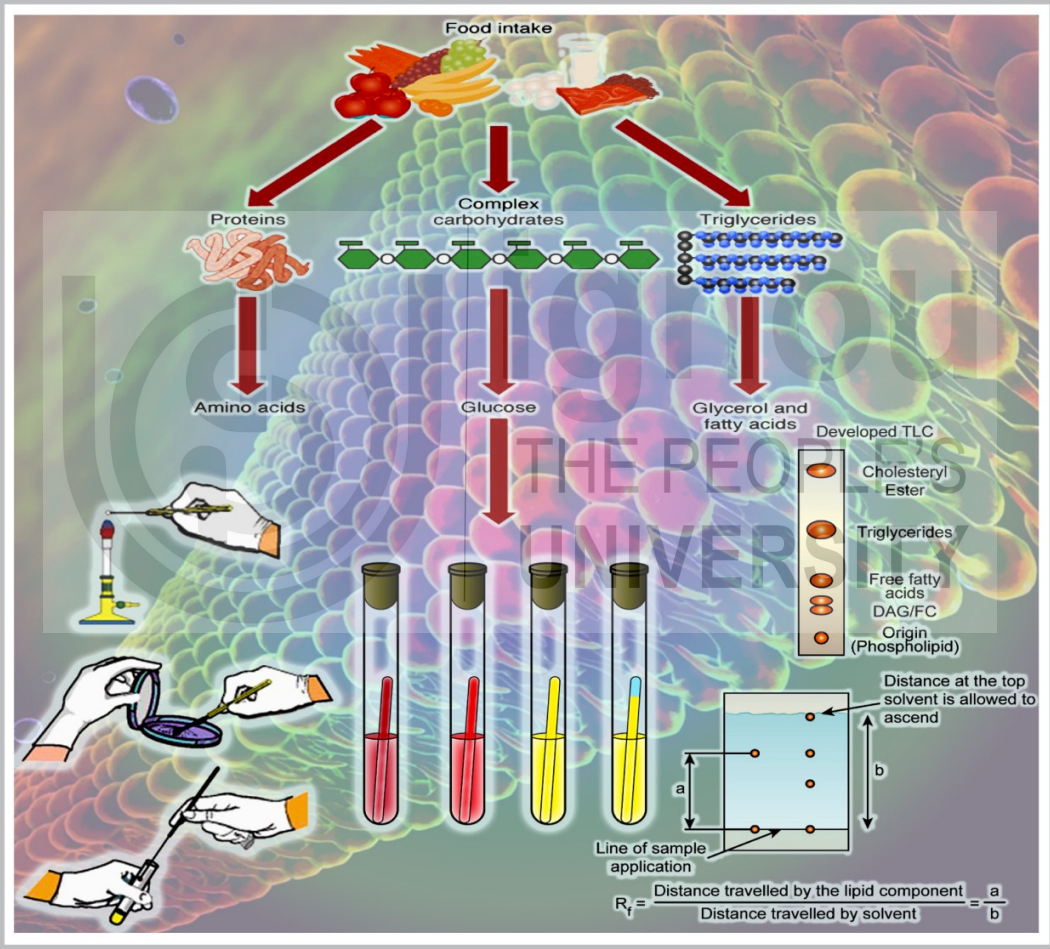
ignou
THE PEOPLE'S
UNIVERSITY

इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय
विज्ञान विद्यापीठ

BBCCL-110
कार्बोहाइड्रेट और लिपिड का उपापचयन



प्रयोगशाला

इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय
विज्ञान विद्यापीठ

BBCCL-110

कार्बोहाइड्रेट और लिपिड का उपापचयन (प्रयोगशाला)

प्रयोगों की सूची

प्रयोग 1
युग्मित एन्ज़ाइम आमापन द्वारा रूधिर ग्लूकोस का आकलन 5

प्रयोग 2
सूक्ष्मजीवों द्वारा शर्करा किण्वन 11

प्रयोग 3
लार ऐमिलेस द्वारा स्टार्च पाचन का प्रदर्शन 17

प्रयोग 4
टीएलसी द्वारा अंडे के लिपिडों का पृथक्करण और प्रभाजन एवं उनका आकलन 22

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

कार्यक्रम एवं पाठ्यक्रम अभिकल्पना समिति

प्रो. बेचन शर्मा
जैवरसायन विभाग, इलाहाबाद विश्वविद्यालय

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

प्रो. डी.वी. देवराजू
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
यू.आई.ई.टी., पंजाब विश्वविद्यालय

प्रो. सिमी फरहत बसीर
जैवविज्ञान विभाग, जामिया मिलिया इस्लामिया

संकाय सदस्य

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

डॉ. परवेश बब्बर
विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

डॉ. एम.अब्दुल करीम
विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

डॉ. अरविंद कुमार शाक्या
विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

डॉ. मनीषा पाण्डेय
विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

डॉ. सीमा कालड़ा
विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

पाठ्यक्रम निर्माण दल

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

लेखक
डॉ. नीरज श्रीवास्तव
कंसल्टेंट, विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू,
(प्रयोग 1, 2, 3 और 4)

डॉ. सीमा कालड़ा
विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू,
(प्रयोग 4, कवर डिजाइन एवं आर्टवर्क)

हिन्दी अनुवाद : डॉ. के. के. शर्मा
रिटायर्ड प्रिंसिपल
अजमेर, राजस्थान

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 :

BBCCL-110: कार्बोहाइड्रेट और लिपिड का उपापचयन

प्रिय शिक्षार्थियों का ''कार्बोहाइड्रेट और लिपिड का उपापचयन" के प्रयोगशाला सत्रों में स्वागत है। इस पुस्तिका/मैनुअल में दिए गए प्रयोगशाला अभ्यास और प्रयोग उस पाठ्यक्रम पर आधारित हैं जिसका आपने बीबीसीसीटी–109 में अध्ययन किया है। ''कार्बोहाइड्रेट और लिपिड का उपापचयन" सैद्धांतिक पाठ्यक्रम में आपने जिन अवधारणाओं का अध्ययन किया है, उनमें से कुछ का अनुभव इन प्रयोगों के दौरान किया जाएगा।

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

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

इस प्रयोगशाला पाठ्यक्रम का व्यापक उद्देश्य आपको निम्न में सक्षम बनाना है:

- रक्त शर्करा के स्तर का अनुमान लगाने में;
- सूक्ष्मजैवी किण्वन के प्रभावों का प्रदर्शन और व्याख्या करने में;
- अंडे की जर्दी से कुल लिपिड पृथक्क करने में;
- तनु स्तर क्रोमैटोग्राफी का उपयोग करके विभिन्न प्रकार के लिपिड को अलग करने और देखने में; तथा
- जैव रासायनिक परीक्षण द्वारा विभिन्न प्रकार के लिपिड का अनुमान लगाने में।

अध्ययन नियमावली

हम आपको सलाह देते हैं कि आप प्रयोगशाला सत्र में भाग लेने के लिए आने से पहले बीबीसीसीटी–109 की 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 और उन्हें पूर्व–व्यवस्थित भंडारण परिस्थितियों के तहत रखना हमेशा अच्छा होता है। सभी सुरक्षा उपायों का पालन करें और अभिकर्मकों को प्रयोग करते 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 दूसरे से 12वाँ 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 13वाँ – 14वाँ 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 जा सकते हैं। 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।
- यह प्रयोगशाला पाठ्यक्रम 2 क्रेडिट का है जिसे 7 दिनों की अवधि में पूरा किया जाएगा ।

  जिसमें निर्देशित प्रयोगशाला कार्य के 6 दिन और बिना निर्देशित प्रयोगशाला कार्य के लिए 1 दिन दिया गया है।
- 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

युग्मित एन्ज़ाइम आमापन द्वारा रूधिर ग्लूकोस का आकलन

रूपरेखा

1.1 प्रस्तावना

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

1.2 सिद्धान्त

1.3 आवश्यक सामग्री

1.4 विधिक्रम

1.5 प्रेक्षण और परिणाम

1.6 सावधानियाँ

1.1 प्रस्तावना

रूधिर/रक्त (Blood) ग्लूकोस का आकलन सामान्यता मधुमेह (डायबिटीज़ मेलिटस) के निदान के लिए किया जाता है। इस रोग का लक्षण रूधिर में ग्लूकोस की असामान्य रूप से उच्च सांद्रता (अतिग्लूकोसरक्तता) होता है। उच्च रूधिर ग्लूकोस स्तर थाइरॉइड अथवा पीयूष (pitutary) दुष्क्रियता, वृक्कीय विफलता (renal failure) और यकृत रोगों में भी होता है। निम्न रूधिर ग्लूकोस स्तर (अल्प ग्लूकोसरक्तता) इन्सुलिनोमा (इन्सुलिन स्त्रावी अबुर्द), हाइपोपिचुटरिज़्म, अधिवृक्क वल्कुटी अपर्याप्ता (adrenal cortical insufficiency) और इन्सुलिन प्रेरित अल्प ग्लूकोसरक्तता से जुड़ा हुआ है।

ग्लूकोस आकलन के लिए बहुत सी विधियाँ विकसित की गई हैं। पहले वाली विधियाँ जैसे नेल्सन सोमोगी और फोलिन–वू मुख्य रूप से अपचयन आधारित थीं और इनकी कई सीमाएँ थीं। ये गैर–विशिष्ट; कम सुग्राही, अरससमीकरणमितीय, जटिल विधियाँ हैं तथा इन्हें प्रायोगिक परिस्थितियों के दृढ़ नियंत्रण की आवश्यकता होती है। हाल ही में एन्जाइमी ऑक्सीकरण आधारित आकलनों ने ऊपर दी गई विधियों का स्थान ले लिया है। ये ग्लूकोस के लिए विशिष्ट हैं और एकल चरण द्रुत प्रक्रियाएँ हैं। यह परीक्षण यूरिक अम्ल, क्रिएटिनिन, विटामिन सी, प्रतिस्कन्दक (anticoagulants) तथा बिलिरूबिन, आदि से प्रभावित नहीं होता है। ग्लूकोस का आकलन रूधिर तथा सीरम नमूनों की बहुत कम मात्राओं के साथ किया जा सकता है। दो लोकप्रिय एन्ज़ाइम युग्मित आकलन ग्लूकोस ऑक्सीडेस परऑक्सीडेस (गॉड–पॉड, GOD-POD) विधि और हेक्सोकाइनेस–ग्लूकोस फॉस्फेट डिहाइड्रोजिनेस हैं। इस अभ्यास में हम गॉड–पॉड विधि का उपयोग करेंगे।

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

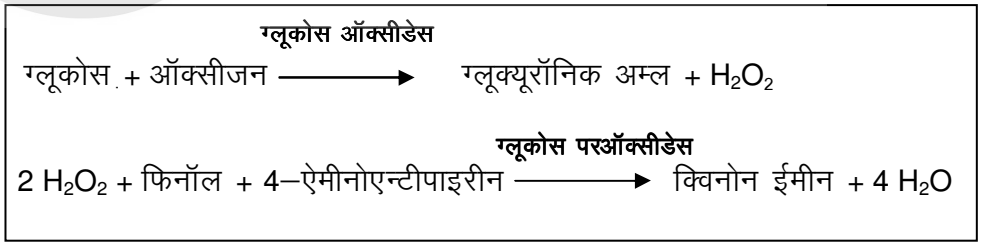
इस प्रयोग का अध्ययन और प्रदर्शन करने के बाद, आपको निम्नलिखित में सक्षम होना चाहिए :

- ❖ रूधिर से सीरम या प्लाज़्मा अलग करने में;
- ❖ रूधिर ग्लूकोस आकलन करने में; और
- ❖ रूधिर ग्लूकोस आकलन के चिकित्सीय महत्व को समझाने में।

1.2 सिद्धान्त

इस परीक्षण में दो एन्ज़ाइम का उपयोग होता है : ग्लूकोस ऑक्सीडेस (GOD) और ग्लूकोस परऑक्सीडेस (POD)। ग्लूकोस ऑक्सीडेस ग्लूकोस को फ्लेविन प्रोस्थेटिव समूह FAD के $FADH_2$ में अपचयन के साथ ग्लूक्यूरॉनिक अम्ल में ऑक्सीकृत कर देता है। अभिक्रिया में $FADH_2$ को FAD में पुनः ऑक्सीकृत करने के लिए ऑक्सीज़न और H_2O_2 की आवश्यकता होती है। यह एन्जाइम ग्लूकोस के β–ऐनोमर के लिए विशिष्ट होता है। दोनों ऐनोमर (α और β) विलयन में विवृत श्रृंखला रूप (open chain form) के माध्यम से अंतर–परिवर्तनीय होते हैं, जिससे नमूने में कुल ग्लूकोस का आकलन हो पाता है। परऑक्सीडेस मुक्त हाइड्रोजन परऑक्साइड पर कार्य करता है, जो ऑक्सीजन को वर्णजनिक (chromogenic) सिस्टम पर स्थानांतरित करता है। इसके परिणामस्वरूप फिनॉल का ऑक्सीकरण होता है, जो फिर 4–ऐमीनोएन्टीपाइरीन (AAP) के साथ संयुक्त होकर एक गुलाबी/लाल रंग का क्विनोन ईमीन रंजक बनाता है, जिसका अवशोषणांक उचिष्ट (λ_{max}) 510 nm पर होता है। गुलाबी/लाल रंग के रंजक की तीव्रता नमूने में ग्लूकोस की सांद्रता के समानुपाती (directly proportional) होता है **(चित्र 1.1)**।

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY



चित्र 1.1 : गॉड (ग्लूकोस ऑक्सीडेस) पॉड (परऑक्सीडेस) द्वारा उत्प्रेरित अभिक्रियाएँ।

1.3 आवश्यक सामग्री

1. मानव रूधिर (2-3 ml)
2. फ्लोराइड–ईडीटीए शीशी (Flouride –EDTA vial) या फ्लोराइड शीशी
3. फॉस्फेट उभयप्रतिरोधी (phosphate buffer), pH 7.5
4. एंजाइम : (a) ग्लूकोस ऑक्सीडेस (30 यूनिट प्रति मि.ली.) (b) परऑक्सीडेस (1.0 यूनिट प्रति मि.ली.)
5. फीनॉल (0.1% भार के अनुसार)

6. 4–ऐमीनोएन्टीपाइरीन (0.1% भार के अनुसार)

7. मानक ग्लूकोस (100 मि. ग्रा. प्रति डेसीलीटर)

8. अपकेंद्रित्र (सेन्ट्रीफ्यूज; centrifuge)

9. वर्णमापी या स्पेक्ट्रमी प्रकाशमापी (colorimeter or spectrophotometer)

10. आसुत जल (distilled water)

1.4 विधिक्रम

(अ) रूधिर से प्लाज़्मा या सीरम का पृथक्करण

प्लाज़्मा का पृथक्करण

(1) रूधिर को फ्लोराइड – ईडीटीए शीशियों में इकट्ठा करें और फिर दो से तीन बार धीरे से हिलाएं।

(2) अब रूधिर को एपेंडोर्फ नलियों में स्थानांतरित कीजिए और 15 मिनट तक 2000 g (4°C) पर उसका अपकेन्द्रण करें।

(3) अपकेन्द्रण के बाद, आप देखेंगे कि ऊपर की हल्के पीले रंग की परत (प्लाज़्मा) रक्त कोशिकाओं से पृथक हो जाती हैं। प्लाज़्मा प्रतिस्कन्दकों द्वारा उपचारित रूधिर का कोशिका मुक्त तरल भाग हैं। इसमें स्कन्दक कारक होते हैं।

(4) इसे सावधानी से एक साफ पिपेट (pipette) का उपयोग कर एक 2.0 मि.ली. की एपेंडॉर्फ नली में स्थानांतरित कीजिए। ध्यान रहें कि रक्त कोशिकाओं की अन्य परतें न हिलें।

(5) इस प्लाज़्मा को तुरंत -80°C पर फ्रीजर में जमा दें और पैलेट (pellet) को फेंक दीजिए।

सीरम का पृथक्करण

(1) रूधिर को फ्लोराइड शीशियों में इकट्ठा करें और दो से तीन बार धीरे–धीरे हिलाएं।

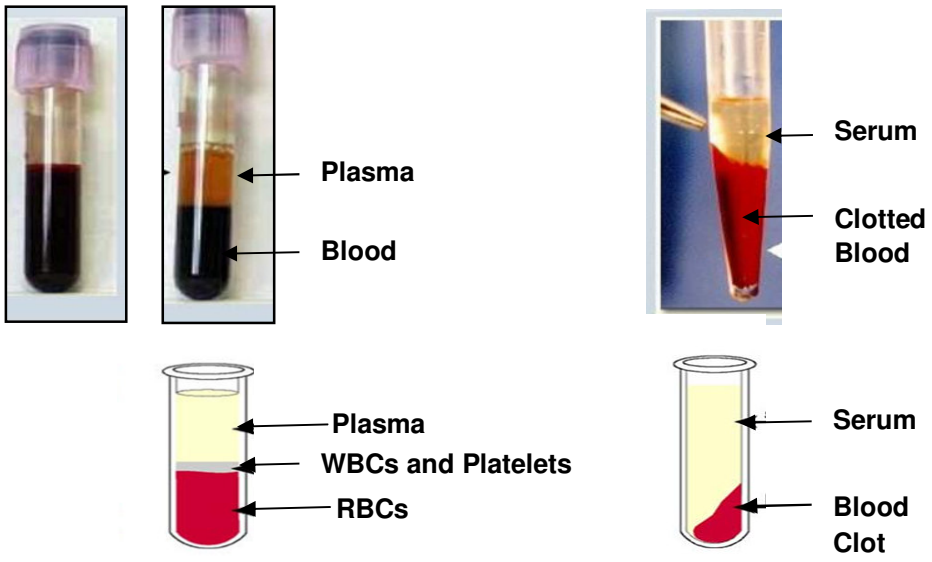
(2) इस इकट्ठा किए गए रूधिर को कमरे के ताप (37°C) पर 30 मिनट के लिए बिना छेडे थक्का बनने देने के लिए छोड़ दीजिए। एक कांच की छड़ी की मदद से शीशी से चिपके हुए थक्के को निकालने की कोशिश करें।

(3) थक्का युक्त रूधिर को एपेंडोर्फ नली (2 ml) में स्थानांतरित कीजिए और उसका 10 मिनट तक 1000 g (4°C) पर अपकेन्द्रण करें।

(4) अपकेन्द्रण के बाद, ऊपर की हल्के पीले रंग की परत (सीरम) को एक साफ पिपेट का उपयोग कर एक 2.0 ml की एपेंडोर्फ नली में ले लीजिए। सीरम में प्रतिस्कन्दक कारक नहीं होते।

(5) इस सीरम को तुरंत -80°C पर फ्रीजर में जमा दीजिए (चित्र 1.2)।

नोट : प्लाज़्मा/सीरम को विश्लेषण के लिए सीधे भी उपयोग में लिया जा सकता है। ग्लूकोस का स्तर 2 – 8°C पर 24 घंटे तक स्थिर रहता है, यदि रूधिर इकट्ठा करने के 30 मिनट के भीतर सीरम/प्लाज़्मा तैयार कर लिया जाए। यदि विश्लेषण में देरी हो रही हो तो इसे – 80°C पर संग्रहित कर लेना चाहिए।



चित्र 1.2 : (a) प्लाज़्मा तथा (b) सीरम का रूधिर से पृथक्करण और उनके घटक।

(ब) अभिकर्मकों की तैयारी

आकलन शुरू करने से पहले, आपकों विलयन तैयार करने होंगे।

(1) फॉस्फेट उभयप्रतिरोधी (बफर) (pH 7.5) : 1M डाइपोटैशियम हाइड्रोजन फॉस्फेट (K_2HPO_4) और 1M पोटैशियम डाइहाइड्रोजन फॉस्फेट (KH_2PO_4) के मानक विलयन तेयार करें। फिर 50 मि.ली. बफर (pH 7.5) बनाने के लिए 1M KH_2PO_4 के 9.4 मि.ली. को 40.6 मि.ली. 1M K_2HPO_4 के साथ मिलाएँ। मिलाने के बाद pH मीटर की मदद से विलयन के pH की जाँच करें।

(2) कार्यकारी अभिकर्मकों (working reagents) को तैयार करने के लिए ग्लूकोस ऑक्सीडेस (GOD) और परऑक्सीडेस (POD) के मानक विलयनों को फॉस्फेट बफर के साथ तनु (dilute) करें।

(3) मानक ग्लूकोस (100 mg%) विलयन : 100 मि.ग्रा. ग्लूकोस के 100 मि.ली. फॉस्फेट बफर में घोलें।

(4) फिनॉल (0.1% भार के अनुसार) : 100 मि.ग्रा. फिनॉल तोलिए और इसे 100 मि. ली. फॉस्फेट बफर में घोलें।

(5) 4–एमीनोएन्टीपाइरीन (0.1% भार के अनुसार) : 4–एमीनोएन्टीपाइरीन का 100 मि.ग्रा. फॉस्फेट बफर में घोलें और 100 मि.ली. मात्रा बनांए।

(स) ग्लूकोस का आकलन

(1) तीन परखनलियां लीजिए और उन्हें लोपित (B; Blank), मानक (S; Standard) और परीक्षण (T; Test) चिन्हित कीजिए।

(2) अब प्रत्येक नली में 980 µl फिनॉल और 980 µl 4-एमीनोएन्टीपाइरीन डालें।

(3) इसके बाद इन तीनों नलियों में GOD और POD प्रत्येक का 20 µl लें।

(4) सभी घटकों को धीरे से मिश्रित करें।

(5) T चिन्हित नली में प्लाज़्मा या सीरम के नमूने के 20 µl को पिपेट द्वारा लें। यह निश्चित करें कि प्रयोग करने से पहले जमा हुआ नमूना पूरी तरह से गल गया है।

(6) मानक का 20 µl (S) चिन्हित नली में लें।

(7) सभी परखनलियों में आसुत जल द्वारा आयतन 3 मि.ली. तक बनाएं। घटकों को मिश्रित करें और 10 मिनट के लिए नलियों को 37°C पर उष्मांयित (incubate) कीजिए।

आजकल ग्लूकोस आकलन के लिए तैयार किट भी उपलब्ध हो जाती हैं।

1.5 प्रेक्षण और परिणाम

सारणी 1.1 में प्रेक्षण रिकार्ड करें:

सारणी 1.1: प्रेक्षण सारणी

क्र. सं.	**सीरम या प्लाज़्मा का आयतन (µl)**	**मानक ग्लूकोस विलयन का आयतन (µl)**	**गॉड (GOD) का आयतन (µl)**	**पॉड (POD) का आयतन (µl)**	**4–एएपी का आयतन (µl)**	**फीनॉल का आयतन (µl)**	**आसुत जल का आयतन (µl)**		**510 nm पर अवशोषणांक**
1 लोपित (B)	0.0	0.0	20	20	980	980	2000	मिश्रित और 10 मिनट के लिए 37°C पर उष्मायित करें	
2 मानक (S)	0.0	20	20	20	980	980	1980		
3 परीक्षण (T)	20	0.0	20	20	980	980	1980		

यह अवशोषणांक रूधिर में उपस्थित ग्लूकोस की सांद्रता के समानुक्रमानुपाती होता है। इसका परिकलन निम्नलिखित सूत्र का उपयोग करके की जा सकती है :

$$\text{ग्लूकोस (mg/dl)} = \frac{\text{परीक्षण (T) का अवशोषणांक - लोपित (B) का अवशोषणांक}}{\text{मानक (S) का अवशोषणांक- लोपित (B) का अवशोषणांक}} \times 100$$

जैविक संदर्भ रेंज :

ग्लूकोस (भूखे पेट; fasting) : 60-100 mg/dl

ग्लूकोस PP (भोजन पश्चात ; post prandial) : 100-140 mg/dl

ग्लूकोस (किसी भी समय; random) : 60-130 mg/dl

इन संदर्भों से परे मान शर्करा उपापचय में असामान्यताओं का संकेत दे सकते हैं और मधुमेह के निदान के लिए उपयोग किए जाते हैं। जबकि निम्न मान अल्पग्लूकोसरक्तता (हाइपोग्लासीमिया) की ओर इशारा करते हैं ; उच्च मान मधुमेह का संकेत दे सकते हैं। यह परीक्षण निदान की पुष्टि के लिए दोहराया जाता है।

इसके साथ ही ग्लूकोस सहयता परीक्षण (glucose tolerance test; ग्लूकोस टॉलरेंस टेस्ट- GTT; जीटीटी) शर्करा के प्रति हमारे शरीर की प्रतिक्रिया को निर्धारित करने के लिए किया जाता है। रोगी को 100 ग्राम ग्लूकोस युक्त शर्करा का घोल पिलाया जाता है और नियमित अंतराल पर नमूने लेकर ग्लूकोस के स्तर की निगरानी की जाती है ताकि यह निर्धारित किया जा सके कि ग्लूकोस स्तर को सामान्य स्तर तक कम होने में कितना समय लगता है। दो घंटे बाद, निम्नलिखित परिणामों की व्याख्या की जाती है :

(i) यदि रक्त ग्लूकोस स्तर 140 mg/dl से कम है – सामान्य

(ii) यदि रक्त ग्लूकोस स्तर 140 और 199 mg/dl के बीच है – दोषपूर्ण ग्लूकोस सहयता या प्रीडायबिटीक (prediabetic) जो टाइप 2 मधुमेह के विकास के जोखिम को इंगित करता है।

(iii) यदि रक्त ग्लूकोस स्तर 200 mg/dl या अधिक है – मधुमेह हो सकता है।

1.6 सावधानियाँ

(1) अभिकर्मक प्रकाश के प्रति संवेदनशील है। इसे प्रत्यक्ष प्रकाश से संरक्षित किया जाना चाहिए (गहरे रंग की बोतल में भरकर रखें)। 2-8°C पर यह 2 सप्ताह तक स्थायी रहता है।

(2) फ्लोराइड या फ्लोराइड–ईडीटीए शीशियों में रूधिर को धीरे–धीरे मिश्रित किया जाना चाहिए, ताकि रूधिरलयन (haemolysis; हीमोलाइसिस) कम से कम हो।

(3) अवशोषणांक को यथासंभव 1 से 1.5 घंटे के भीतर रिकार्ड कर लेना चाहिए।

(4) यदि परीक्षण नमूने की ग्लूकोस सांद्रता 500 mg% से अधिक हो जाती है, तो नमूने को उचित रूप से तनु करें और आमापन को पुनः करें।

प्रयोग 2

सूक्ष्मजीवों द्वारा शर्करा किण्वन

रूपरेखा

2.1 प्रस्तावना

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

2.2 सिद्धान्त

2.3 आवश्यक सामग्री

2.4 विधिक्रम

2.5 प्रेक्षण और परिणाम

2.6 सावधानियाँ

2.7 सारांश

2.1 प्रस्तावना

सूक्ष्मजीवों द्वारा शर्कराओं (मोनोसैकराइड और डाइसैकराइड) का किण्वन विविध प्रकार के उत्पाद उत्पन्न करता है। कार्बनिक अम्ल, उदाहरण के लिए ऐसीटिक अम्ल, लैक्टिक अम्ल तथा प्रोपिऑनिक अम्ल और गैंसे जैसे कार्बन डाइऑक्साइड तथा हाइड्रोजन कार्बोहाइड्रेट के विखंडन से प्राप्त सामान्य उत्पादों में से हैं। इन अंतिम उत्पादों के प्रकार और अनुपात जीव और किण्वित कार्बोहाइड्रेट पर निर्भर करते हैं। कुछ सूक्ष्मजीव अम्ल और गैस दोनों का उत्पादन करते हैं ; कुछ केवल अम्ल जबकि अन्य न तो अम्ल और न ही गैस का उत्पादन करते हैं।

इस प्रयोगशाला अभ्यास में, आप दिए गए जीवाणु संवर्ध (bacterial culture) द्वारा शर्कराओं (कार्बोहाइड्रेट) के किण्वन से अम्ल और गैस के बनने का पता लगाने के लिए सरल प्रक्रियाओं का उपयोग करेंगे।

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

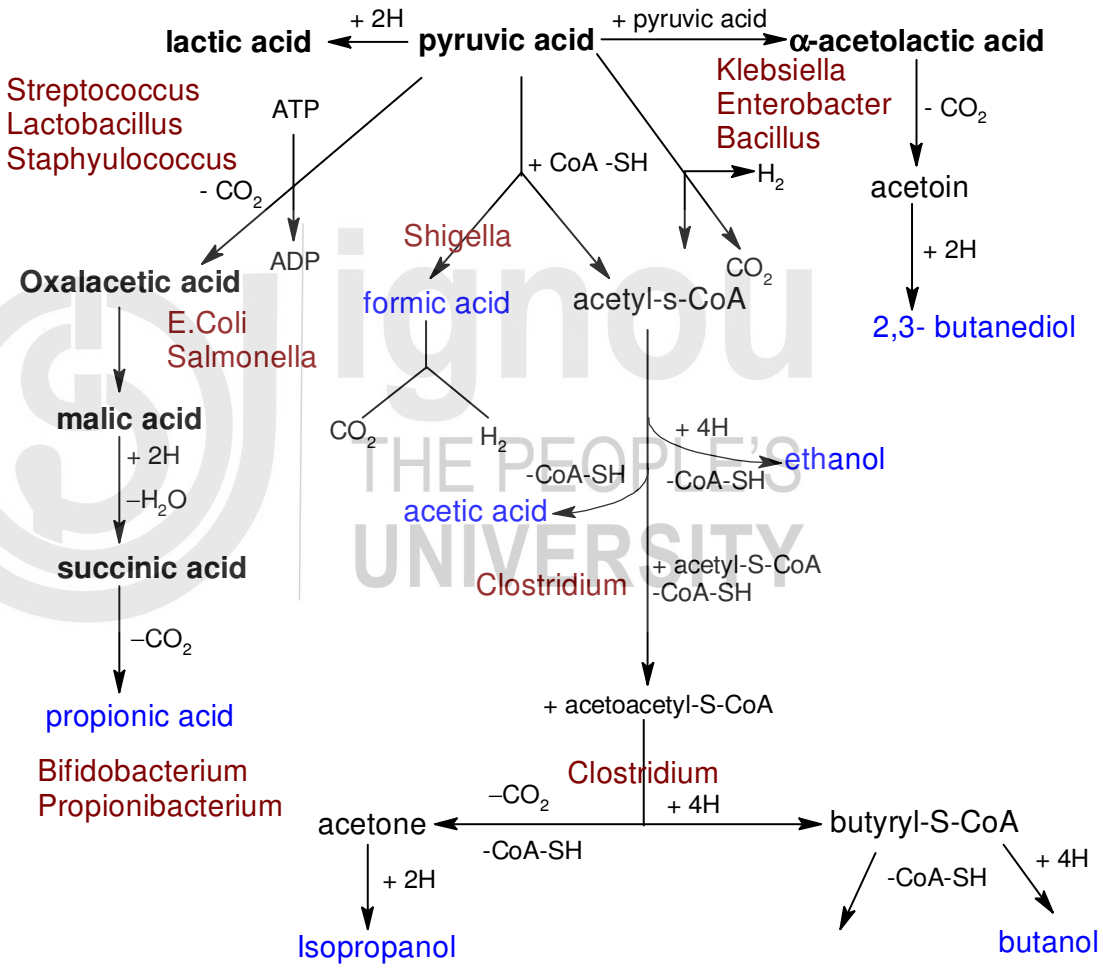
इस प्रयोग का अध्ययन और प्रदर्शन करने के बाद, आपको निम्नलिखित में सक्षम होना चाहिए :

- ❖ कार्बोहाइड्रेट का किण्वन करने में;
- ❖ सरल विधियों द्वारा अम्ल और गैस के उत्पादन की उनकी क्षमता निर्धारित करने में; और
- ❖ अम्ल और गैस उत्पादों के लिए उत्तरदायी जीवाणु के किण्वन मार्ग जानने में।

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

2.2 सिद्धान्त

सूक्ष्मजीव कार्बोहाइड्रेटों के निम्नीकरण और किण्वन करने की अपनी क्षमता में अत्यंत बहुमुखी होते हैं। उनके पास कार्बोहाइड्रेट और अन्य अणुओं को विभिन्न प्रकार के अंतिम उत्पादों में बदलने के लिए एंजाइमों का मिश्रित संयोजन होता है। कुछ लैक्टोज, सुक्रोज और माल्टोज या इनसे भी अधिक जटिल कार्बोहाइड्रेटों से शुरू कर सकते हैं और उनके ग्लाइकोसिडिक आबंधों को तोड़ सकते हैं । इन से प्राप्त अधिकांश मोनोसैकराइडों को एम्बडेन–मेयेरहॉफ़ मार्ग (ग्लाइकोलिसिस मार्ग) द्वारा पाइरूविक अम्ल में परिवर्तित किया जाता है। ये पायरूवेट से विविध प्रकार के अंतिम उत्पाद उत्पन्न करते हैं। यहाँ तक कि एक विशेष जीवाणु मिश्रित अम्ल किण्वन के रूप में कई उत्पाद उत्पन्न कर सकते हैं। इस क्षमता को चित्र 2.1 में देखा जा सकता है।



चित्र 2.1 : विभिन्न जीवाणु प्रजातियों (species) के शर्करा किण्वन प्रतिरूप।

अवायवीय (anaerobic) परिस्थितियों के अंतर्गत कार्बोहाइड्रेटों का किण्वन ब्रॉथ युक्त एक डुरहम नली (उलटी भीतरी शीशी) में किया जाता है। गैस उत्पादन का पता लगाने के लिए इसका निरीक्षण किया जाता है, जो बुलबुले के रूप में दिखाई देती है और pH सूचक (फीनॉल रेड) का उपयोग अम्ल के बनने पर pH परिवर्तन का पता लगाने के लिए किया जाता है।

2.3 आवश्यक सामग्री

ब्रॉथ माध्यम : 1 लीटर माध्यम तैयार करने के लिए आपको निम्नलिखित सामग्री की आवश्यकता होगी :

1. सोडियम क्लोराइड : 1 gm
2. प्रोटियोस पेप्टोन नंबर – 3 : 10 gm
3. शर्करा (ग्लूकोस या सुक्रोस या माल्टोस या लैक्टोस) : 10 gm
4. बीफ अर्क : 1 gm
5. फीनॉल रेड सूचक : 0.018 gm (0.25% फीनॉल रेड सूचक का 7.2 ml)

नोट : फीनॉल रेड सूचक उदासीन या क्षारीय विलयन में लाल और अम्लीय विलयन में पीला होता है। आप ब्रोमोक्रेसोल/ब्रोमोक्रेसोल पर्पल (BCP) ब्रोमोथाइमोल/ब्रोमोथइमोल ब्लू (BTB) का भी उपयोग कर सकते हैं।

6. परख नलियाँ (13 × 100 mm साइज)
7. डुरहम नलियाँ (ये उल्टी शीशियाँ होती हैं जो उत्पन्न गैस को इकट्ठा करने के लिए उपयोग में लायी जाती हैं)।
8. आसुत जल

2.4 विधिक्रम

(अ) ब्रॉथ माध्यम की तैयारी

(1) ब्रॉथ माध्यम के सभी अवयवों (भाग 2.3 देखें) को आसुत जल में मिलाकर ब्रॉथ माध्यम तैयार कीजिए। आयतन 1000 ml तक कर लीजिए। सामग्री को विलेय करने के लिए धीरे–धीरे गरम करें।

(2) जीव की किण्वन क्षमताओं को निर्धारित करने के लिए प्रत्येक ब्रॉथ माध्यम की तैयारी के लिए एक एकल शर्करा स्रोत का उपयोग किया जाता है। ब्रॉथ माध्यम को डाली गई शर्करा के आधार पर नामित किया जाता है। इस आधार पर आपके पास चार अलग–अलग ब्रॉथ माध्यम हैं, जिनके नाम हैं :

(i) फीनॉल रेड ग्लूकोस ब्रॉथ,

(ii) फीनॉल रेड लैक्टोस ब्रॉथ,

(iii) फीनॉल रेड माल्टोस ब्रॉथ, और

(iv) फीनॉल रेड सुक्रोस ब्रॉथ,

(3) प्रत्येक जीवाणु संवर्ध को अलग–अलग ब्रॉथ माध्यम के 5 मि. ली. के साथ चार परखनलियों में लीजिए। निश्चित कीजिए कि प्रत्येक पर उसमें डाले जाने वाले माध्यम और जीवाणु का नाम उचित तरीके से चिन्हित हो।

(4) तब डुरहम नली को परखनली में लगाएं।

(5) अंत में परखनली को रबर के ढक्कन से बंद कर दीजिए।

(6) ब्रॉथ माध्यम को रोगाणु रहित करने के लिए उसे 15 मिनट के लिए 121°C पर ऑटोक्लेव करें। आप देखेंगे कि ठंडा होने पर, ब्रॉथ माध्यम का रंग हल्का लाल होता है।

(ब) संरोपण और ऊष्मायन (inoculation and incubation)

(1) संवर्ध नली/प्लेट का ढक्कन हटाएं और रोगाणु रहित लूप के साथ इसमें से अपूतित रूप (aseptically) से जीवाणुओं का एक भरा हुआ लूप ले लें और संवर्ध नली/प्लेट को रैक में वापिस रख दें।

(2) शर्करा ब्रॉथ नली लें, ढक्कन हटाएं और इसके सिरे को ज्वाला में से कई बार तेज़ी से घुमाकर जीवाणुरहित कर लें।

(3) लूप से जीवाणुओं को ब्रॉथ सतह से नीचे स्थानांतरित करें।

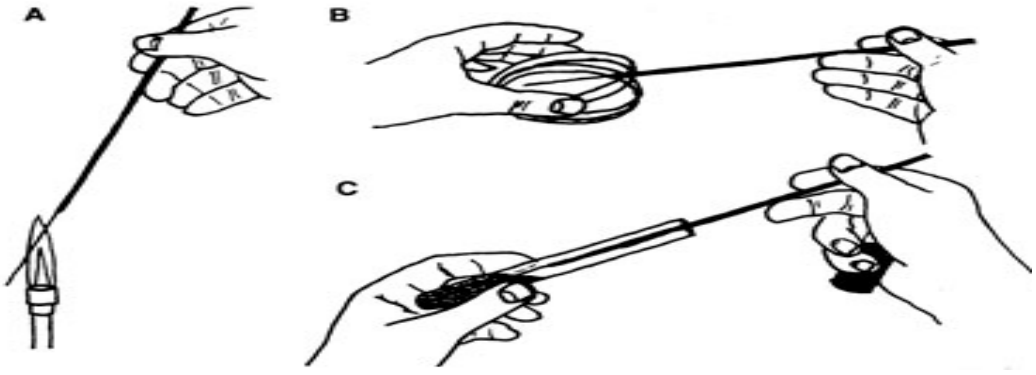
(4) नली पर ढक्कन लगा दें और इसे वापस रैक में रख दें।

(5) लूप को ज्वाला में लाल होने तक गरम करें।

(6) शेष ब्रॉथ नलियों के लिए संरोपण की प्रक्रिया को दोहराएँ (चित्र 2.2)।

(7) 37°C पर 24 से 48 घंटे तक नलियों को ऊष्मायित करें। असंरोपित नियंत्रण नलियों (uninoculated control tubes) का एक सेट शामिल किया जाना चाहिए।

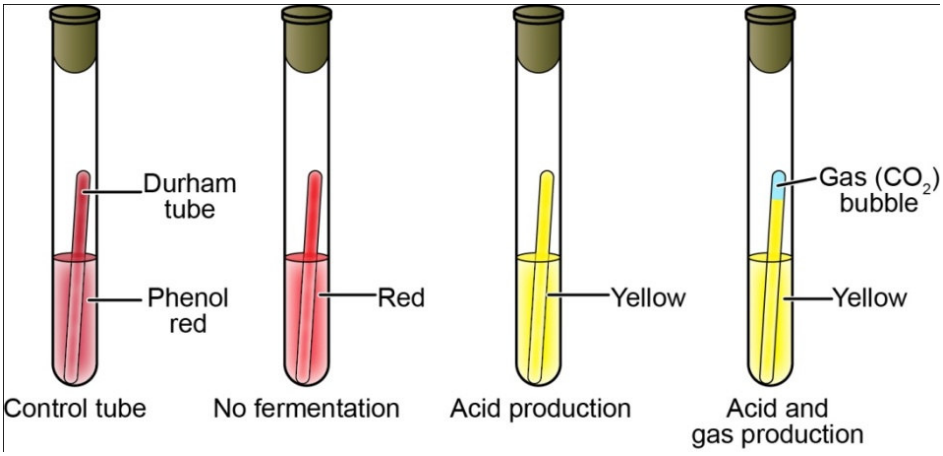
(8) अम्ल तथा गैस उत्पादन के लिए नलियों के प्रेक्षण लें। अपने प्रेक्षण रिकार्ड करें।



चित्र 2.2 : शर्करा ब्रॉथ में जीवाणुओं का संरोपण : A संरोपित की जाने वाली लूप को ज्वाला में लाल होने तक गरम करके और फिर ठंडा करके रोगाणु रहित करना । B जीवाणु संवर्ध की धारी लगाना (streaking) या C जीवाणु युक्त संरोपित सुई /लूप को थोड़ा हिलाते हुए ब्रॉथ सतह के नीचे रखना।

2.5 प्रेक्षण और परिणाम

प्रत्येक परखनली में गैस बुलबुले बनने और अम्ल उत्पादन के लिए ब्रॉथ के रंग का लाल से पीले रंग में परिवर्तन को देखने के लिए डुरहम नली का अवलोकन करें (**चित्र 2.3**)।



चित्र 2.3 : जीवाणुओं द्वारा शर्करा किण्वन के संभावित परिणामों को दर्शाते हुए एक नियंत्रण नली (control tube) और तीन प्रायोगिक नलियाँ (experimental tubes)।

तालिका 2.1: प्रेक्षण सारणी

जीवाणु का नाम → / ब्रॉथ माध्यम ↓	किण्वित शर्करा			अम्ल उत्पादन			गैस उत्पादन		
	क	ख	ग	क	ख	ग	क	ख	ग
ग्लूकोस									
लैक्टोस									
माल्टोस									
सुक्रोस									

क - जीवाणु संवर्ध 1; **ख** - जीवाणु संवर्ध 2; **ग** - जीवाणु संवर्ध 3

अपने अध्यापक से जीवाणु संवर्ध के नाम के बारे में पूछिए।

2.6 सावधानियाँ

(i) पोषक ब्रॉथ अवयव अध्ययन किए जाने वाले सभी जीवों की वृद्धि में सहायक होने चाहिएं।

(ii) संरोपित किए जाने वाली सुई या लूप को प्रत्येक स्थानांतरण के बाद ज्वाला के सबसे गर्म भाग (हलका नीला शंकु) में रखकर तार के पूरा लाल गर्म होने तक रखकर रोगाणु रहित करना चाहिए।

(iii) संवर्ध से जीवाणु कोशिकाओं को फिर से लेने से पहले इसे ठंडा होने दें।

(iv) लूप को नीचे न रखें या उसे इधर–उधर न हिलाएं।

(v) हमेशा जाँच की जाने वाली प्रत्येक शर्करा के लिए एक नियंत्रण नली (असंरोपित) रखें।

(vi) संरोपण के दौरान नली को हिलाएं नहीं, क्योंकि ऐसा करने से हवा का बुलबुला उलटी रखी काँच की शीशी में जा सकता है, जिससे गैस के बनने का एक गलत संदेश मिलता है।

(vii) संरोपित की जाने वाली प्रत्येक नली पर जीव और शर्करा स्रोत के नाम का लेबल लगाएं।

(viii) 48 घंटों के भीतर संवर्ध का निरीक्षण करें। अगर देरी हो रही हो तो नली को फ्रिज में रखें।

2.7 सारांश

(i) जीव : ....

(ii) शर्करा : ....

(iii) परीक्षण परिणाम : ....

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

प्रयोग 3

लार ऐमिलेस द्वारा स्टार्च पाचन का प्रदर्शन

रूपरेखा

3.1 प्रस्तावना

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

3.2 सिद्धान्त

3.3 आवश्यक सामग्री

3.4 विधिक्रम

3.5 प्रेक्षण और परिणाम

3.6 सावधानियाँ

3.1 प्रस्तावना

स्टार्च एक भंडारण पॉलीसैकेराइड है जो कि पादप स्रोतों जैसे गेहूँ, चावल, आलू आदि से प्राप्त होता है। यह ग्लूकोस का एक समबहुलक है, जो एक रैखिक बहुलक, ऐमिलोस और एक शाखित बहुलक, ऐमिलोपेक्टिन बनाने के लिए बहुलकन करता है। इन दो बहुलकों का अनुपात एक पौधे के स्रोत से दूसरे तक भिन्न हो जाता है। जब स्टार्च युक्त भोजन खाया जाता है तो इसका पाचन मुँह में लारयुक्त ऐमिलेस द्वारा होने लगता है। यह एंजाइम स्टार्च के पाचन में महत्वपूर्ण भूमिका निभाता है। इस प्रयोगशाला अभ्यास में, आप आयोडीन का उपयोग करके लार वाले ऐमिलेस द्वारा स्टार्च पाचन की गुणात्मक निगरानी करेंगे।

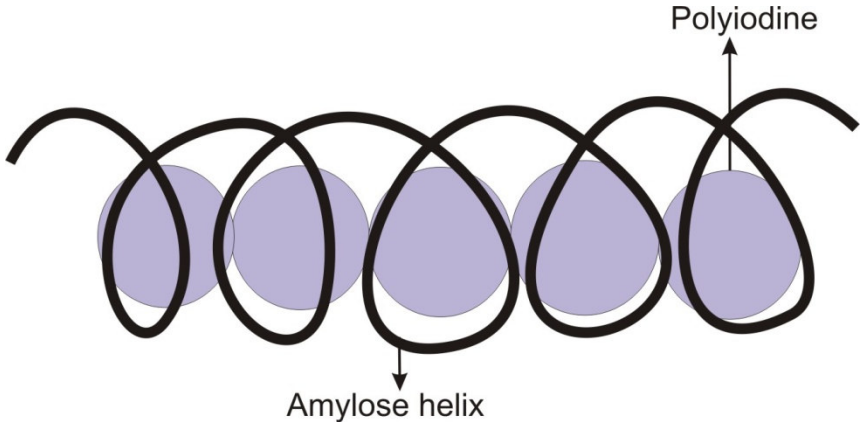
अपेक्षित अध्ययन परिणाम

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

- लार ऐमिलेस का अपरिष्कृत अर्क (crude extract) तैयार करने में;
- लार ऐमिलेस द्वारा स्टार्च के पाचन को प्रदर्शित करने में; और
- मुँह में स्टार्च के शरीरक्रियात्मक पाचन को समझाने में।

3.2 सिद्धान्त

आयोडीन आमतौर पर स्टार्च की उपस्थिति का पता लगाने के लिए प्रयोग किया जाता है। रैखिक अमाइलोज स्टार्च की संरचना एक कुंडलित श्रृंखला (helical chain) बनाती है जिसमें आयोडीन फंस जाता है और नीला रंग देता है (चित्र 3.1)।



चित्र 3.1 स्टार्च – आयोडीन कॉम्प्लेक्स का निर्माण।

आप देखेंगे कि आयोडीन का घोल बनाते समय KI मिलाया जाता है। इसकी वजह यह है आणविक आयोडीन (I_2) पानी में बहुत घुलनशील नहीं है; KI मिलाने से इसकी घुलनशीलता में वृद्धि होती है। इसके अलावा इसके परिणामस्वरूप आवेश स्थानान्तरण (charge transfer, CT) समष्टि का निर्माण होता है जो आयोडीन को गहरा भूरा रंग देता है। I_2/KI मिलकर पॉलीआयोडाइड आयन बनाते हैं ; जैसे I_3^-, I_5^- या I_7^-. ये आवेशित आयन CT समष्टि बनाने के लिए उदासीन I_2 को आवेश प्रदान करते हैं। ये प्रकाश से उत्तेजित होने पर अलग–अलग रंग देते हैं जो समग्रता में भूरा रंग दिखाई देता है। जब एमाइलोज मिलाया जाता है, तो यह स्टार्च – आयोडीन कॉम्प्लेक्स बनाता है जो पॉलीआयोडाइड से अलग तरंग दैर्ध्य (wavelength) पर प्रकाश अवशोषित करता है, जिसके परिणामस्वरूप नीला रंग दिखाई देता है।

3.3 आवश्यक सामग्री

1. स्टार्च विलयन (1%, 1 g स्टार्च को 100 ml आसुत जल में विलेय किया जाता है।)

2. आसुत जल

3. आयोडीन/पोटैशियम आयोडाइड (I_3K) विलयन

   आयोडीन 2.0 g, पोटैशियम आयोडाइड (KI) 4.0 g आसुत जल 100 ml आयोडीन और KI को मॉर्टर में पीस कर 100 ml शंक्वाकार फ्लास्क (conical flask) में स्थानांतरित कीजिए। धीरे–धीरे जल डालते और मिश्रित करते हुए घोलें। आयतन 100 ml तक बनाएं। प्रत्यक्ष प्रकाश से संरक्षित करने के लिए इसे गहरे रंग की शीशी में भंडारित करें।

4. लार का विलयन (लार एमिलेस का स्रोत)

5. मलमल का कपड़ा
6. परखनलियाँ
7. ड्रॉपर
8. बर्फ के टुकड़े
9. स्टॉप वाच
10. थर्मामीटर
11. जल ऊष्मक (water bath)

3.4 विधिक्रम

(अ) लार के ऐमिलेस का अपरिष्कृत अर्क तैयार करना

(1) आसुत जल के साथ अपने मुँह में अच्छी तरह कुल्ला कर लें। यह सुनिश्चित करना है कि लार में कोई खाद्य कण नहीं है।

(2) मुँह में 5 ml आसुत जल लें और लगभग 3 मिनट तक गरारे करें। इस तरह लार को आसुत जल के साथ ठीक से मिलाया जाता है।

(3) अब, इसे एक बीकर में मुँह से निकाल दें।

(4) किसी भी तरह के निलंबित कणों से छुटकारा पाने के लिए लार के विलयन को मलमल के कपड़े से छान लें।

(5) इस छने हुए लार के विलयन को बर्फ में रखें और इसका उपयोग ऐमिलेस एंजाइम के स्रोत के रूप में कीजिए।

(ब) स्टार्च विलयन तैयार करना

(1) 1 g स्टार्च तोलें और इसे 100 ml के बीकर में रखें।

(2) 100 ml आसुत जल मापें।

(3) स्टार्च में पहले केवल 2-5 ml आसुत जल मिलायें और पेस्ट बनाने के लिए मिश्रित कीजिए।

(4) इसके बाद बाकी पानी भी मिला दें और अच्छे से मिश्रित कीजिए।

(5) अब इस विलयन को 5 मिनट उबालें और फिर इसे कमरे के ताप पर ठंडा होने के लिए रख दें।

(स) स्टार्च का पाचन

(1) एक परखनली में पिपेट द्वारा 1% स्टार्च विलयन का 5 ml डालें।

(2) इसमें 2 ml लार विलयन मिलाएं।

(3) 10–20 सेकंड तक परखनली को धीरे–धीरे हिलाकर विलयन को ठीक से मिश्रित कीजए।

(4) 37℃ पर स्थिर जल ऊष्मक में प्रयोगात्मक नलियों को रखें।

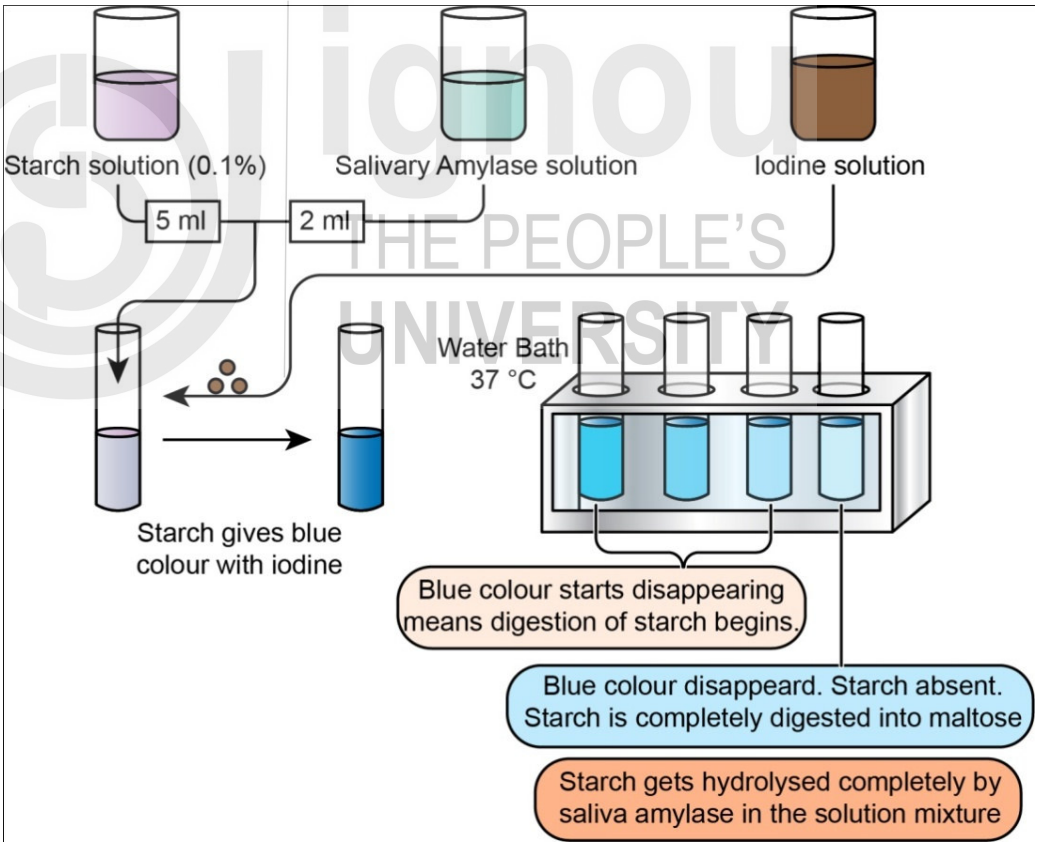
(5) अब, स्टॉप वाच शुरू करें।

(6) 1 मिनट पूरा होने के बाद, ड्रॉपर द्वारा विलयन की 1–2 बूंदे निकालें।

(7) 1 ml आयोडीन विलयन वाली परखनली में मिलाएं। यदि कोई रंग उत्पन्न हो तो उसका निरीक्षण करें।

(8) चरण 6 और 7 को हर एक मिनट के बाद दोहराएं जब तक कि स्टार्च के साथ आयोडीन का नीला–काला रंग के गायब नहीं हो जाता है।

(9) नीला–काला रंग गायब होना यह संकेत देता है कि स्टार्च का पाचन पूरा हो गया है।



चित्र 3.2 : आयोडीन मिलाकर देखा गया लार ऐमिलेस द्वारा स्टार्च का पाचन।

3.5 प्रेक्षण और परिणाम

एन्जाइमी पाचन से गुजरते हुए स्टार्च विलयन की 1–2 बूंदों को पिपेट द्वारा ले कर इसमें रंग की तीव्रता में बदलाव को 1 मिनट के अंतराल पर तब तक रिकार्ड किया जाता है, जब तक पाचन पूरा नहीं हो जाता ।

सारणी 3.1 : स्टार्च जलअपघटन की प्रेक्षण सारणी

समय	1 मिनट	2 मिनट	3 मिनट	4 मिनट	5 मिनट
रंग तीव्रता (विलयन का रंग)					

3.6 सावधानियाँ

1. लार एकत्र करने से पहले अपने मुँह को अच्छी तरह से कुल्ला करके साफ कर लें। लार के विलयन को छान लेना आवश्यक है।

2. एंजाइम के अपरिष्कृत अर्क को बर्फ में रखें, ताकि उसकी सक्रियता बनी रहे।

3. कभी भी मुँह से पिपेट न करें।

4. ध्यानपूर्वक 1 मिनट पर विभाज्यों को निकाल लें।

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

प्रयोग 4

टी एल सी द्वारा अंडे के लिपिडों का पृथक्करण और प्रभाजन एवं उनका आकलन

रूपरेखा

4.1 प्रस्तावना

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

4.2 सिद्धान्त

4.3 आवश्यक सामग्री

4.4 विधिक्रम

4.5 प्रेक्षण और परिणाम

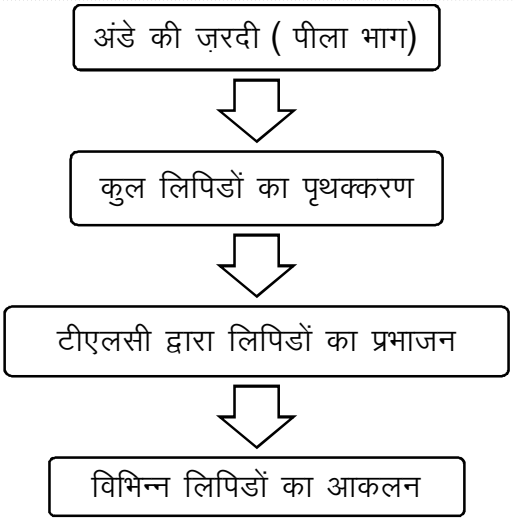
4.6 सावधानियाँ

ignou
THE PEOPLE'S
UNIVERSITY

4.1 प्रस्तावना

लिपिड जैव अणुओं के रासायनिक रूप से विविध समूह का प्रतिनिधित्व करते हैं जो जल में अपेक्षाकृत अविलेय और कार्बनिक विलायकों जैसे ऐल्कोहॉल, ईथर, क्लोरोफॉर्म और हाइड्रोकार्बन में विलेय होते हैं। इन्हें संरचना (ग्लिसरोलिपिड, स्फिंगोलिपिड, कोलेस्ट्रॉल, मोम आदि) और कार्य (झिल्ली लिपिड, भंडारण लिपिड, संकेतन अणु, प्रोटीन के स्थिरक लिपिड, संवाहक) के आधार पर वर्गीकृत किया गया है। लिपिड को उनके प्रबल क्षार के साथ अभिक्रिया के आधार पर साबुनीकरणीय (फॉस्फोग्लिसराइड ट्राइग्लिसराइड) या गैर–साबुनीकरणीय (कोलेस्ट्रॉल) में भी विभाजित किया जाता है।

इस प्रयोगशाला अभ्यास में, आप टी एल सी (thin layer chromatography; तनुस्तर क्रोमेटोग्रफी) द्वारा मुर्गी के अंडे के लिपिडों के पृथककरण तथा प्रभाजन और उनके आकलन के बारे में सीखने वाले हैं (चित्र 4.1)।



चित्र 4.1 : प्रायोगिक प्रक्रिया का सार।

मुर्गी के अंडे में अंडे की जरदी (पीले रंग वाली) लिपिडों (31%) का मुख्य स्रोत है। इसमें 46% ट्राइग्लिसरॉइड, 20% फॉस्फोलिपिड और 3% कोलेस्ट्रॉल होता है। लिपिड असंतृप्त वसा अम्लों [ओलिक अम्ल (47%), लिनोलीइक अम्ल (16%), पामिटोलेइक अम्ल (5%) और लिनोलीनिक अम्ल (2%)] और संतृप्त वसा अम्लों [पामिटिक अम्ल (23%), स्टिऐरिक अम्ल (4%) और मिरिस्टिक अम्ल (1%)] से भरपूर होते हैं।

अपेक्षित अध्ययन परिणाम

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

- ❖ अंडे की जर्दी से लिपिडों को अलग करने में;
- ❖ तनुस्तर क्रोमेटोग्राफी (टीएलसी) द्वारा लिपिड को अलग करने में;
- ❖ विभिन्न लिपिड के पृथक्करण के सिद्धांत की व्याख्या करने में, और
- ❖ नमूने में प्रभाजित लिपिडों की सांद्रता का आकलन करने में।

4.2 सिद्धान्त

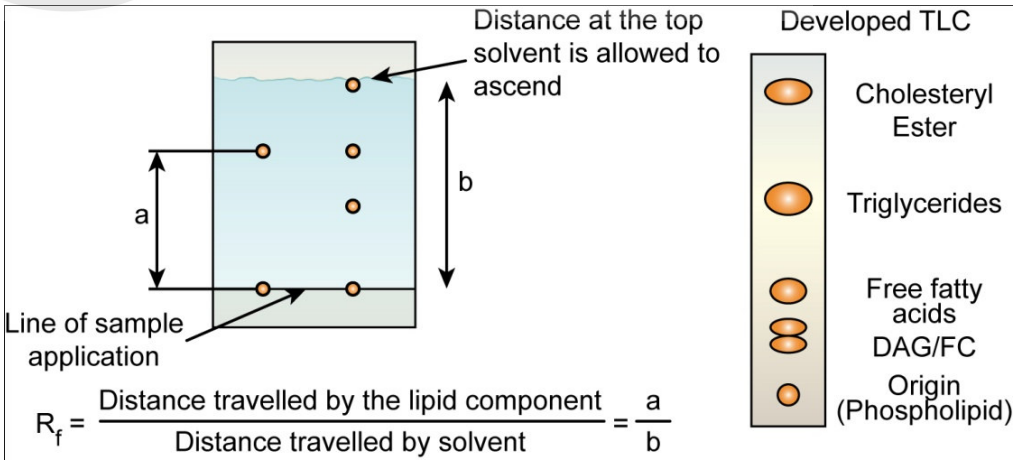
लिपिड जैव अणुओं का अध्रुवीय वर्ग है, जो जैविकीय स्रोतों से अध्रुवीय विलयों को प्रयोग कर शीघ्रता से अलग किए जाते हैं। अंडे की जर्दी से कुल लिपिड घटकों को सोडियम क्लोराइड, आइसोप्रोपिल ऐल्कोहॉल और पेट्रोलियम ईथर या विभिन्न ध्रुवीय प्रवृत्ति वाले दो या अधिक विलेयों के अन्य संयोजनों का उपयोग करके पृथक किया जाता है। पृथक किए गए लिपिड का प्रभाजन कॉलम में अधिशोषण क्रोमेटोग्राफी (adsorption chromotography) द्वारा किया जाता है। इस अभ्यास में हम लिपिड को तनुस्तर क्रोमेटोग्राफी (thin layer chromotoraphy, TLC) द्वारा पृथक् करेंगे।

एक उदासीन आधार पर पतली परत के रूप में क्रोमेटीग्राफीय अवशोषक का उपयोग सबसे पहले दो रूसी रसायनशास्त्रियों, एम. ए. इस्मालॉव और एम. एस. शराइबर (1938) द्वारा बताया गया। 1950 के दशक में तनुस्तर क्रोमेटोग्राफी की तकनीक अनिवार्य रूप

से प्लेट तैयार करने, बांइडर के उपयोग और पृथक्करणों के विभिन्न प्रकारों में सुधार के कारण व्यापक रूप से उपयोग की जाने लगी। यह सिलिका जेल या किसी भी सामग्री के साथ लेपित काँच या धातु की शीट पर किया जा सकता है, जिसे बारीक पीस कर, घोल बनाया जा सके और पतली परतों में फैलाया जा सके।

अवशोषक की पतली परत को स्थिर प्रावस्था (stationary phase) के नाम से जाना जाता है। वाष्शील विलयन में विलेय नमूने की निम्नतम मात्रा लेपित प्लेट पर लगाई जाती है। प्लेट को गतिशील प्रावस्था (विलयन/विलयनों का मिश्रण) (mobile phase) के वाष्प से संतृप्त कोष्ठ में रखा जाता है, जो कि केशिका क्रिया (capillary action) द्वारा प्लेट में ऊपर की ओर चढ़ता है। गतिशील प्रावस्था का चुनाव मिश्रण में पृथक किए जाने वाले घटकों की विशेषताओं के अनुसार किया जाता है। लिपिड प्रभाजन की स्थिति में लेपित सिलिका जेल जल के निष्कासन द्वारा सक्रियित की जाती है।

पृथक्करण मुख्यतः अवशोषण के आधार पर और कुछ हद तक द्रव्य-द्रव्य विभाजन के आधार पर होता है। अणु तभी पृथक होते हैं, जब उनका अवशोषण समताप रेखा (adsorption isotherm) भिन्न होता है। कम ध्रुवीय लिपिड सबसे अधिक दूर तक जाते हैं क्योंकि वे ध्रुवीय सिलिसिक अम्ल से अपेक्षाकृत कम बद्ध होते हैं (उच्च R_f मान ; चित्र 4.2)। सामान्यतः उदासीन लिपिड अध्रुवीय विलयनों और ध्रुवीय लिपिड अपेक्षाकृत ध्रुवीय विलयनों के साथ पृथक होते हैं। पृथक लिपिड को विभिन्न विधियों का प्रयोग कर देखा जा सकता है। ये विधियां या तो भंजक (destructive; 50% सल्फ्यूरिक अम्ल के बाद गर्म करना) या अभंजक (non destructive, आयोडीन वाष्प; डाइक्लोरोफ्लोरिसीन); कुछ अभिकर्मक विशेष लिपिड का पता लगाने में मदद करते हैं। अगर अभंजक विधियां प्रयोग की जाती हैं तो लिपिड को प्लेट से अधिशोषक को खुरच कर पुनः प्राप्त कर और आकलन के लिए परिष्कृत (processed) किया जा सकता है। यद्यपि इस अभ्यास में हम अंडे की जर्दी से पृथक किए गए कुल लिपिड का मानक वर्णमितीय विधियों (colorimetric methods) का उपयोग कर आकलन करेंगे।



चित्र 4.2 : तनुस्तर क्रोमेटोग्राफी द्वारा लिपिड घटकों का पृथक्करण।

4.3 आवश्यक सामग्री

(अ) अंडे की जर्दी से लिपिडों का पृथक्करण

1. मुर्गी का अंडा (1–2),

2. सोडियम क्लोराइड (IM),

3. आइसोप्रोपिल ऐल्कोहॉल,

4. पेट्रोलियम ईथर

5. काँच की नलियाँ और परखनलियाँ,

6. पृथक्कारी फ्लास्क (separating flask)।

(ब) टीएलसी द्वारा पृथक लिपिडों का प्रभाजन

1. सिलिका जेल की अनुस्तर प्लेंटे

2. पृथक्कारी कक्ष (separation chambers)

3. विलायक तंत्र (पेट्रोलियम ईथर : डाइएथिल ईथर : ग्लेशियल ऐसीटिक अम्ल ; 80: 20 : 1),

4. हाइड्रोकार्बन (n–हेक्साडेकेन और n–ऑक्टाडेकेन),

5. **मानक लिपिड** :

   (a) ट्राइऐसिलग्लिसरॉल (ग्लिसरॉल ट्राइओलिऐट, ग्लिसरॉलट्राइस्टिऐरेट और ग्लिसरॉल ट्राइपामिटेट),

   (b) कोलेस्ट्रॉल एस्टर (कोलेस्ट्रॉल ऐसीटेट, कोलेस्ट्रॉल ओलिऐट और कोलेस्ट्रॉल स्टिऐरेट)

   (c) मुक्त वसा अम्ल (ओलीक अम्ल, पामिटिक अम्ल और स्टिऐरिक अम्ल),

6. 2′, 7′–डाइक्लोरोफ्लुओरिसीन (95% v/v एथेनॉल में 2 g / लीटर),

7. सल्फ्यूरिक अम्ल (50% v/v),

8. ओवन (110°C पर),

9. पराबैंगनी लैंप।

(स) प्रभाजित लिपिडों का आकलन

(i) **कोलेस्ट्रॉल का आकलन**

1. फेरिक क्लोराइड – यूरेनिल ऐसीटेट अभिकर्मक

   इस विलयन को बनाने के लिए 10 ml जल में 500 mg फेरिक क्लोराइड को विलेय करें और फिर इसमें 3.0 ml सांद्र (concentrated) अमोनिया मिलाएं। ठीक से मिलाएं और पांच मिनट के लिए 2000 आर पी एम पर अपकेन्द्रित करें। अपकेन्द्रण के बाद, ऊपरी तरल को निथार लें और अवक्षेप को आसुत जल से 4–5 बार धोएं और फिर एक लीटर ग्लेशियल ऐसीटिक अम्ल में विलेय कर लीजिए। अंत में विलयन में 100 mg यूरेनिल ऐसीटेट डालें, अच्छी तरह मिलायें और रात भर के लिए छोड़ दीजिए।

नोट : यह अभिकर्मक छह महीने तक स्थिर रहता है।

2. सल्फ्यूरिक अम्ल–फेरस सल्फेट अभिकर्मक

100 mg फेरस सल्फेट को 100 ml ग्लेशियल ऐसीटिक अम्ल में विलेय करें। आप देखेंगे कि विलेयीकरण के दौरान ऊष्मा उत्पन्न होती है। विलयन के ठंडा होने के बाद सांद्र सल्फ्यूरिक अम्ल मिलाकर आयतन एक लीटर तक कर लीजिए।

नोट : इस अभिकर्मक का उपयोग छह महीने तक किया जा सकता है।

3. कोलेस्ट्रॉल मानक

कोलेस्ट्रॉल के 200 mg को 100 ml ऐसीटिक अम्ल में विलेय कर लीजिए। कार्यकारी मानक विलयन को संग्रह विलयन (200 mg/ml) के 1 ml में 100 ml ऐसीटिक अम्ल मिलाकर तनु करके तैयार किया जाता है।

(ii) **ट्राइऐसिलग्लिसरॉल का आकलन**

1. **क्लोरोफॉर्म और मेथेनॉल मिश्रण (अनुपात 2:1)।**

2. **सक्रियित सिलिसिक अम्ल**

सिलिसिक अम्ल को 4N or 2N HCl के साथ धो लीजिए। इसके बाद इसे पानी से बार–बार धो कर अम्ल का लेश मात्र भी दूर करें। धोए गए सिलिसिक अम्ल में पर्याप्त मात्रा में ईथर मिलाकर और निरंतर हिला करके सुखा लें। अधिप्लवी (supernatant) को त्याग दें, सिलिसिक अम्ल को 60°C पर सुखा लें और उपयोग करने से पहले रात भर 100°C पर गर्म कर सक्रियित कीजिए।

3. **H_2SO_4 (0.4N)**

व्यावसायिक रूप से उपलब्ध सल्फ्यूरिक अम्ल की नार्मलता 36N होती है। 25 ml आसुत जल मापें, एक बीकर में डालें और सावधानी से 1.11 ml सांद्र सल्फ्यूरिक अम्ल डालें, मिलाएं और आसुत जल से इसका आयतन 100 ml तक कर लें। अम्ल की मात्रा की गणना सूत्र $N_1V_1=N_2V_2$ का उपयोग करके की जा सकती है; जहां N_1 और N_2 क्रमशः सांद्र और तनु H_2SO_4 की नार्मलता हैं; V_1 और V_2 इनके आयतन हैं।

4. **साबुनीकरण अभिकर्मक**

5 g सोडियम हाइड्रॉक्साइड घोलकर उसे 60 ml आसुत जल में विलेय कर लें। इसके पूर्ण विलेय होने के बाद, इसमें 40 ml आइसोप्रोपेनॉल मिला दें।

5. **सोडियम मेटापरआयोडेट अभिकर्मक**

निर्जल अमोनियम ऐसीटेट का 77 g तोलें और इसे आसुत जल (700 ml) में विलेय कर लें। इसके पूर्ण विलेय होने के बाद, इसमें 60 ml ऐसीटिक अम्ल 650 mg सोडियम मेटापरआयोडेट मिलायें। उपयोग से पहले अभिकर्मक को आसुत जल द्वारा 11 गुना तनु किया जाता है।

6. **ऐसीटिल ऐसीटोन अभिकर्मक**

ऐसीटिल ऐसीटोन के 0.75 ml को आइसोप्रोपेनॉल के 20 ml के साथ ठीक से मिलायें। फिर इसमें 80 ml आसुत जल मिला दीजिए और दुबारा मिश्रित करें।

7. ट्राइ–पामिटिन मानक

ट्राइ–पामिटिन को क्लोरोफॉर्म में विलेय कर 100 pg/ml बनाइए।

(iii) **फॉस्फोलिपिड का आकलन**

1. परक्लोरिक अम्ल (70%)

2. अमोनियम मोलिब्डेट (3%, 3g/100 ml आसुत जल)

3. ऐस्कॉर्बिक अम्ल (3%)

4. मानक फॉस्फोरस विलयन (80 pg/ml)

KH_2PO_4 (35.1 mg) को 100 ml आसुत जल में विलेय कीजिए।

(iv) **मुक्त वसा अम्लों (FFA) का आकलन**

1. क्लोरोफॉर्म – हेप्टेन – मेथेनॉल मिश्रण (सीएचएम मिश्रण) 200:150:7 अनुपात में।

2. सक्रियित सिलिसिक अम्ल : ट्राइएसिल ग्लिसरॉल के आकलन के लिए तैयारी में दिए गए निर्देश के अनुसार इसे तैयार कीजिए।

3. कॉपर नाइट्रेट – ट्राइएथेनॉलऐमीन विलयन

1M जलीय ट्राइएथेनॉलऐमीन के 9 ml, 1N ऐसीटिक अम्ल के 1 ml, $Cu(NO_3).23H_2O$ (6.45%) के 10 ml के मापें और सोडियम क्लोराइड के 33 g तालें। इन्हें भली–भांति मिश्रित करें और इसकी pH को 8.1 तक समायोजित करें।

4. डाइएथिल डाइथायोकार्बेमेट (0.1%)

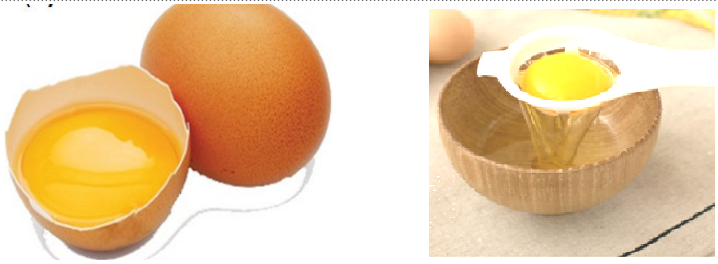
100 mg डाइएथिल डाइथायोकार्बेमेट को 100 ml n-ब्यूटेनोल में विलेय कीजिए।

5. मानक पामिटिक अम्ल (200 mg / 100 ml) को क्लोरोफॉर्म – हेप्टेन – मेथेनॉल मिश्रण में तैयार किया जाता है। कार्यकारी विलयन के लिए सांद्र विलयन (200 µg/ml) को 1:10 अनुपात में तनु कर लिया जाता है।

4.4 विधिक्रम

(a) अंडे की जर्दी (पीला भाग) से लिपिड का पृथक्करण

1. मुर्गी के अंडे से अंडे की जर्दी को अलग करें (चित्र 4.2) और उसका आयतन मापें।



चित्र 4.2 : (a) अंडे के सफेद भाग के साथ अंडे की जर्दी और (b) अंडे के सफेद भाग से अंडे की जर्दी को अलग करना।

2. अंडे की जर्दी में 1M सोडियम क्लोराइड विलयन 1:5 v/v अनुपात में डालें।

3. एक परखनली में तनुकृत अंडे की जर्दी का 2 ml लीजिए और इसमें 3 ml आइसोप्रोपिल ऐल्कोहॉल मिलायें।

4. इसके बाद इसमें 2 ml पेट्रोलियम ईथर मिलायें।

5. उपरोक्त मिश्रण को एक साफ फ्लास्क में स्थानांतरित करें और इसमें रबर की डाट लगा दें।

6. इसे 3–5 मिनट तक अच्छी तरह से मिलाएं।

7. मिश्रण को फिर दो अलग परतों को प्राप्त करने के लिए 10 मिनट के लिए छोड़ दीजिए।

8. निचली परत को सावधानीपूर्वक लेकर एक साफ परखनली में स्थानांतरित करें और ठीक से ढक दीजिए।

(b) टीएलसी द्वारा पृथक किए गए लिपिडों का प्रभाजन

आप या तो वांछित साइज़ में काटने के बाद बनी–बनाई टीएलसी शीट का उपयोग कर सकते हैं या फिर स्वयं प्लेटें तैयार कर सकते हैं, यद्यपि सामान्यता अधिकांश प्रयोगशालाओं में बनी–बनाई टीएलसी शीट उपयोग में ली जाती है। टीएलसी प्लेट तैयार करने के लिए निम्नलिखित चरणों का पालन करें :

1. काँच की प्लेटों को साबुन और पानी से साफ करें और सूखने दें।

2. किसी भी चिकनी सामग्री को हटाने के लिए काँच की प्लेटों को एथेनॉल में पोंछे।

3. अब 4 ग्राम सिलिका जेल G तोलें।

4. इसमें 8 ml जल मिलाकर (1:2 w/v) का घोल तैयार कीजिए।

5. इसे अच्छी तरह मिलायें और फिर तुरंत एक साफ काँच की प्लेट पर उड़ेल दीजिए।

6. एक समान रूप से मोटी परत (250 µm) तैयार करने के लिए इसे हाथ से फैलाएँ, ध्यान दें की वायु के बुलबुले न रहें। आप एक टीएलसी बनाने वाली मशीन (TLC maker) का उपयोग भी कर सकते हैं।

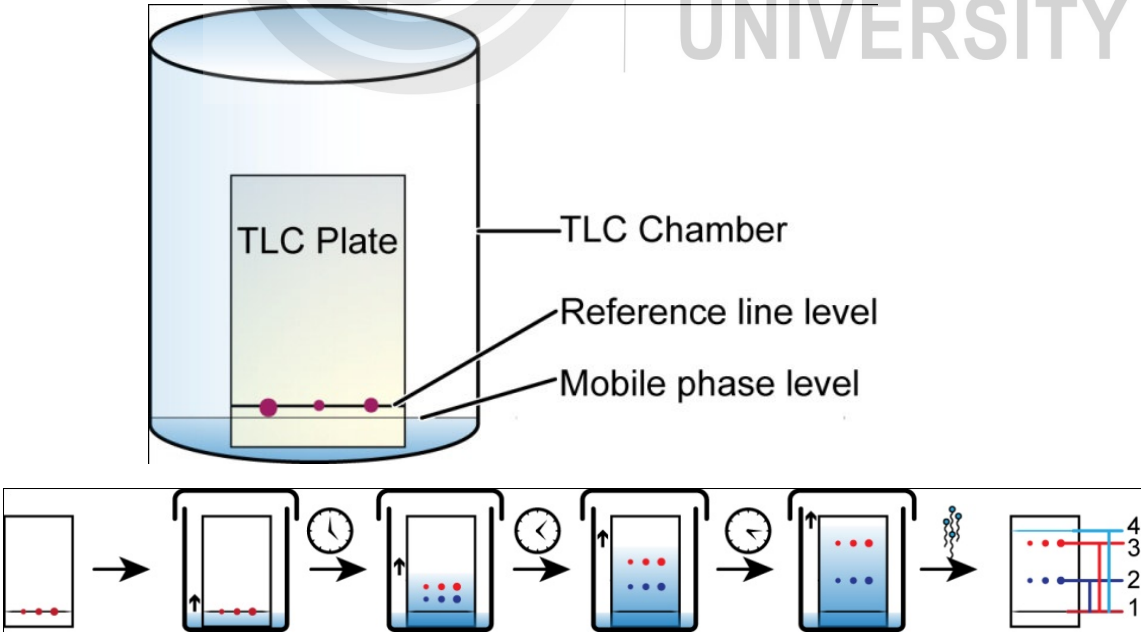
7. प्लेटों को हवा में सूखने के लिए छोड़ दें।

8. अब इन काँच की प्लेटों को एक घंटे के लिए ओवन में 110°C पर गर्म करके सक्रियित कर लीजिए।

9. प्लेटों को स्पॉटिंग (बिंदुकन) से पहले ठंडा होने दें।

10. इसके बाद पेट्रोलियम ईथर, डाइएथिल ईथर और ग्लेशियल ऐसीटिक अम्ल को 80:20:1 के अनुपात में मिलाकर विलायक तंत्र तैयार कीजिए। विलायक टैंक के साइज़ के आधार पर इसकी आवश्यक मात्रा बनाएं। विलायक तंत्र को विलयन टैंक में डालने के बाद इसे ढककर विलायक वाष्पों के साथ संतृप्त होने के लिए 2 घंटे के लिए छोड़ दीजिए।

11. अब आप स्पॉटिंग के लिए तैयार हैं। मानक लिपिडों के लिए प्रत्येक लिपिड का लगभग 1% w/v विलयन तैयार किया जाता है, जिनमें से 10 µl की स्पॉटिंग की जाती है। इसी तरह पृथक किए गए सभी लिपिडों के 10-15 µl की स्पॉटिंग की जाती है। यद्यपि सही आयतन नमूने की सांद्रता के आधार पर अलग–अलग हो सकता है। स्पॉटिंग के लिए सारी मात्रा एक साथ नहीं डालें। बल्कि, पहले प्लेट पर निर्धारित स्थान पर लिपिड का 5 µl का स्पॉट लगाएं, इसे सूखने दें और फिर 5 µl पहले वाले स्पॉट पर लगाएं और इसे दुबारा सूखने दें। इसे तब तक दोहराएं, जब तक सारी मात्रा चिन्हित हो जाए। स्पॉटिंग पूरी होने के बाद प्लेट को संतृप्त विलायक टैंक में रख दें। विलायक धीरे धीरे प्लेट में उपर की ओर बढेगा। इसे तब तक चलने दें, जब तक यह प्लेट के ऊपरी हिस्से से 2-3 mm रह जाए (चित्र 4.3)। चलने के लिए लिए गए समय को नोट कर लें।



चित्र 4.3 : टीएलसी द्वारा लिपिडों का प्रभाजनः संदर्भ रेखा (reference line) और चल प्रावस्था स्तर (mobile phase level); टीएलसी प्लेट अभिविन्यास (orientation) तथा टीएलसी कक्ष (TLC chamber) चित्र में चिन्हित किए गए हैं।

12. प्रभाजित लिपिडों का डाइक्लोरोफ्लुओरेसिन विलयन का छिड़काव करके पता लगाएं और 270 nm पर पराबैंगनी स्पेक्ट्रमिकी द्वारा देखें।

13. पराबैंगनी स्पेक्ट्रमिकी के अनुपलब्ध होने पर प्लेटों पर 50% v/v सल्फ्यूरिक अम्ल छिड़क कर भी स्पॉट (बिन्दु) देखे जा सकते हैं। छिड़काव के बाद, प्लेटों को 10 मिनट के लिए 110°C पर गरम कीजिए और फिर स्पॉट विकसित होने की प्रक्रिया को पूरा करने के लिए ठंडा होने दीजिए।

14. स्पॉट विकसित होने के बाद, उन्हें पेन्सिल से चिन्हित करें और उनकी फोटो ले लें।

(c) अंडे की जर्दी के प्रभाजित लिपिड घटकों का आकलन

कोलेस्ट्रॉल का आकलन (पारेख ओर जंग विधि; 1970)

1. प्रभाजित कुल लिपिड का 0.1 ml लें, इसे सूखने तक वाष्पीकृत करें और उसमें 3.0 ml फेरिक क्लोराइड- यूरेनिल ऐसीटेट अभिकर्मक मिलायें।

2. मानक का 20-60 µg युक्त कोलेस्ट्रॉल विलयन सूखने तक वाष्पीकृत करें और इसमें 3.0 ml फेरिक क्लोराइड यूरेनिल ऐसीटेट अभिकर्मक मिलायें।

3. लोपित (ब्लैंक) में केवल 3 ml फेरिक क्लोराइड-यूरेनिल ऐसीटेट अभिकर्मक मिलाएं।

4. सभी तीन नलियों को आइस बाथ (ice bath) में स्थानांतरित करने के बाद, सल्फ्यूरिक –फेरस सल्फेट अभिकर्मक के 2.0 ml मिलाएं। रंग विकसित होने के लिए नलियों को 15 मिनट के लिए छोड़ दीजिए।

5. स्पेक्ट्रमी प्रकाशमापी की मदद से 540 nm पर अवशोषणांक रिकॉर्ड करें।

ट्राइऐसिलग्लिसरॉल का आकलन

1. प्रभाजित कुल लिपिड का 0.1 ml लें, इसे सूखने तक वाष्पीकृत करें फिर उसमें 40 ml आइसोप्रोपेनॉल और 400 mg सिलिसिक अम्ल मिलायें।

2. उपरोक्त मिश्रण 20 मिनट के लिए एक हिलाने वाले यंत्र में ठीक से मिलायें।

3. इस विलयन मिश्रण का 15 मिनट तक 1000 g पर अपकेन्द्रण कीजिए फिर अधिप्लवी को अलग कर लें।

4. इस अधिप्लवी तरल के 2.0 ml में 0.6 ml साबुनीकरण अभिकर्मक मिलायें और इसे 60-70°C पर 15 मिनट के लिए ऊष्मायित करें।

5. ठंडा करने के बाद इसमें 1.0 ml सोडियम मेटापरआयोडेट मिलायें और अच्छी तरह मिश्रित कीजिए। अब ऐसीटिल ऐसीटोन अभिकर्मक का 0.5 ml मिलाएं और इसे फिर से मिश्रित कीजिए।

6. नलियों को 30 मिनट के लिए 50°C पर ऊष्मायित करें और 10 मिनट के लिए ठंडा होने दें। विलयन पीला हो जाता है।

7. एक स्पेक्ट्रमी प्रकाशमापी में 405 nm पर अवशोषणांक रिकॉर्ड करें।

8. मानक ट्राइपामिटिन (20-100 pg) के साथ उपरोक्त चरणों को दोहरायें।

फॉस्फोलिपिड का आकलन

1. अलग किए हुए कुल लिपिड का 0.1 ml लें, सूखने तक वाष्पीकृत करें।

2. इसमें 1.0 ml परक्लोरिक अम्ल मिलायें ओर बालू ऊष्मक (sand bath) पर इसे सुपाच्य बनायें। पूर्ण पाचन के बाद, यह रंगहीन हो जाता है।

3. पचे हुए लिपिड की मात्रा में जल मिलाकर उसे 5.0 ml कर दीजिए।

4. अब इसमें 0.5 ml अमोनियम मोलिब्डेट और साथ में ऐस्कॉर्बिक अम्ल विलयन के 0.5 ml मिलाएं और फिर अच्छी तरह से मिश्रित कर दें।

5. इन नलियों को 6 मिनट के लिए उबलते जल के जल ऊष्मक में गरम करें। आप देखेंगे कि नीला रंग विकसित होता है। 700 nm पर अवशोणांक लीजिए और प्रेक्षण सारणी में रिकार्ड करें।

मुक्त वसा अम्लों का आकलन

1. 0.1 ml प्रभाजित हुआ कुल लिपिड लें और इसे क्लोरोफॉर्म–हेप्टेन–मेथेनॉल मिश्रण के 6.0 ml के साथ अच्छी तरह मिलाएं।

2. इसके बाद इनमें 200 mg सक्रियित सिलिसिक अम्ल डालें और फिर से अच्छी तरह मिलायें।

3. इस विलयन को 2000 rpm पर पाँच मिनट के लिए अपकेन्द्रित कीजिए और अधोप्लवी को दूसरी नली में स्थानांतरित कर दें।

4. इसमें 2.0 ml कॉपर नाइट्रेट – टीईए विलयन मिलायें और फिर इसे हिलाने वाले यंत्र पर 20 मिनट तक मिश्रित होने दें।

5. 2000 rpm पर 5 मिनट के लिए दुबारा से अपेन्द्रित करें। दो अलग–अलग प्रावस्थाएं देखी जा सकती हैं।

6. ऊपरी परत के तरल के 2.0 ml को एक अन्य नली में स्थानांतरित करें और इसमें 1.0 ml रंग अभिकर्मक मिलायें और अच्छी तरह से हिलायें।

7. विकसित हुए नीले रंग को 430 nm पर पढ़ें और प्रेक्षण सारणी में रिकार्ड करें।

4.5 प्रेक्षण और परिणाम

(a) सारणी 4.1: कोलेस्ट्रॉल का आकलन

क्र. सं.	लिपिड अर्क का आयतन (ml)	मानक का आयतन (µl)	फेरिक क्लोराइड यूरेनिल ऐसीटेट अभिकर्मक का आयतन (ml)	H_2SO_4 फेरस सल्फेट अभिकर्मक का आयतन (ml)	मिश्रित करें और इसे 15 मिनट के लिए बर्फ के ऊष्मक में ऊष्मायन	540 nm पर अवशोषणांक
लोपित (B)	0.0	0.0	3.0	2.0		
मानक (S)	0.0	10	3.0	2.0		
परीक्षण (T)	0.1	0.0	3.0	2.0		

$$\text{अंडे की जर्दी में कोलेस्ट्रॉल की सांद्रता} = \frac{\text{निष्कर्षित लिपिड का अवशोषणांक} \times \text{मानक कोलेस्ट्रॉल की सांद्रता}}{\text{मानक कोलेस्ट्रॉल का अवशोषणांक}}$$

(b) सारणी 4.2: ट्राइऐसिलग्लिसरॉल का आकलन

अभिकर्मक ↓	लोपित (B)	मानक (S)	परीक्षण (T)
लिपिड अर्क (ml)	0.0	0.0	0.1
मानक ट्राइऐसिल ग्लिसरॉल (ml)	0.0	1.0	0.0
आइसोप्रोपेनॉल का आयतन (ml)	40	40	40
सिलिलिक अम्ल (mg)	400	400	400
यांत्रिक रूप से हिलाकर मिश्रित करें ; अपकेन्द्रण			
अधोप्लवी आयतन (ml)	2.0	2.0	2.0
साबुनीकरण अभिकर्मक का आयतन (ml)	0.6	0.6	0.6
15 मिनट तक 60-70°C पर ऊष्मायित कीजिए, ठंडा करने के लिए रखें			
सोडियम परआयोडेट का आयतन (ml)	1.0	1.0	1.0
ऐसीटिलऐसीटोन का आयतन (ml)	0.5	0.5	0.5
30 मिनट तक 50°C पर ऊष्मायित कीजिए, ठंडा करें			
405 nm पर अवशोषणांक			

$$\text{अंडे की जर्दी में ट्राइग्लिसराइड की सांद्रता} = \frac{\text{निष्कर्षित लिपिड का अवशोषणांक} \times \text{मानक ट्राइग्लिसराइड की सांद्रता}}{\text{मानक ट्राइग्लिसराइड का अवशोषणांक}}$$

(c) सारणी 4.3: फॉस्फोलिपिड का आकलन

क्र. सं.	लिपिड अर्क का आयतन (ml)	परक्लोरिक अम्ल का आयतन (ml)	मानक फॉस्फेट का आयतन (µl)	बालू ऊष्मक पर पाचित (रंगहीन विलयन)	आसुत जल (ml)	अमोनियम मोलिबडेट का आयतन (ml)	ऐस्कॉर्बिक अम्ल का आयतन (ml)	नलियों को 6 मिनट के लिए उबलते जल के जल ऊष्मक में गरम कीजिए ; फिर ठंडा करें	700 nm पर अवशोषणांक
लोपित (B)	0.0	1.0	0.0		5.0	0.5	0.5		
मानक (S)	0.0	1.0	250		5.0	0.5	0.5		
परीक्षण (T)	0.1	1.0	0.0		5.0	0.5	0.5		

$$\text{अंडे की जर्दी में फॉस्फोलिपिड की सांद्रता} = \frac{\text{निष्कर्षित लिपिड का अवशोषणांक} \times \text{मानक फॉस्फेट की सांद्रता}}{\text{मानक फॉस्फेट का अवशोषणांक}}$$

(d) सारणी 4.4: मुक्त वसा अम्लों का आकलन

	लोपित (B)	मानक (S)	परीक्षण (T)
लिपिड अर्क का आयतन (ml)	0.0	0.0	0.2
क्लोरोफॉर्म–हेप्टेन–मेथेनॉल मिश्रण (ml)	6.0	6.0	6.0
मानक का आयतन (ml)	0.0	1.0	0.0
सक्रियित सिलिसिक अम्ल (mg)	200	200	200
अच्छी तरह मिलायें; अपकेन्द्रित कीजिए और ऊपरी परत इकट्ठा कीजिए			
कॉपर नाइट्रेट टीईए विलयन (ml)	2.0	2.0	2.0
हिलाने वाले यंत्र पर 20 मिनट तक मिश्रित और फिर अपकेन्द्रित कीजिए। ऊपरी परत को एक अन्य नली में स्थानांतरित किया			
रंग अभिकर्मक (ml)	1.0	1.0	1.0
अच्छी तरह मिश्रित कीजिए			
A_{440} nm पर अवशोषणांक			

$$\text{अंडे की जर्दी में मुक्त फैटी अम्लों की सांद्रता} = \frac{\text{निष्कर्षित लिपिड का अवशोषणांक} \times \text{मानक फैटी अम्ल की सांद्रता}}{\text{मानक फैटी अम्ल का अवशोषणांक}}$$

4.6 सावधानियाँ

1. सिलिका जेल घोल को जल्दी से जल्दी फैलाना चाहिए अन्यथा बंधनकारी (binder) जमना शुरू हो जाएगा।

2. पुनरूत्पादनीय परिणाम प्राप्त करने के लिए सक्रियण समय स्थिर रखा जाना चाहिए। अतितापन से बचना चाहिए।

3. नमूने को कम ध्रुवणता वाले वाष्पशील विलायक में विलेय किया जाना चाहिए।

4. क्रोमेटोग्राफी जार को ढक कर रखें ताकि वाष्पीकरण विलायक तंत्र की संरचना को न बदल दें।

5. नॉन प्रेपरेटिव तनुस्तर प्लेट में नमूने का आयतन कम से कम (5-15 µl) लगाएं। बहुत अधिक मात्रा में लगाने से निकट के स्पॉट एक दूसरे में विलय हो जाएंगे। पूरा नमूना एक ही बार में चिन्हित न करें। 5 µl लगाएं, सूखने दें और फिर 5 µl लगाएं जब तक कि प्लेट पर पूरी मात्रा चिन्हित हो जाए।

6. नमूना चिन्हित करते समय, लेपित जेल को हटाएँ नहीं।

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

सदभे

1. Sashidhar Rao, B, and Deshpande, V (2005), Experimental biochemistry – A student companion, I.K International Pvt .Ltd, New Delhi

2. Cappuccino, J.G and Sherman, N (2002), Microbiology- A laboratory Manual, Pearson Education, Inc.

3. Stock, R and Rice, C.B.F (1974), Chromatographic methods, Chapman and Hall Ltd.

ignou
THE PEOPLE'S
UNIVERSITY