^{2+}) क्षारीय pH पर o-क्रीसोलथेलीन के साथ अभिक्रिया करके Ca-oCPC संकुल (कॉम्प्लेक्स) बनाते हैं। यह संकुल गहरा बैंगनी लाल रंग का होता है और 577 nm पर अधिकतम अवशोषण दिखाता है। अभिक्रिया मिश्रण का अवशोषणांक इस प्रकार 577 nm पर स्पेक्ट्रोफोटोमेट्रिक विधि द्वारा मापा जाता है, जो सीरम नमूने में कैल्शियम सांद्रता के सीधे आनुपातिक होता है।

$$Ca^{2+} oCPC \xrightarrow[OH^-]{\text{8–हाइड्रोक्सीक्विनोलिन}} \text{कैल्शियम सीपीसी कॉम्प्लेक्स (बैंगनी/लाल)}$$

2.3 आवश्यक सामग्री

रसायन

1. बफर–2–एमिनो–2–मिथाइल–1–प्रोपेनोल (एएमपी) या डाइएथेनॉलएमीन बफर (उभय प्रतिरोधी) (2 M), पीएच = 10-11
2. वर्णोत्पादी (क्रोमोजेनिक) अभिकर्मक – क्रीसोलथेलीन 0.60 मिलीमोल/ली.

   8–हाइड्रॉक्सीक्विनोलिन 70 मिलीमोल/ली.
3. कैल्शियम मानक विलयन : 10 मिलीग्राम/डीएल

उपकरण : वर्णमापी या स्पेक्ट्रोफोटोमीटर

2.4 विधि

1. क्रोमोजनिक अभिकर्मक के 2.0 मिलीलीटर के साथ 2.0 मिलीलीटर बफर विलयन को मिलाकर क्रोमोजनिक अभिकर्मक तैयार करें।
2. तीन परखनलियाँ लें और प्रत्येक को ब्लैंक (रिक्त), मानक और नमूने के लिए क्रमशः 'ए', 'बी' और 'सी' के रूप में लेबल करें।
3. इनमें से प्रत्येक परख नली में 0.5 मिली बफर और 0.5 मिली क्रोमोजनिक अभिकर्मक पिपेट द्वारा डालें।
4. फिर संबंधित परख नली में क्रमशः 0.02 मिली ब्लैंक, स्टैंडर्ड और सैंपल विलयन को पिपेट द्वारा डालें।
5. अच्छी तरह मिलाएं और अभिक्रिया मिश्रण को कमरे के तापमान पर 5–7 मिनट के लिए ऊष्मायित (इनक्यूबेट) करें।

6. 570 nm पर एक वर्णमापी या स्पेक्ट्रोफोटोमीटर कि सहायता से ब्लैंक (नमूना रहित विलयन) के विरूद्ध, प्रकाशिक घनत्व (ओडी) को मापें।

2.5 प्रेक्षण और परिणाम

प्रेक्षण तालिका :

परखनली	अंतर्वस्तु	प्रकाशिक घनत्व (ओडी) @ 570 nm
ए	रिक्त	
बी	मानक	
सी	नमूना	

गणना :

सीरम कैल्शियम (मिलीग्राम/डीएल) = (नमूने की O.D./मानक का O.D.) X मानक की सांद्रता।

परिणाम :

दिए गए सीरम नमूने में o-CPC वर्णमिति विधी द्वारा अनुमानित कैल्शियम की सांद्रता ..... मिलीग्राम/डीएल है।

2.6 सावधानियाँ

1. परिणामों की सटीकता के लिए सभी अभिकर्मकों को ताजा तैयार किया जाना चाहिए। हालांकि, इस प्रयोग में प्रयुक्त रसायन कमरे के तापमान पर 24 घंटे तक और रेफ्रिजरेशन (4°C) के तहत 7 (सात) दिनों तक स्थिर रहते हैं।
2. अभिकर्मकों को अंधेरे में संग्रहित किया जाना चाहिए।
3. सीरम का नमूना ताजा एकत्र किया जाना चाहिए और रूधिर अपघटन (हेमोलिसिस) से मुक्त होना चाहिए।
4. EDTA जैसे कीलेटिंग एजेंट कैल्शियम के आकलन में हस्तक्षेप कर सकते हैं।
5. सभी अभिकर्मकों और नमूनों को जैव सुरक्षा नियमों का पालन करते हुए संभाला जाना चाहिए।

प्रयोग 3

सीरम T_4 का आकलन

प्रयोग की रूपरेखा

3.1 प्रस्तावना

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

3.2 सिद्धांत

3.3 आवश्यक सामग्री

3.4 विधि

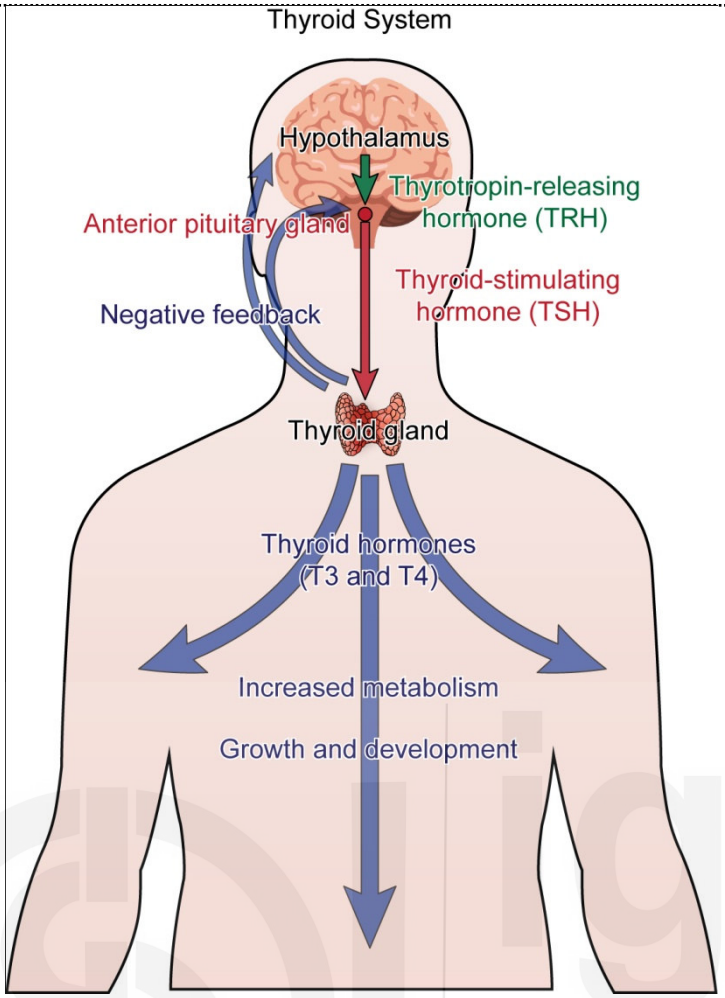
3.5 प्रेक्षण और परिणाम

3.6 सावधानियाँ

3.1 प्रस्तावना

थायरोक्सिन हार्मोन टाइरोसिन–आधारित, अयोडीन, युक्त और वसारागी (लिपोफिलिक) हार्मोन हैं जो थायरॉइड ग्रंथियों द्वारा निर्मित होते हैं। वे शरीर के आधारी उपापचय, वृद्धि और विकास को नियंत्रित और नियमित करते हैं। थाइरॉइड कंठ (larynx) के नीचे गर्दन के सामने के निचले हिस्से में स्थित होती हैं और दो थाइरोक्सिन हार्मोन– एल–थायरोक्सिन या टेट्राआयडोथायरोनिन (T_4) और एल–ट्राईआयडोथायरोनिन (T_3) का स्राव करती हैं। इन हार्मोनों के स्राव को पिट्यूटरी ग्रंथि और हाइपोथैलेमस द्वारा नियंत्रित किया जाता है। हाइपोथैलेमस थायरोट्रोपिन–रिलीज़िंग हार्मोन (TRH) को स्रावित करता है, जो अग्र पिट्यूटरी ग्रंथि को थायरॉइड–उत्तेजक हार्मोन (TSH) को स्रावित करने के लिए उत्तेजित करता है। टीएसएच आगे थायरॉइड ग्रंथियों से थायरोक्सिन हार्मोन के स्राव को विनियमित करता है। तीनों थायराइड–हाइपोथैलेमस–पिट्यूटरी एक अच्छी तरह से समन्वित और दृढ़ता से विनियमित फीडबैक तंत्र के माध्यम से कार्य करते हैं (चित्र 3.1)।

T_4 रक्त में T_3 की तुलना में बहुत अधिक मात्रा में स्रावित होता है और T_3 की तुलना में तुलनात्मक रूप से निष्क्रिय होता है। T_4 का लगभग 99.9% प्रोटीन मुख्य रूप से थायरोक्सिन–बाइंडिंग ग्लोब्युलिन (TBG) से बंधा होता है, जबकि केवल 0.1% T_4 मुक्त और सक्रिय होता है। इसलिए, रक्त में पाए जाने वाले बद्ध (बाउंड) और अपरिबद्ध (अनबाउंड) T_4 की मात्रा को चिकित्सकीय रूप से कुल (टोटल) T_4 के रूप में पाया जाता है, जबकि रक्त में T_4 के अनबाउंड अंश को मुक्त (फ्री) T_4 कहा जाता है। कुल T_4 को कई कारक प्रभावित करते हैं; इस प्रकार इसका माप कुछ चिकित्सीय स्थितियों जैसे अवटु अल्पक्रियता (हाइपोथायरायडिज्म) और अवटु अतिक्रियता (हाइपरथायरायडिज्म) के बारे में जानकारी दे सकता है। वयस्कों में कुल T_4 स्तर की सामान्य सीमा 5.0 से 12.0 µg/dL है।



चित्र 3.1 : थायरइड–हाइपोथैलेमस–पिट्यूटरी–कार्यप्रणाली।

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

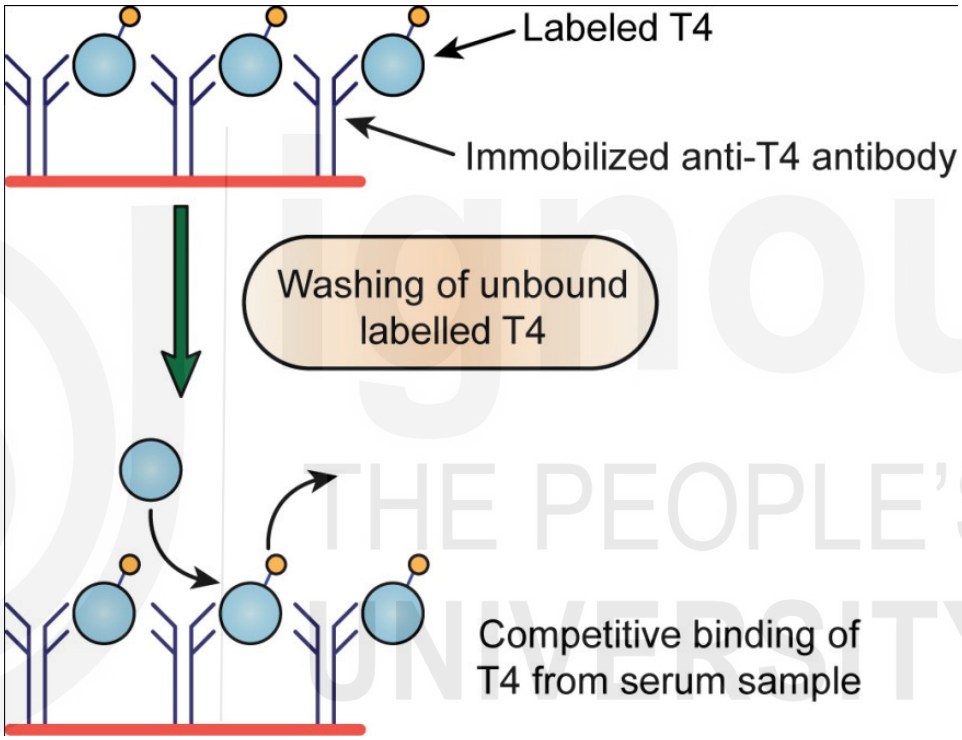
इस प्रयोग को करने के पश्चात् आप सक्षम हो जाएंगे कि :

- एंजाइम इम्यून आमापन (इम्यूनोएसे, immunoassary) के माध्यम से सीरम नमूनों में T_4 की मात्रा को मात्रात्मक रूप से मापें;
- T_4 के साथ HRP के संयुग्मन महत्त्व को समझें;
- एंजाइम आमापन (इम्युनोएसे) की सुग्राहिता का मूल्यांकन करें; और
- सीरम T_4 मात्रा को हाइपोथायरायडिज्म और हाइपरथायरायडिज्म जैसी चिकित्सीय स्थितियों से जोड़कर देखें।

3.2 सिद्धांत

टोटल T_4 को एंजाइम इम्यूनोएसे (EIA) या एंजाइम सहलग्न प्रतिरक्षा आमापन (इम्युनोसॉरबेंट आमापन) (ELISA, एलाइसा) के माध्यम से मापा जाता है। इस विधि में, माइक्रोटिटर कूपों को एंटी T_4 एंटीबॉडी की एक ज्ञात मात्रा के साथ लेपित किया जाता है, और एक विशिष्ट मात्रा में सीरम को एंजाइम–संयुग्मित T_4 या लेबल किए गए T_4 की ज्ञात मात्रा के साथ डाला जाता है। EIA में संयुग्मन के लिए इस्तेमाल किया जाने

वाला सबसे आम एंजाइम हॉर्सरैडिश पेरॉक्सीडेज (एचआरपी) है। मिश्रण को 60 मिनट के लिए RT (room termperature) पर उष्मायित किया जाता है, और अनबाउंड लेबलीकृत T_4 को हटाने के लिए कुपों को आसुत जल से कुछ बार धोया जाता है। सीरम T_4 अचल एंटी T_4 एंटीबॉडी पर एक निश्चित संख्या में बाध्यकारी साइटों के लिए एंजाइम– संयुग्मित T_4 के साथ प्रतिस्पर्धा करता है। फिर, संयुग्मित एंजाइम के लिए विशिष्ट सब्सट्रेट डाला जाता है, और मिश्रण को आगे 20–30 मिनट के लिए उष्मायित किया जाता है। एंजाइम–सब्सट्रेट अभिक्रिया के कारण रंग विकसित होता है, जिसे स्पेक्ट्रोफोटोमेट्री रूप से मापा जाता सकता है। सब्सट्रेट TMB (3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine) का उपयोग HRP एंजाइम के लिए किया जाता है और अवशोषण को 450 nm पर मापा जाता है। संदर्भ के रूप में T_4 मानकों का उपयोग करते हुए, सीरम नमूने में T_4 की सांद्रता अवशोषणांक के आधार पर निर्धारित की जाती है (चित्र 3.2)।



चित्र 3.2 : सीरम नमूने में T_4 के निर्धारण के लिए एंजाइम इम्युनोएसे (EIA)।

3.3 आवश्यक सामग्री

रसायन और अभिकर्मक

1. भेड़ (Sheep) एंटी T_4 के साथ लेपित 96 कूपों के साथ माइक्रोटिटर कूप प्लेट।
2. T_4-HRP संयुग्मी (conjugate; कॉन्जुगेट) सांद्र (concentrate; कॉन्संट्रेट) (10X)
3. TRIS बफर (पीएच = 7.6) और 8–एनिलिनो–1–नेप्थालीन सल्फोनिक एसिड (ANS) से युक्त एक तनु विलयन
4. 2 to 25 µg/dl सांद्रता सीमा के T_4 संदर्भ मानक
5. 3, 3', 5, 5' टेट्रामेथिलबेन्ज़िडीन (TMB) अभिकर्मक

6. 1N HC1

7. सीरम नमूना

उपकरण

ऑटोपिपेट आयतन 20 µL, 100 µL, 200 µL और 1000 µL

भ्रमिल मिक्सर (Vortex mixer)

3.4 विधि

1. पहले माइक्रोटाइटर प्लेट लें जिसमें कूप sheep anti T_4 के साथ लेपित हो, और उन्हें मानक, नमूना, और कंट्रोल (नियंत्रण प्रतिदर्श) के लिए चिन्हित कर ले।

2. पिपेट द्वारा कंट्रोल, मानक और नमूने का 20 µL माइक्रोटाइटर प्लेट के संबंधित कूपों में डालें।

3. 0.1 मिली T_4-HRP संयुग्मी कॉन्संट्रेट और 1 मिली तनु विलयन को मिलाकर T_4-HRP संयुग्मी का कार्यशील घोल तैयार करें। इसे 2-4°C पर 24 घंटे तक संग्रहित किया जा सकता है।

4. तनु T_4-HRP संयुग्म के कार्यशील घोल को 100 µL पिपेट के द्वारा प्रत्येक आमापन कूप में अच्छी तरह में मिलाएं।

5. 60 मिनट के लिए कमरे के तापमान पर मिश्रण को उष्मयित करें।

6. ऊष्मायन के बाद, सभी अनबाउंड सामग्री को धोने के लिए माइक्रोटाइटर कूपों को खाली करें और आसुत जल से 4–5 बार प्रक्षालित करें।

7. कूपों से पानी पूरी तरह से निकालने के लिए एक शोषक कागज पर कूपों को टैप करें।

8. TMB अभिकर्मक के 100 µl को पिपेट की सहायता से प्रत्येक आमापन कूप में डालें और अच्छी तरह से मिलाएं।

9. 30 मिनट के लिए कमरे के तापमान पर मिश्रण को ऊष्मायित करें।

10. 1N HCl का 100 µL पिपेट कि मदद से प्रत्येक आमापन कूप में स्टॉप सॉल्यूशन के रूप में डालें और अच्छी तरह से मिलाएं। यह अभिक्रिया को रोक देगा।

11. एलिसा रीडर के द्वारा 450 nm पर अवशोषणांक को मापें।

3.5 प्रेक्षण और परिणाम

प्रेक्षण तालिका

माइक्रोटाइटर प्लेट वेल सामग्री	T_4 सांद्रता (माइक्रोग्राम/डीएल)	आवशोषणांक @450 nm
कंट्रोल	0	
मानक	5	
	10	
	15	
	20	
	25	
नमूना	–	

प्रेक्षण तालिका के आधार पर सांद्रता (X-axis) और अवयोषणांक (Y-axis) पर ले कर अंशांकन वक्र (calibration curve) बनाएं और नमूने में T_4 सांद्रता निकालें।

परिणाम :

अंशांकन वक्र से प्राप्त नमूने में T_4 की सांद्रता ..... माइक्रोग्राम/डेसीलीटर है।

3.6 सावधानियाँ

1. ताजा बने हुए अभिकर्मक विलयन का उपयोग किया जाना चाहिए।
2. अभिकर्मकों का उपयोग न करें यदि वे मलिन (cloudy) दिखाई देते हैं या भौतिक गुणों में परिवर्तन देखा जाता है।
3. निर्माता के निर्देशों के अनुसार अभिकर्मकों को स्टोर करें।

प्रयोग 4

एचसीजी आधारित गर्भावस्था परीक्षण

प्रयोग की रूपरेखा

4.1 प्रस्तावना

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

4.2 सिद्धांत

4.3 आवश्यक सामग्री

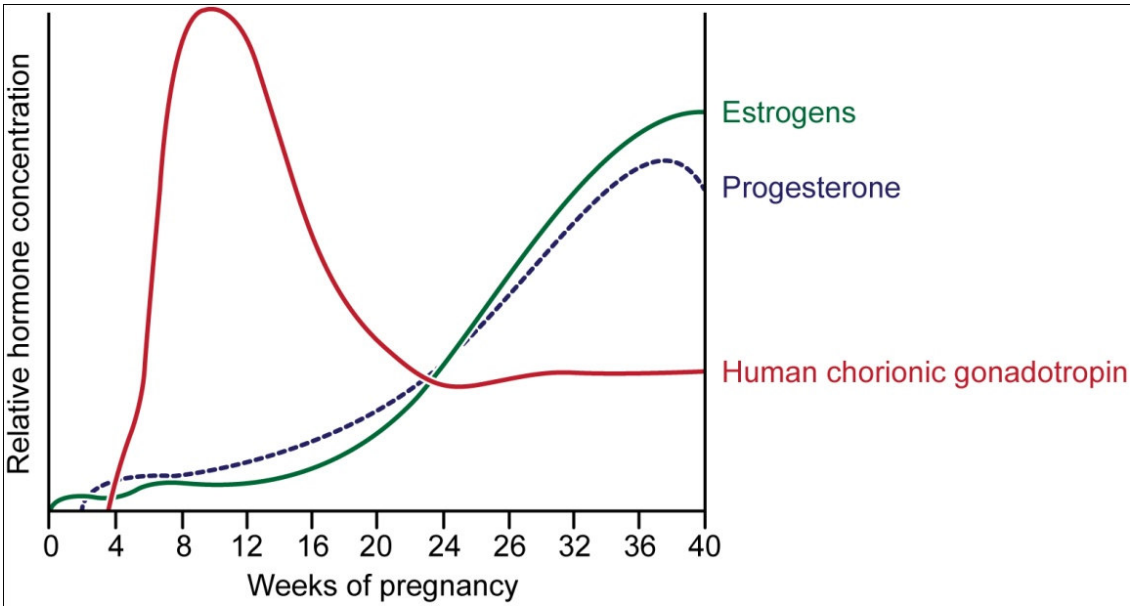
4.4 विधि

4.5 प्रेक्षण और परिणाम

4.6 सावधानियाँ

4.1 प्रस्तावना

ह्यूमन कोरिओनिक गोनाडोट्रोपिन (एचसीजी, HCG) एक ग्लाइकोप्रोटीन हार्मोन है, जो कोरकपुटी के सम्पोषकोरक ऊतकों द्वारा निषेचनोत्तर जैवसंश्लेषित होता है। एचसीजी एक विषम द्विलक (हेटेरोडाइमर) प्रोटीन है जिसमें दो उपएकक (सबयूनिट)–α और β होते हैं, जिनमें से प्रत्येक का आणविक भार क्रमश 14.5 और 22.2 kD होता है। α सबयूनिट 93 जबकि β सबयूनिट 145 अमीनो अम्लों से बना होता; इस प्रकार एचसीजी कुल मिलाकर कुल 238 अमीनो अम्लों से बना है। एचसीजी सबयूनिट 8 कार्बोहाइड्रेट पार्श्व श्रृंखला (साइड चेन) से भी जुड़े होते हैं। एचसीजी गर्भावस्था को बनाए रखने के लिए कुछ ल्यूटियम ग्रेविडिटैटिस को उत्तेजित करता है। एचसीजी स्वयं गर्भाशयअन्तःस्तर (एंडोमेट्रियम) में वाहिकाजनन (एंजियोजेनेसिस) को बढ़ावा देता है और कॉर्पस ल्यूटियम ग्रेविडिटैटिस द्वारा स्रावित प्रोजेस्टेरोन मुख्य रूप से भ्रूण के विकास में सहयोग करने के लिए गर्भाशय में एंडोमेट्रियम की मोटी परत को बनाए रखता है। गर्भधारण के 9 दिनों के भीतर एचसीजी सीरम और मूत्र में दिखाई देता है, और उसके बाद इसके स्तर में तेजी से वृद्धि होती है। गर्भावस्था के लगभग 10–12 सप्ताह में 100,000–200,000 mIU/mL तक पहुंच जाती है। चूंकि यह गर्भावस्था के प्रारंभिक चरण में पता लगाया जा सकता है और पूरे गर्भकालीन अवधि के दौरान सीरम और सूत्र में भी दिखाई देता है, इसलिए इसे गर्भावस्था परीक्षणों के लिए जैवचिह्न (बायोमार्कर) के रूप में उपयोग किया जाता है (चित्र 4.1)।



चित्र 4.1 : गर्भावस्था के दौरान एचसीजी का स्तर।

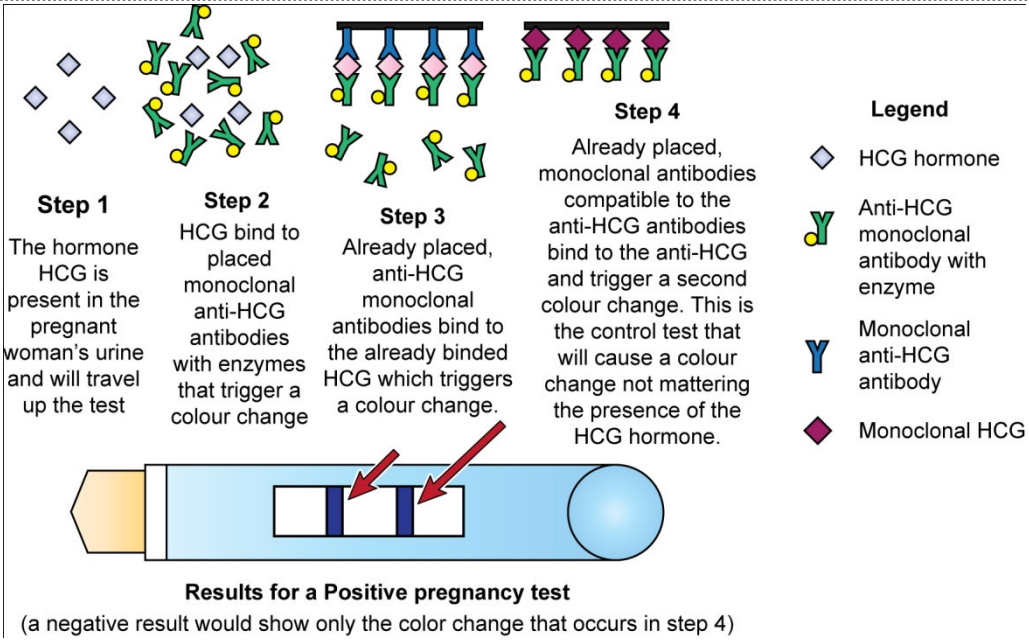
अपेक्षित अध्ययन परिणाम

इस प्रयोग को करने के पश्चात् आप सक्षम हो जाएंगे कि :

- ❖ मूत्र के नमूने में एचसीजी का स्तर माप कर गर्भावस्था का पता लगाएं;
- ❖ तीव्र वर्णलेखी प्रतिरक्षा आमापन (क्रोमैटोग्राफिक इम्यूनोएसे) को समझें;
- ❖ एचसीजी गर्भावस्था परीक्षण किट का प्रयोग कर पाएं; और
- ❖ एंजाइम इम्युनोएसे की सुग्राहिता का मूल्यांकन कर पाएं।

4.2 सिद्धांत

मूत्र में एचसीजी के स्तर का नैदानिक माप एचसीजी गर्भावस्था परीक्षण किट का उपयोग करके रैपिड क्रोमैटोग्राफिक इम्यूनोएसे के माध्यम से किया जा सकता है। इसमें एक कार्ड या पट्टी होती है। जिस पर एकक्लोनी (मोनोक्लोनल) और पॉलीक्लोनल प्रतिरक्षी (एंटीबॉडी) (एंटी–एचसीजी) स्थिर होते हैं, जो चुनिंदा रूप से एचसीजी से बंधते हैं। मूत्र के नमूने को परीक्षण कार्ड पर लोड किया जाता है, और यह केशिकाकर्षण (capillary action) के माध्यम से झिल्ली के साथ चलता है। जैसे कि एचसीजी हार्मोन लेबल किए गए एंटीबॉडी का सामना करता है, दोनों एंटीबॉडी–एचसीजी–संयुग्म बनाने के लिए अभिक्रिया करते हैं, जो कार्ड पर रंगीन रेखा के रूप में दिखाई देता है। यह सुनिश्चित करने के लिए कि परीक्षण पूरा हो गया है; कार्ड में एक कंट्रोल भी दिया गया है, जो सैंपल लोड होने पर हमेशा रंगीन लाइन देगा। एचसीजी गर्भावस्था परीक्षण कार्ड की सुग्रहिता 25 एमआईयू/एमएल है; इसलिए, यह गर्भधारण के 9 दिन बाद ही गर्भावस्था का पता लगा सकती है (चित्र 4.2)।



चित्र 4.2 : एचसीजी प्रतिरक्षा आमापन (इम्युनोएसे) की क्रियाविधी।

4.3 आवश्यक सामग्री

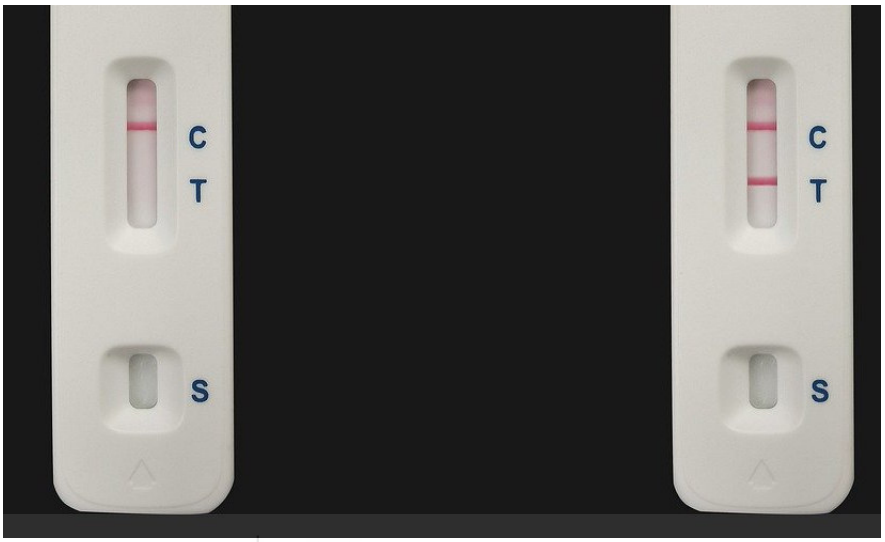
1. परीक्षण कार्ड या उपकरण
2. डिस्पोजेबल पिपेट
3. नमूना कंटेनर
4. नमूना–मूत्र

4.4 विधि

1. एचसीजी की उपस्थिति का परीक्षण करने के लिए मूत्र का उपयोग नमूने के रूप में किया जाता है।
2. नमूना किसी भी समय एकत्र किया जा सकता है; हालांकि, इसे अधिमानतः सुबह में एक मध्य–धारा मूत्र नमूने के रूप में एकत्र किया जाना चाहिए।
3. नमूना 2-6°C पर 24 घंटे तक संग्रहीत किया जा सकता है।
4. नमूना स्पष्ट होना चाहिए और इसमें कोई अवक्षेप नहीं होना चाहिए।
5. परीक्षण करते समय, नमूना और परीक्षण कार्ड या उपकरण, कमरे के तापमान पर होना चाहिए।
6. परीक्षण कार्ड को समतल सतह पर रखें।
7. एक डिस्पोजेबल ड्रॉपर का उपयोग करके मूत्र की 2 बूंदों के साथ नमूने को कूप में से धीरे से लोड करें।
8. परिणाम आने के लिए 5 मिनट तक प्रतीक्षा करें।

4.5 प्रेक्षण और परिणाम

प्रेक्षण:



Negative Positive

प्रेक्षण तालिका

लाल रेखा की उपस्थिति	सी (Y/N)	टी (Y/N)	परीक्षण (सकारात्मक / नकारात्मक)
टेस्ट–1			
टेस्ट–2			
टेस्ट–3			
टेस्ट–4			

परिणाम

कार्ड नियंत्रण के लिए 'C' और परीक्षण के लिए 'T' चिह्न प्रदर्शित करता है। 'C' के सामने लाल रेखा का दिखना इंगित करता है कि परीक्षण सफलतापूर्वक पूरा हो गया है, जबकि 'T' के सामने लाल रेखा नमूने में एचसीजी की उपस्थिति को इंगित करती है। इस प्रकार, एक परीक्षण सकारात्मक होता है जब 'C' और 'T' दोनों के सामने लाल रेखाएं दिखाई देती हैं। केवल 'C' के सामने और 'T' के सामने नहीं आने वाली लाल रेखा का अर्थ है कि परीक्षण नकारात्मक है।

अन्य मामलों में, यदि कोई लाल रेखा नहीं दिखाई देती है या यदि या केवल 'T' के सामने दिखाई देती है, तो इसका मतलब है कि परीक्षण गलत तरीके से किया गया है और अमान्य है। अमान्य परीक्षण के कई कारण हो सकते हैं, जैसे नमूना कूप में अपर्याप्त नमूना मात्रा लोड करना, अवलोकन के लिए पर्याप्त समय ने देना, समाप्त हो चुके या क्षतिग्रस्त परीक्षण कार्ड का उपयोग करना या कार्ड को अनुपयुक्त तरीके से उपयोग करना।

4.6 सावधानियाँ

1. एचसीजी टेस्ट कार्ड की समय सीमा समाप्त या क्षतिग्रस्त नहीं होनी चाहिए।

2. कंट्रोल लाइन रेखा का अवलोकन करते हुए परीक्षण को सफलतापूर्वक पूरा करना सुनिश्चित करें।

3. रंगीन रेखा के प्रकट होने के लिए उपयुक्त समय तक प्रतीक्षा करें।

ignou
THE PEOPLE'S
UNIVERSITY

प्रयोग 5

सीरम विद्युत अपघट्यों का आकलन

प्रयोग की रूपरेखा

5.1 प्रस्तावना

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

5.2 सिद्धांत

5.3 आवश्यक सामग्री

5.4 विधि

5.5 प्रेक्षण और परिणाम

5.6 सावधानियाँ

5.1 प्रस्तावना

विद्युत् अपघट्य (electrolytes; इलेक्ट्रोलाइट) कोशिकाओं और ऊतकों में जल संतुलन, परासरण संतुलन, पीएच संतुलन और विद्युत उदासीनता बनाए रखते हैं। इसलिए, सभी उपापचय प्रक्रियाओं और सामान्य शरीर के कामकाज के लिए शारीरिक रूप से वांछनीय सीमा में विद्युत् अपघट्यों की उपस्थिति अत्यधिक आवश्यक है। वे भोजन और तरल पदार्थ के सेवन के माध्यम से आहार से प्राप्त होते हैं; कुछ प्रमुख सोडियम, क्लोराइड, पोटेशियम, मैग्नीशियम, कैल्शियम फास्फोरस और बाइकार्बोनेट इलेक्ट्रोलाइट हैं। वे सभी शरीर के तरल पदार्थ, बाह्य और अंतःकोशिकी भागों में मौजूद हैं, और मांसपेशियों के संकुचन, तंत्रिका गतिविधि, ह्रदय कार्य, रक्त के थक्के, रक्तचाप और गुर्दे के कामकाज में एक नियामक भूमिका निभाते हैं।

इलेक्ट्रोलाइट असंतुलन तब होता है जब शरीर के तरल पदार्थों में इन का स्तर कम या अधिक होता है। उदाहरण के लिए, निम्न और उच्च सोडियम स्तर को क्रमशः अवसोडियम रक्तता (hyponatremia; हाइपोनेट्रेमिया), जबकि पोटेशियम के निम्न और उच्च स्तर को क्रमशः अवपोटेशियम रक्तता (hypokalemia; हाइपोकैलिमिया) और अति पोटेशियम रक्तता (hyperkalemia; हाइपरकेलेमिया), कहा जाता है। वयस्कों के सीरम में कुछ प्रमुख इलेक्ट्रोलाइट की सामान्य श्रेणियों का उल्लेख तालिका 5.1 में किया गया है :

तालिका 5.1 : सीरम में मुख्य इलेक्ट्रोलाइट का सामान्य स्तर।

इलेक्ट्रोलाइट	सामान्य सीरम स्तर
सोडियम (Na^+)	135 – 145 मि.मोल / लीटर
क्लोराइड (Cl^-)	96 – 106 मि.मोल / लीटर
पोटेशियम (K^+)	3.5 – 5.5 मि.मोल / लीटर
मैग्नीशियम (Mg^{2+})	0.85 – 1.10 मि.मोल / लीटर
बाइकार्बोनेट (HCO_3^-)	23 – 29 मि.मोल / लीटर

सामान्य स्तर से इलेक्ट्रोलाइट स्तर का अपविन्यास या विचलन शारीरिक विकारों या बीमारियों का संकेत देता है और संभावित रूप से मृत्यु का कारण बन सकता है। इस प्रकार, सीरम इलेक्ट्रोलाइट की माप अक्सर रूग्णता और विकारों से संबंधित होती है और इसका उपयोग विभिन्न नैदानिक स्थितियों का आकलन करने के लिए किया जाता है।

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

इस प्रयोग को पढ़ने के बाद आप सक्षम होंगे कि :

- ❖ सीरम नमूने में इलेक्ट्रोलाइट की मात्रा का विभवमूलक (पोटेंशियोमेट्रिकी) विधि द्वारा निर्धारण करें;
- ❖ पोटेंशियोमेट्रिक विधि की सुग्राहिता का मूल्यांकन करें;
- ❖ दिए गए नमूने की इलेक्ट्रोलाइट सांद्रता की तुलना सामान्य स्तर के मानों से करें; और
- ❖ इलेक्ट्रोलाइट असंतुलन की पहचान करें और इसे रोग या व्याधि / बीमारी से संबंधित करके देखें।

5.2 सिद्धांत

Na^+, K^+ और Cl^- जैसे सीरम इलेक्ट्रोलाइट को आमतौर पर आयन सेलेक्टिव इलेक्ट्रोड (ISE) का उपयोग करके पोटेंशियोमेट्री विधियों के माध्यम से मापा जाता हैं। यह विधि विद्युत्रसायन (इलेक्ट्रोकेमिकल) सेल से जुड़े वोल्टमीटर द्वारा दो इलेक्ट्रोड; एक आयन–सेलेक्टिव इलेक्ट्रोड और दूसरा संदर्भ इलेक्ट्रोड के बीच विभवान्तर को मापती है। यह विभवान्तर नमूने या विलयन में चयनित आयनों की सांद्रता के सीधे आनुपातिक है।

इलेक्ट्रोड का कार्य पीएच मीटर के समान है। संदर्भ इलेक्ट्रोड ज्ञात सांद्रता के संदर्भ या मानक विलयन के संपर्क में हैं, जबकि आयन वरणात्मक इलेक्ट्रोड, जिसे संकेतक इलेक्ट्रोड भी कहा जाता है, नमूना विलयन के संपर्क में है। संदर्भ इलेक्ट्रोड एक

Ag/AgCl इलेक्ट्रोड है, जो सिल्वर क्लोराइड के साथ लेपित चांदी के तार से बना होता है, जिसे AgCl संतृप्त पोटेशियम क्लोराइड (KCl) विलयन में डुबोया जाता है जिसमें कि मापे जाने वाले आयन भी होते है। आयन वरणात्मक इलेक्ट्रोड में एक वरणात्मक झिल्ली होती है जो झिल्ली में अन्य आयनों के पारित होने को छोड़कर केवल विशेष आयनों को पार करने की अनुमति देती है। जब दोनों इलेक्ट्रोड एक साथ संबंधित आयन विलयन के संपर्क में आते हैं, तो द्रव संधि का निर्माण होता है, तथा संदर्भ और नमूना विलयन के मध्य भाग में संधि विभव पैदा होता है। जिससे विद्युत रासायन सांद्रता सेल बन जाता है।

जब इलेक्ट्रोड को विलयन में डुबोया जाता है, तो चयनित आयन, आयन वरणात्मक इलेक्ट्रोड की झिल्ली के ऊपर चल कर, झिल्ली के दोनों किनारों पर जमा हो जाते हैं और साम्य अवस्था में, एक विद्युत रासायनिक विभव पैदा होता है, जो विलयन की आयन सांद्रता के लघुगणक के समानुपाती होती है। यह सिद्धांत नर्नस्ट (Nernst) समीकरण द्वारा प्रदर्शित होता है।

$E = E° + (2.030\ RT/nF) \log C$

जहाँ

E = विभव,

E° = मानक सेल विभव, ISE के लिए एक स्थिरांक,

R = गैस स्थिरांक (8.314 जे/के.मोल, J/K.mol),

T = तापमान (केल्विन में)

n = चयनित आयन का आवेश

F = फैराडे स्थिरांक (96, 500 कूलम्ब/मोल)

आंतरिक संदर्भ विलयन का उपयोग करके और नर्नस्ट समीकरण के अनुसार, एक रैखिक आरेख प्राप्त किया जा सकता है, और नमूना विलयन की आयन सांद्रता निर्धारित की जा सकती है। सेल विभव निर्धारित किए जाने वाले आयनों के लघुगणकीय मोलर सांद्रता के समानुपाती होती है और इसे मोलर इकाइयों में दर्शाया जाता है। यह संबंध Na^+, और K^+ और Cl^- जैसे अधिकांश आयनों के लिए शरीरकार्यिकी परिसर पर रैखिक है, और इसलिए, इस विधि का उपयोग सांद्रता को विभिन्न रोग कार्यिकी (पैथोफिजियोलॉजिकल) स्थितियों में नैदानिक रूप से सहसंबंधित करने के लिए किया जा सकता है।

5.3 आवश्यक सामग्री

आयन चयनात्मक/वरणात्मक इलेक्ट्रोड (ISE) बफर,

चयनित आयनों के लिए मानक विलयन,

संदर्भ विलयन,

आयन चयनात्मकता जाँच विलयन

नमूना–सीरम (रूधिर अपघटन (हेमोलिसिस) मुक्त)

उपकरण : आयन सेलेक्टिव इलेक्ट्रोड मीटर

5.4 विधि

1. अंशांकन वक्र तैयार करने के लिए चयनित आयनों की ज्ञात सांद्रता के मानक विलयनों का उपयोग किया जाता है।

2. आसुत जल की ज्ञात आयतन में लवण की तौली हुई मात्रा को घोलकर मानक का स्टॉक विलयन तैयार करें। Na^+ और Cl^- आयनों के लिए उपयोग किया जाने वाला मानक विलयन NaCl है, और K^+ आयनों के लिए, यह KCl है। इनमें से प्रत्येक स्टॉक का सांद्रण 1000 पीपीएम के लिए तैयार किया जाता है।

3. 1, 10, 100 और 1000 पीपीएम की सांद्रता रेंज तैयार करने के लिए श्रृंखलाबद्ध तनूकरण करें।

4. आयनिक सामर्थ्य (ionic strength) को समायोजित करने के लिए मानक विलयन के प्रत्येक सांद्रता में आयनिक सामर्थ्य समायोजन बफर (आईएसएबी) की बराबर डालें।

5. आयन सेलेक्टिव इलेक्ट्रोड और संदर्भ इलेक्ट्रोड को सबसे कम सांद्रता के विलयन में डुबोएं और ISE मीटर में इलेक्ट्रोड विभव को मापें।

6. आसुत जल में इलेक्ट्रोड विभव को मापें।

7. सभी मानक तनुकरणों के इलेक्ट्रोड विभव को समान रूप से क्रम से मापें।

8. मानक सांद्रता की पूरी श्रंखला के लिए मापे गए इलेक्ट्रोड विभवमानों का उपयोग करके अंशांकन वक्र प्लॉट करें।

9. आयनिक सामर्थ्य समायोजन के लिए आयनिक सामर्थ्य समायोजन बफर (आईएसएबी) के बराबर मात्रा के साथ सीरम नमूने की मापी गई मात्रा को मिलाएं।

10. सीरम नमूने के इलेक्ट्रोड विभव को मानक विलयन के लिए मापें गए इलेक्ट्रोड विभव की तरह ही मापें।

5.5 प्रेक्षण और परिणाम

प्रेक्षण तालिका

नमूना	सांद्रता	इलेक्ट्रोड विभव
मानक	1 पीपीएम	5
	10 पीपीएम	10
	100 पीपीएम	15
	1000 पीपीएम	20
सीरम		

परिणाम

आयन सेलेक्टिव इलेक्ट्रोड मीटर द्वारा प्रदर्शित सीरम नमूने में चयनित आयनों की सांद्रता ..... mEq/L) है।

5.6 सावधानियाँ

1. मानक विलयन ताजा और परिशुद्ध रूप से तैयार किए जाने चाहिए।
2. किसी भी विलयन में डुबाने से पहले इलेक्ट्रोड को अच्छी तरह से धोना चाहिए।
3. ISE मीटर को ठीक से अंशाकित (कैलिब्रेट) किया जाना चाहिए।

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY